



HAL
open science

**Diversité des mécanismes d'interactions des vibrios du
clade Splendidus et de leur hôte, l'huître creuse
Crassostrea gigas**

Tristan Rubio

► **To cite this version:**

Tristan Rubio. Diversité des mécanismes d'interactions des vibrios du clade Splendidus et de leur hôte, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT098 . tel-02172959

HAL Id: tel-02172959

<https://theses.hal.science/tel-02172959v1>

Submitted on 4 Jul 2019

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des interactions (BDI)

École doctorale
GAÏA

Unité de recherche
UMR 5244, Interactions Hôtes Pathogènes Environnements (IHPE)

Diversité des mécanismes d'interactions des vibrios du
clade Splendidus et de leur hôte, l'huître creuse
Crassostrea gigas.

Présentée par Tristan RUBIO
Le 23 novembre 2017

Sous la direction de Delphine DESTOUMIEUX-GARZON
et de Guillaume CHARRIERE

Devant le jury composé de

M. Stephen BAGHDIGUIAN, Professeur, Université de Montpellier

Mme Christine BRAQUART-VARNIER, Professeur, Université de Poitiers

M. Abdelaziz HEDDI, Professeur, INSA de Lyon

M. Yannick LABREUCHE, Cadre de recherche, Ifremer

M. Guillaume CHARRIERE, Maître de conférences, Université de Montpellier

Mme Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, Directrice de recherche, CNRS

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur de thèse

Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je n'aurais pas pu réaliser cette thèse sans la collaboration de nombreuses personnes. C'est pourquoi je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont collaboré à titre personnel ou professionnel à la réalisation de ce projet.

En premier lieu, j'aimerais remercier Madame Christine Braquart-Varnier et Monsieur Abdelaziz Heddi pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Messieurs Stephen Baghdiguan et Yannick Labreuche pour leur participation à ce jury.

Je remercie l'Université de Montpellier, l'école doctorale GAÏA pour l'allocation de recherche qui m'a été accordée. Je remercie tout particulièrement le directeur de l'école doctorale GAÏA, Monsieur Marc Bouvy, pour sa disponibilité et son soutien au cours de ma thèse. Je remercie également l'ANR (projet VIBRIOGEN ANR-11-BSV7-0023 et projet DECIPHER ANR-14-CE19-0023) et l'Union Européenne (projet H2020 Vivaldi n°678589) pour le financement de mes travaux de recherche.

Je remercie Monsieur Guillaume Mitta, directeur de l'UMR IHPE et Monsieur Yannick Gueguen, directeur adjoint de l'UMR IHPE pour m'avoir accueilli au sein de leur unité de recherche.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers Madame Delphine Destoumieux-Garzón. Tu as toujours été très investie dans ton rôle de Directrice de thèse mais également dans ton rôle de responsable d'équipe. Je te remercie pour m'avoir guidé tout au long de ces 3 années et pour m'avoir accordé ta confiance. Ton talent et ta passion pour la Science forcent l'admiration et sont source d'inspiration pour la suite de ma carrière. Tu as su me pousser à donner le meilleur de moi même à chaque étape de ma thèse notamment dans les moments difficiles. Au niveau personnel, j'ai également passé de très bons moments à tes côtés que ce soit pour les Caïpirinhas ou la cueillette des champignons! Je ne t'oublierai jamais.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Guillaume Charrière, co-directeur de cette thèse. Lorsque je suis arrivé en stage dans le laboratoire tu as cru en moi et tu m'as poussé à poursuivre en thèse, je ne t'en remercierai jamais assez. Je n'oublierai pas nos discussions scientifiques pendant nos "pauses chocolats" particulièrement enrichissantes qui m'ont beaucoup aidé dans ma réflexion scientifique. Et surtout merci pour toutes les péripéties rocambolesques que nous avons vécu pendant nos missions, que ce soit la chute dans les escalators ou notre errance à coté du Ikea de Guipavas à 22h00. Ces souvenirs resteront gravés dans ma mémoire.

Je remercie Madame Audrey Vanhove qui m'a encadré durant mon stage de M2 au laboratoire et avec qui j'ai beaucoup collaboré.

Je désire remercier nos collaborateurs avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Tout d'abord je remercie Madame Frédérique Le Roux pour nos échanges scientifiques enrichissants, pour son aide précieuse sur la génomique des vibrios et pour m'avoir permis de présenter mes travaux dans le cadre du congrès international "Vibrio 2016". Merci également à Monsieur Yannick Labreuche qui m'a offert l'opportunité de collaborer sur le projet R5-7. Merci également à Madame Annick Jacq pour son aide précieuse sur le RNAseq bactérien.

Merci aux membres du projet DECIPHER, Messieurs Guillaume Mitta, Julien de Lorgeril et Yannick Gueguen pour leur aide sur la mise au point des protocoles d'extraction et pour m'avoir fourni le matériel biologique.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame Eve Toulza. Merci pour tout ce que tu m'as appris en bioinformatique. Sans tes conseils cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Merci à Monsieur Cristian Chaparo pour son investissement et son aide dans les analyses RNAseq. Merci également à Monsieur Jérémie Vidal-Dupiol qui dès son arrivée dans l'équipe m'a proposé son aide pour les analyses RNAseq.

Je voudrais remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Madame Marie-Agnès Travers et Messieurs Alain Givaudan et Georges Lutfalla pour tous leurs précieux conseils.

Je remercie le collège doctoral du Languedoc-Roussillon et particulièrement Madame Anne-Claire Bounoux pour l'organisation des "doctoriales transfrontalières" et de "Ma thèse en 180 secondes". Merci à Madame Pascaline Girot et Messieurs Marc Dumas et Vincent Bonhomme pour m'avoir formé à l'expression scénique, à structurer mon discours et à vulgariser mes travaux. Grâce à vous tous, j'ai eu l'opportunité d'aller jusqu'en finale nationale de "Ma thèse en 180 secondes", de présenter ma thèse à des lycéens, d'être invité par l'association d'entreprise BioMedical Alliance et d'être invité à Matignon par Monsieur Manuel Valls et Madame Najat Vallaud-Belkacem avec Madame Delphine Destoumieux-Garzón. Je remercie mes collègues de la formation "Ma thèse en 180 secondes" pour leur soutien et pour tout les bons moments passés ensemble, tout particulièrement Emeline et Adeline.

Je voudrais aussi remercier Monsieur Jean-Michel Escoubas et Madame Evelyne Bachère. Merci pour le grand intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci pour votre soutien : j'ai pris plaisir à discuter de mes travaux avec vous.

Je remercie Aurore Poirier et Céline Abi-Khalil anciennes doctorantes du laboratoire. J'ai trouvé en vous de véritables amies et un soutien fort. Merci également Maxime Lafont, Samuel Dupont, Etienne Robino, Maëva Grassi, Aude Lucasson et Daniel Oyanedel pour votre humour dans le bureau et pour votre soutien dans les moments difficiles. Merci également Agnès Vergnes pour son aide dans l'organisation de ma thèse, pour tout nos fous rires et pour avoir relu ma thèse. Merci à Marc Leroy pour ça bienveillance avec les étudiants, tu es toujours présent.

Je remercie vivement tous les membres de l'équipe MIMM anciens et actuels: Philippe Haffner, Jean-Luc Rolland, Arnaud Lagorce, Caroline Montagnani, Thierry Noël, Kelly Brenner et Carmen Lopez.

Je remercie également tout le personnel des plateformes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. Merci à Vicky Diakou et à Elodie Jublanc pour vos conseils sur l'imagerie confocale, vous êtes toujours bienveillantes et prêtes à aider. Merci à Geneviève Conjéro pour son aide sur l'imagerie intravitale et pour m'avoir permis d'utiliser une technologie qui n'était pas encore à la disposition de tous, j'ai beaucoup appris. Merci à Chantal Cazevieille pour la microscopie électronique, pour ta joie de vivre et ta gentillesse.

Je remercie également Mireille Rossel, Françoise Trousse, Georgina Rivera et Naoill Abdellaoui pour leur aide en imagerie.

Je voudrais remercier par ces quelques lignes mes proches notamment mes parents Jean-Charles Rubio et Myriam Rubio, vous vous êtes battus pour ma réussite et vous êtes mon plus fort soutien. Merci à mon frère Kilian Rubio et à ma sœur Aurélie Verhoest, vous êtes des piliers dans ma vie et des exemples que je m'efforce de suivre. Merci à ma nièce Emma Fritz et à mon neveu Arthur Fritz qui soutiennent toujours leur tonton et je voudrais également remercier mon beau frère David Fritz pour son soutien.

Merci à Isabelle Blin, Cécilia de Saint Félix, Sarah Jebabli et Julien Gaudemer qui m'ont tendu la main à un moment difficile. Grâce à vous j'ai pu faire ma thèse. Par ce manuscrit, je suis fier de vous montrer que j'ai saisi la chance que vous m'avez offerte.

Merci à Matthieu Paiola, Benjamin Sembeil, Maud Minard, Dimitri Blandin, Albane Julia, Lucie Poulet, Jennifer Denys et Guillaume Saint-Martin pour leur soutien moral pendant ma thèse et surtout pendant la rédaction.

Enfin le dernier mais pas des moindres, je remercie chaleureusement Olivier Picaud, mon amour, tu n'as jamais cessé de m'encourager. Tu as toujours cru en moi et tu as toujours été présent. Merci pour ton soutien indéfectible. Je me rend compte de la chance extraordinaire que j'ai de t'avoir.

Je dédie cette thèse à mes parents Jean-Charles Rubio et Myriam Rubio qui m'ont toujours encouragé à réaliser mes projets.

"Si tu veux aller vite, marche seul mais si tu veux aller loin, marchons ensemble"

Proverbe Africain

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	6
INTRODUCTION GENERALE.....	8
CHAPITRE I :RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	12
1 L'HUITRE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	12
1.1 BIOLOGIE, MORPHOLOGIE ET ANATOMIE DE <i>C. GIGAS</i>	12
1.1.1 Anatomie	12
1.1.2 Physiologie.....	13
1.2 L'IMMUNITE INNEE CHEZ <i>C. GIGAS</i>	16
1.2.1 Les tissus immunitaires de <i>C. gigas</i> : les hémocytes et les épithéliums	16
1.2.2 Molécules de reconnaissance du non soi.....	20
1.2.3 Signalisation et communication	23
1.2.4 Mécanismes effecteurs de l'immunité	25
2 LES VIBRIOSES	38
2.1 LES VIBRIOS PATHOGENES	38
2.1.1 Biologie des vibrios.....	38
2.1.2 Taxonomie des vibrios.....	39
2.1.3 Les vibrios pathogènes de l'homme	40
2.1.4 Les vibrios pathogènes d'huître	44
2.2 SYNDROME DE MORTALITE DES HUITRES JUVENILES	49
2.2.1 Le virus OsHV-1.....	50
2.2.2 Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	51
2.2.3 Facteurs environnementaux.....	51
3 DIVERSITE DES MECANISMES D'INTERACTIONS HOTE-VIBRIO	53
3.1 FACTEUR DE VIRULENCE DES VIBRIOS PATHOGENES	53
3.1.1 Les protéases.....	53
3.1.2 Protéines altérant l'intégrité membranaire	54
3.1.3 Protéines ciblant le cytosquelette d'actine	57
3.2 ROLE DES SYSTEMES DE SECRETION DANS LA VIRULENCE.....	58
3.3 RESISTANCE AU SYSTEME IMMUNITAIRE.....	59
3.3.1 Echappement à la phagocytose.....	60
3.3.2 Résistance aux composés microbicides de l'immunité	61
CHAPITRE II: RESULTATS	75
SECTION A: ROLE ESSENTIEL DE L'EFFLUX DU CUIVRE DANS LA SURVIE INTRACELLULAIRE, LA LA COLONISATION DE L'HOTE ET LA VIRULENCE DE <i>V. TASMANIENSIS</i> LGP32	75
Synthèse des résultats.....	75
Publication 1	79
SECTION B: EVOLUTION PHENOTYPIQUE PARALLELE DE LA CYTOTOXICITE ENVERS LES HEMOCYTES CHEZ LES VIBRIOS PATHOGENES DE L'HUITRE <i>C. GIGAS</i>.....	122
Synthèse des résultats.....	123

Publication 2	126
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	180
CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	201
1 PROCESSUS PATHOGENES DES VIBRIOS DU CLADE SPLENDIDUS.....	201
1.1 DIVERSITE DES MECANISMES DE CYTOTOXICITE DE <i>V. TASMANIENSIS</i> LGP32 ET <i>V. CRASSOSTREAE</i> J2-9 PATHOGENES POUR L’HUITRE	201
1.2 MECANISMES DE CYTOTOXICITE DES VIBRIOS DU CLADE SPLENDIDUS.	202
1.2.1 Effecteurs cytotoxiques	202
1.2.2 Les systèmes de sécrétion	203
1.2.3 Rôle de la protéine R5-7 dans la cytotoxicité de <i>V. crassostreae</i> J2-9	204
1.2.4 Mécanisme de cytotoxicité par induction d'un programme de mort cellulaire programmé.	205
1.3 LE ROLE ESSENTIEL DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'HOMEOSTASIE DES METAUX DANS LES INTERACTIONS HUITRE/VIBRIOS.....	207
1.3.1 L'homéostasie des métaux	207
1.3.2 Les espèces réactives de l'oxygène	208
2 TROPISME TISSULAIRE ET COLONISATION DES TISSUS DE L'HUITRE <i>C. GIGAS</i> PAR LES VIBRIOS DU CLADE SPLENDIDUS	209
2.1 INHIBITION DE L'AGREGATION HEMOCYTAIRE PAR LES VIBRIOS PATHOGENES	210
2.2 COLONISATION DU TISSU CONJONCTIF PAR LES VIBRIOS PATHOGENES	210
2.3 DYNAMIQUE D'INFECTION	212
3 SYNDROME DE MORTALITE DES HUITRES JUVENILES: UNE INFECTION POLYMICROBIENNE.....	213
3.1 INTERACTIONS ENTRE LES POPULATIONS PATHOGENES DE VIBRIOS.....	214
3.2 IMPACT DU MICROBIOTE SUR LA VIRULENCE DES VIBRIOS DU CLADE SPLENDIDUS.....	214
3.3 COÏNFECTION ENTRE LES VIBRIOS DU CLADE SPLENDIDUS ET LE VIRUS <i>OshV1-μVAR</i> CHEZ L'HUITRE <i>C. GIGAS</i>	215
CONCLUSION GENERALE.....	218
CHAPITRE IV: MATERIELS & METHODES.....	221
1 SOUCHES BACTERIENNES, PLASMIDES ET MILIEUX	221
1.1 SOUCHES ET PLASMIDES	221
1.2 MILIEUX DE CULTURE.....	223
2 CULTURE BACTERIENNE, MUTAGENESE ET CONJUGAISON	224
2.1 SOUCHES BACTERIENNES	224
2.2 MUTAGENESE	225
2.3 SOUCHES FLUORESCENTES	225
2.4 PREPARATION DES VIBRIOS POUR LES EXPERIMENTATIONS DE PHENOTYPAGE.....	225
2.5 PHYLOGENIE DES SOUCHES J0-13, J5-13 ET J5-9	225
3 HUITRES, INFECTION EXPERIMENTALE ET PRELEVEMENT D'HEMOLYMPHE.	226
3.1 MATERIEL BIOLOGIQUE	226
3.2 MISE EN CULTURE DES HEMOCYTES	227
4 PHENOTYPAGE DES VIBRIOS <i>IN VITRO</i>.....	227
4.1 TEST DE SENSIBILITE AUX METAUX	227
4.2 QUANTIFICATION DE LA CYTOTOXICITE <i>IN VITRO</i>	228
4.3 TEST DE SURVIE INTRACELLULAIRE	228

4.4	MESURE DE LA PRODUCTION DE ROS PAR LES HEMOCYTES <i>IN VITRO</i>	229
4.5	MICROSCOPIE PHOTONIQUE <i>IN VITRO</i>	229
5	INTERACTION HUITRE/VIBRIO <i>IN VIVO</i>.....	230
5.1	INFECTION EXPERIMENTALE PAR INJECTION	230
5.2	INFECTION EXPERIMENTALE PAR BALNEATION	230
5.3	MICROSCOPIE CONFOCALE <i>IN VIVO</i>	231
5.4	MICROSCOPIE BI PHOTONIQUE <i>IN VIVO</i>	231
5.5	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION <i>IN VIVO</i>	232
5.6	HISTOLOGIE	232
6	BIOLOGIE MOLECULAIRE	233
6.1	EXTRACTION D'ADN ET QUANTIFICATION DES VIBRIO PAR RT-PCR.....	233
6.2	PCR DE VERIFICATION DES MUTANTS	233
6.3	EXPERIMENTATIONS POUR LE SEQUENÇAGE ARN D'HUITRE	234
6.4	ANNOTATION FONCTIONNELLE	235
6.5	VALIDATION DU SEQUENÇAGE ARN D'HUITRE PAR QPCR	235
	BIBLIOGRAPHIE	237

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique / ribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AhpC	Alkylpéroxyde réductase C
AMP	Peptide antimicrobien (<u>Anti</u> <u>M</u> icrobial <u>P</u> eptide)
ATP7	Copper transporting ATPase
BPI	<u>B</u> actericidal <u>P</u> ermeability <u>I</u> ncreasing <u>P</u> rotein
Cm	Chloramphénicol
CTR1	Protéine de transport du cuivre (Copper transport protein)
DAMPS	Motifs moléculaires associés aux dommages (<u>D</u> amage- <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns)
Dap	Acide diaminopimélique
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DL50	<u>D</u> ose <u>l</u> éthale <u>50</u>
DUOX	<u>D</u> ual- <u>o</u> xydase
ECP	Produits extracellulaires (<u>E</u> xtra <u>C</u> ellular <u>P</u> roduct)
Edmf	<u>E</u> au de <u>m</u> er <u>f</u> iltrée
FAO	<u>F</u> ood and <u>A</u> griculture <u>O</u> rganisation
IFN	Interféron
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
NETs	<u>N</u> eutrophil <u>E</u> xtracellular <u>T</u> raps
NOX	<u>N</u> ADPH <u>o</u> xydase
NRAMP	<u>N</u> atural <u>r</u> esistance <u>a</u> ssociated <u>m</u> acrophage <u>p</u> rotein
OMV	Vésicule de membrane externe (<u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>V</u> esicule)
ORF	Cadre de lecture ouvert (<u>O</u> pen <u>R</u> eadng <u>F</u> rame)
OsHV-1	<u>O</u> streid <u>H</u> erpes <u>V</u> irus-1
PAMPS	Motifs moléculaires associés aux pathogènes (<u>P</u> athogen <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns)
PGRP	<u>P</u> eptido <u>G</u> lycan <u>R</u> ecognition <u>P</u> rotein
PRP	Protéines de reconnaissance (<u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>P</u> rotein)
Prp	Peptide riche en proline (<u>P</u> roline <u>R</u> ich <u>P</u> rotein)
PRR	Récepteurs de reconnaissance (<u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptor)
RLR	<u>R</u> ig- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor
RNS	Espèces réactives de l'azote (<u>R</u> eactive <u>N</u> itrogen <u>S</u> pecies)
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies)
SOD	<u>S</u> uper <u>O</u> xyde <u>D</u> ismutase
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor
TNF	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Anatomie de l'huître <i>C. gigas</i> et coupe histologique de ses tissus.....	15
Figure 2 Schéma des différentes fonctions de l'hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i>	17
Figure 3 Les différentes populations d'hémocytes en microscopie électronique à transmission	18
Figure 4 Illustration schématique des tissus immunitaires de l'huître <i>C. gigas</i>	20
Figure 5 Voie immunitaires conservées chez l'huître <i>C. gigas</i>	25
Figure 6 Maturation du phagosome	26
Figure 7 Production de ROS/RNS au niveau extracellulaire et intracellulaire par un hémocyte de bivalve	28
Figure 8 Transport du cuivre dans la cellule.....	31
Figure 9 Homéostasie du zinc dans la cellule	32
Figure 10 Schéma résumant l'efflux et l'influx des métaux dans le phagosome de macrophage suite à l'infection par <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
Figure 11 Différente étape de mort cellulaire par ETose suicide.....	37
Figure 12 Les hémocytes d'huître libèrent des pièges d'ADN extracellulaires dans lesquels <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 est piégé	38
Figure 13 Arbre phylogénétique des Vibrios.....	40
Figure 14 Mécanisme d'inhibition de la polymérisation d'actine par <i>V. cholerae</i> au cours de stades intracellulaires.....	42
Figure 15 Mécanisme d'entrée dans l'hémocyte de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32	47
Figure 16 Production d'OMV par <i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32 aux cours de stades extracellulaires et intracellulaires.....	48
Figure 17 Prédiction des structures des populations des Vibrionaceae isolées à partir de différentes fractions d'eau et de tissus d'huître pendant 2 saisons	49
Figure 18 Mécanismes d'inhibition de l'actine par la toxine cholérique MARTXvc (RtxA).....	58
Figure 19 Schéma des systèmes de sécrétion membranaire des bactéries à Gram négatif	59
Figure 20 Mécanismes d'échappement/résistance à la phagocytose.....	62
Figure 21 Structure modifié du lipide A chez <i>V. cholerae</i> El Tor	63
Figure 22 Cycle enzymatique de l'alkylperoxyde réductase AhpCF	67
Figure 23 Réaction enzymatique des enzymes antioxydantes SOD, Ahp et catalase.	68
Figure 24 Schéma des transporteurs des métaux chez les bactéries à Gram négatif.	73
Figure 25 Quantification des <i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32 et LMG20 012T dans l'hémolymphe des huîtres après 6 heures et 24 heures de balnéation.	180
Figure 26 Imagerie intravitale d'une huître infectée avec <i>V. crassostreae</i> LGP8.....	182
Figure 27 Cytotoxicité des mutants LGP32 Δ phospholipase (VS_II0149) et Δ pvtV/inhA (VS_II1062).	184
Figure 28 Cytotoxicité de <i>V. crassostreae</i> J2-9 Δ R5-7.	197
Figure 29 Intéraction <i>V. crassostreae</i> J2-9/hémocytes in vivo avec ou sans de la protéine R5-7-GFP.	198
Figure 30 Quantification de la cytotoxicité de LGP32 et J2-9 après inhibition des caspases	199
Figure 31 Carte du plasmide pMRB-HC <i>gfp</i>	223
Figure 32 Schéma représentant le montage pour l'imagerie intravitale	232

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Ligands des TLR découvert chez l'homme et la souris et leur localisation cellulaire	21
Tableau 2 Gènes codant pour des hémolysines, phospholipases, protéases et systèmes de sécrétion chez LGP32, LMG20 012T, J2-9 et J2-8.....	185
Tableau 3 Souches bactériennes.....	221
Tableau 4 Plasmides.....	222
Tableau 5 Programmes et mélanges réactionnel des PCR.....	226

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'ostréiculture représente une part importante de la production conchylicole mondiale avec 4,5 millions de tonnes d'animaux produits en 2010. L'huître creuse *Crassostrea gigas* représentant à elle seule un tiers de la production mondiale (FAO 2012). La production Française a atteint 125 000 tonnes en 2015, ce qui représente les trois quarts de la production d'huître Européenne (CNC 2015).

L'ostréiculture Française a subi plusieurs crises successives au cours du XXème siècle principalement dues à des épisodes infectieux. L'huître native européenne *Ostrea edulis* fut cultivée en Europe jusqu'au XXème siècle. Cependant les élevages ont subi deux épisodes de mortalités massives en 1968 et 1980 dus à l'infection par les parasites *Marteilia refringens* infectant le système digestif (Alderman 1979) et *Bonamia ostrea* infectant les cellules immunitaires de l'huître, les hémocytes (Comps 1979). Afin de palier à l'insuffisance de la production d'huître *Ostrea edulis*, l'huître portugaise *Crassostrea angulata* fut introduite en France à partir de 1860. Toutefois cette espèce fut elle aussi décimée suite à "la maladie des branchies" causée par un iridovirus dans les années 1970 (Comps 1976) qui causa sa disparition des côtes Française. Afin de relancer l'ostréiculture Française, l'huître creuse *Crassostrea gigas* fut introduite à partir de 1970. Elle représente aujourd'hui la première espèce conchylicole cultivée en France.

Au cours des quinze dernières années, les élevages de l'huître *C. gigas* ont à leur tour subi des évènements de mortalités massives. C'est pourquoi en 2005 un programme de recherche national appelé MoRest (pour Mortalités Estivales) a été lancé afin de comprendre cette pathologie. Les conclusions de ce programme ont montré que les épisodes de mortalités dépendaient de plusieurs facteurs environnementaux, de l'état physiologie et de la génétique des huîtres ainsi que de la présence de microorganismes pathogènes (Samain et al. 2007). Depuis 2008, ces épisodes de mortalités se sont accrus : ils touchent essentiellement les juvéniles et apparaissent dès que la température de l'eau de mer dépasse les 16°C. L'impact de la présence de microorganismes pathogènes est aujourd'hui clairement démontré. La plupart des travaux sur les pathogènes ont été effectués sur la côte atlantique, région de production ostréicole la plus importante en France. Un virus Herpes appelé OsHV-1 (Segarra et al. 2010, Segarra et al. 2014) a été systématiquement retrouvé dans les huîtres moribondes au cours des épisodes de mortalités. Particulièrement, un nouveau variant OsHV-1 μ var, a été découvert à partir de 2008 pouvant participer à l'aggravation de la maladie. Ce virus est aujourd'hui considéré comme nécessaire à la maladie. De plus, une grande diversité de bactéries du genre *Vibrio* appartenant au clade Splendidus a également été associée au syndrome de mortalité des juvéniles. Au sein de ce clade, des souches pathogènes des populations

Vibrio tasmaniensis et *Vibrio crassostreae* ont été retrouvées positivement associées aux huîtres durant le syndrome de mortalité (Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b, Lemire et al. 2014, Bruto et al. 2017). Ces vibrios, qui ont très vraisemblablement des opportunistes, contribuent de manière significative à la mortalité. En effet, les traitements antibiotiques diminuent significativement le syndrome (Petton et al. 2015b).

L'ensemble de ces études a permis une meilleure connaissance du syndrome de mortalité des huîtres juvéniles. Toutefois, les voies d'infections, le poids relatif de chaque pathogène, de la génétique de l'hôte, et les mécanismes cellulaires et moléculaires de leurs interactions avec l'huître restent très largement inconnus.

La caractérisation des processus pathogènes a essentiellement été faite jusqu'ici sur une souche de *V. tasmaniensis* isolée en 2004 par l'équipe de Frédérique Le Roux (Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b). Les travaux de notre laboratoire ont montré que la souche pathogène *V. tasmaniensis* LGP32 était capable d'entrer dans les cellules immunitaires de l'huître, les hémocytes, et de survivre à la phagocytose. L'entrée du vibrio dans les hémocytes est une étape indispensable à sa virulence (Duperthuy et al. 2010, Duperthuy et al. 2011). Depuis 2014 une nouvelle population pathogène, *Vibrio crassostreae*, a été identifiée comme étant spécifiquement associée aux huîtres durant les mortalités en Atlantique (Lemire et al. 2014). La virulence des *V. crassostreae* dépend de la présence d'un plasmide et d'un îlot génomique (Bruto et al. 2017). Toutefois les mécanismes de virulence des *V. crassostreae* sont encore méconnus.

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons aux mécanismes d'interaction au sein des différentes populations de vibrio pathogène du clade Splendidus. Le focus a ainsi été mis sur deux populations pathogènes du clade Splendidus, les *V. tasmaniensis* et les *V. crassostreae*, afin de comprendre si ces populations pathogènes induisent la mort des huîtres à travers des mécanismes de virulence similaires, ce qui s'apparenterait à une convergence fonctionnelle, ou au contraire si elles induisent la mort des huîtres à travers une diversité de mécanismes.

Le premier chapitre de cette thèse présente une revue de la littérature de ces dernières années, (1) d'une part la biologie de l'huître et de ses mécanismes de défenses, et (2) d'autre part sur les mécanismes de virulence et de résistance au système immunitaire des vibrios.

Le second chapitre permet d'exposer les résultats obtenus aux cours de ma thèse, il est construit en deux sections :

La section A porte sur la souche *Vibrio tasmaniensis* LGP32, pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes de l'huître. Elle décrit à l'échelle moléculaire et cellulaire ses processus

pathogènes : mécanismes de cytotoxicité dépendants de la phagocytose et le rôle des mécanismes de survie intracellulaire dans la cytotoxicité et la virulence de LGP32.

La section B élargit l'étude aux populations pathogènes de vibrios. Elle présente les résultats sur la diversité des mécanismes de lyse des cellules immunitaires entre les populations *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* du clade Splendidus.

Le troisième chapitre de cette thèse est consacré à une discussion générale et à la proposition de perspectives pour poursuivre l'étude de la diversité des interactions des vibrios pathogène du clade Splendidus et l'hôte *C. gigas*.

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I :RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1 L'huître *Crassostrea gigas*

1.1 Biologie, morphologie et anatomie de *C. gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve, lamelibranche, faisant partie de la famille des *Ostreidae* au sein des Lophotrochozoaires. Originare d'Asie, on retrouve cette espèce en Amérique ainsi qu'en Europe et en Australie à la suite d'introductions par l'homme (FAO 2012). L'huître est un animal sédentaire de la zone intertidale, exposé à d'importantes fluctuations de salinité et de température ainsi qu'à de nombreux pathogènes et toxiques apportés par le bassin versant et l'activité des hommes en milieu marin côtier.

1.1.1 Anatomie

Son corps mou est protégé par une coquille de carbonate de calcium constituée de deux valves. On les distingue comme la valve supérieure et la valve inférieure, la première étant plus ou moins plate et la seconde concave. Les valves sont reliées par un ligament élastique au niveau de la charnière ainsi qu'au niveau du **muscle adducteur** (Figure 1). L'élasticité du ligament tend à l'éloignement de la valve plate vis à vis de la valve creuse alors que muscle adducteur permet leur fermeture.

Le corps de l'huître est en contact avec la coquille via **le manteau**, tissu producteur de la coquille. Il est constitué de deux lobes reliés au niveau de la zone dorsale près de la charnière (Figure 1). Les bords du manteau suivent les contours des deux valves de la coquille, l'espace libre compris entre les deux lobes forme ainsi la cavité palléale. Le manteau est une fine couche de tissu conjonctif, de muscle et de nerf recouvert par une couche unicellulaire. Le bord du manteau se termine par trois bourrelets aux rôles distincts. Il joue un rôle dans la sécrétion de la coquille et possède des tentacules sensoriels pouvant provoquer la fermeture des deux valves.

Les branchies sont constituées de quatre feuillets qui partent des palpes labiaux jusqu'au-dessus du muscle adducteur (Figure 1). Les feuillets sont formés par des repliements transversaux appelés plicae, eux-mêmes formés par des filaments tubulaires constitués d'un épithélium cilié supporté par un squelette chitineux. Outre leur rôle dans la respiration, les branchies permettent également le tri des particules en suspension pour la nutrition via le battement de cils vers les palpes labiaux.

La bouche de l'huître est précédée par deux palpes labiaux permettant l'assimilation des aliments vers l'œsophage puis vers l'estomac, lui-même entouré par une glande digestive. Elle est formée de nombreux tubules créant un réseau qui entoure l'ensemble du **tube digestif** de l'œsophage à l'intestin (Figure 1). Les tubules de la glande digestive communiquent avec l'estomac situé entre l'œsophage et l'intestin. Les fèces issues de la digestion des aliments sont éliminées par l'anus situé à côté du muscle adducteur.

Les huîtres possèdent un **système circulatoire** dit semi-ouvert. En effet, le sang de l'huître, appelé hémolymphe, n'est pas confiné aux veines, artères, sinus et au cœur mais peut s'infiltrer dans les tissus contrairement au système circulatoire fermé des vertébrés. L'hémolymphe est incolore et intervient dans le transport d'oxygène et des nutriments. Elle joue également un rôle important dans l'immunité et contient des cellules circulantes immuno-compétentes, les hémocytes (Bachere et al. 2004). L'hémolymphe est "pompée" par un cœur constitué d'un ventricule et de deux oreillettes au sein d'une cavité péricardique située contre le muscle adducteur. Le cœur propulse l'hémolymphe par les artères et les sinus puis vers les tissus. Elle est ensuite envoyée vers les branchies pour être finalement renvoyée au cœur. Le **rein** assure rôle de système d'excrétion. Il est formé par des structures tubulaires à côté de la cavité péricardique et du muscle adducteur (Figure 1).

L'ensemble des tissus de l'huître est maintenu par un tissu conjonctif appelé tissu de Leydig. Il est formé par des cellules et une matrice extracellulaire. Il entoure les organes, maintient la structure du corps de l'animal et est un lieu de stockage des réserves de glycogène de l'huître particulièrement à côté de la paroi de l'intestin et autour des tubules de la glande digestive (Galtsoff 1964).

1.1.2 Physiologie

L'huître est un animal hermaphrodite protandre ce qui signifie qu'elle est de sexe mâle la première année puis devient femelle. Mais l'huître est également un animal ectotherme (Galtsoff 1964), c'est à dire que sa température corporelle varie avec celle du milieu, et ses fonctions physiologiques dépendent ainsi de la température extérieure. La gonade est l'organe qui est à l'origine de la formation des gamètes. Elle recouvre la glande digestive, mais sa structure dépend également du cycle de reproduction et diffère selon les saisons. Le cycle de gamétogénèse implique le stockage de réserve d'énergie pour la production et la différenciation des gamètes. L'épithélium germinal reste indifférencié durant l'hiver, la durée de cette période varie selon la localisation géographique et la température. Lorsque la température augmente au printemps, l'épithélium germinal se développe et les gamètes sont produites massivement juste avant la ponte (Galtsoff 1964). Enfin, l'huître est un organisme osmotolérant qui s'adapte à la salinité de son milieu, par

conséquent la variation de la salinité a un impact sur sa physiologie (Knowles et al. 2014).

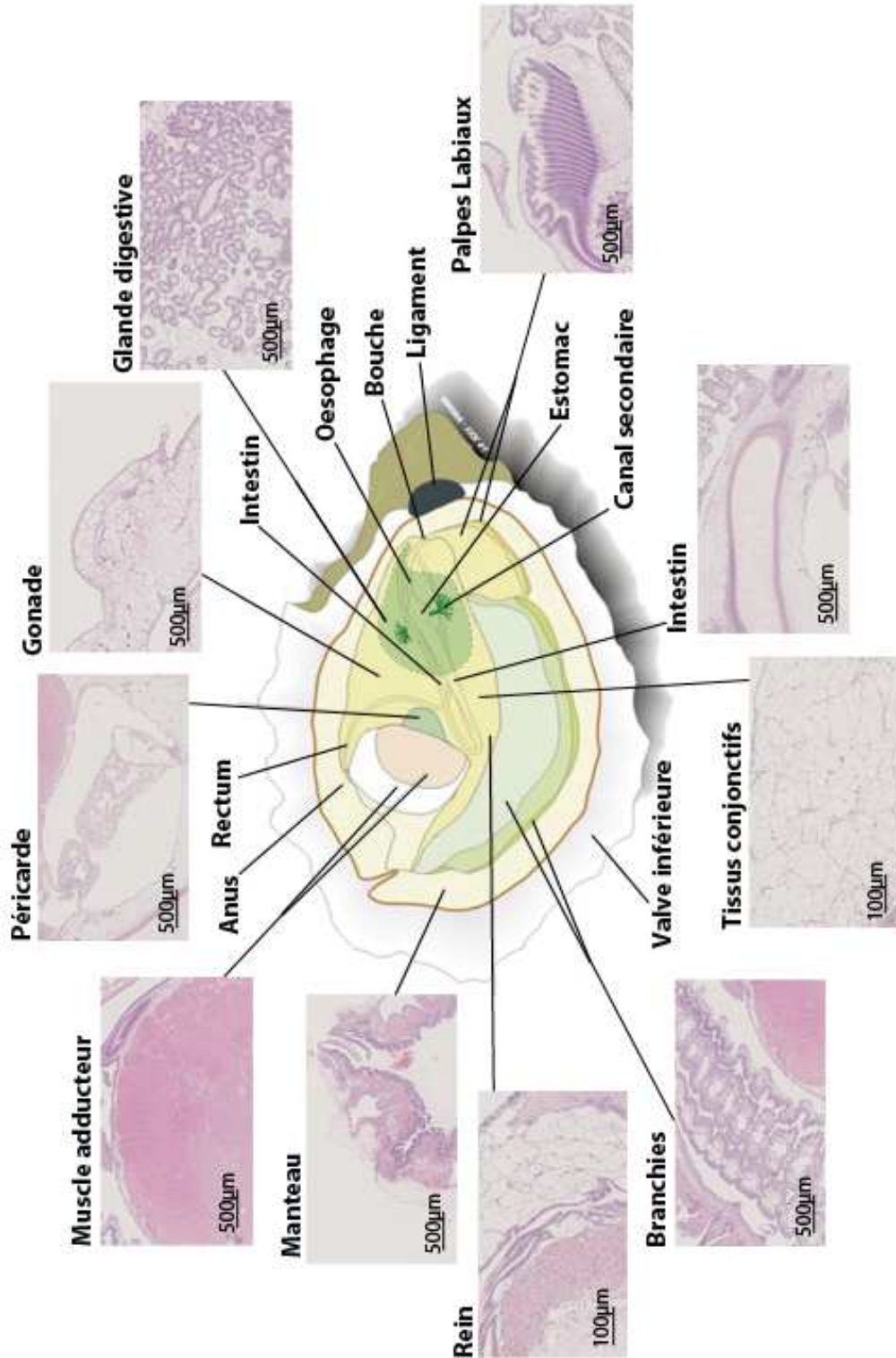


Figure 1 | Anatomie de l'huître *C. gigas* et coupe histologique de ses tissus

Schéma de l'anatomie de l'huître *Crassostrea gigas* adapté de Miossec, Le Deuff et Goulletquer 2009. Chaque organe est associé à une coupe histologique longitudinale colorée à l'hématoxyline et réalisée au laboratoire dans le cadre de ma thèse.

1.2 L'immunité innée chez *C. gigas*

L'huître *C. gigas* est un organisme filtreur continuellement en interaction avec une multitude de microorganismes provenant de la colonne d'eau ou du microbiote associé aux épithéliums et à l'hémolymphe (Gay et al. 2004b, Segarra et al. 2010, Lemire et al. 2014, Lokmer and Wegner 2015). En effet, contrairement au sang des vertébrés, l'hémolymphe de l'huître n'est pas stérile et héberge un microbiote qui peut varier d'un individu à l'autre en fonction de la température ou d'une infection (Lokmer and Wegner 2015). Les tissus de l'huître contiennent des bactéries du genre *Vibrio* à la fois pendant et en dehors des périodes de mortalités (Wendling et al. 2014, Lokmer et al. 2016a). C'est pourquoi l'huître doit mettre en place un système de défense complexe pour reconnaître et répondre de manière appropriée aux pathogènes, tout en maintenant l'homéostasie en présence des microorganismes du microbiote. Comme tous les invertébrés, l'huître possède un système immunitaire qui s'apparente à l'immunité innée des vertébrés. L'immunité de l'huître implique une réponse médiée par les cellules circulantes de l'hémolymphe appelées hémocytes mais également par une production d'effecteurs immunitaires par les épithéliums de différents organes (Bachere et al. 2015).

Si par le passé de nombreuses découvertes ont été réalisées par des approches classiques descriptives en histologie et cytologie ainsi que par des approches de biochimie pour la purification d'effecteurs moléculaires, les avancées récentes des connaissances sur la réponse immunitaire de l'huître reposent très largement sur des approches basées sur la génomique et la transcriptomique. Les évolutions des technologies NGS et le séquençage du génome de l'huître (Zhang et al. 2012a) ont permis d'identifier *in silico* de nombreux gènes impliqués dans l'immunité de l'huître. Plusieurs d'entre-eux ont pu être caractérisés notamment des effecteurs et des gènes des voies immunitaires dont la plus emblématique, la voie Nf- κ B (Green et al. 2015)(Zhang et al. 2011d).

1.2.1 Les tissus immunitaires de *C. gigas* : les hémocytes et les épithéliums

L'hémolymphe est impliquée dans le transport de nutriment et d'oxygène mais elle est aussi au cœur de l'immunité de *C. gigas*. Elle est composée de plasma liquide et de cellules circulantes appelées hémocytes. Ces cellules ne sont pas cantonnées aux sinus et aux veines. Le système circulatoire semi ouvert de l'huître promeut la capacité des hémocytes à migrer vers les tissus. Les hémocytes participent à la réparation des tissus et sont les cellules immunocompétentes de l'huître. Ils ont la capacité de reconnaître le non-soi par l'intermédiaire de nombreux récepteurs immunitaires et il existe une sous-populations de phagocytes professionnels (Bachere et al. 1991) et certains

hémocytes sont capables de s'agréger de manière spontanée (Bachere et al. 1988). Les hémocytes sont capables de migrer vers les tissus infectés par chimiotactisme et éliminer l'agent pathogène en sécrétant des composés microbicides tels que des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), des peptides antimicrobiens, des enzymes hydrolytiques, du lysozyme ou en relargant des pièges extracellulaires d'ADN (NETs) contenant des histones antimicrobiennes (Schmitt et al. 2012b, Destoumieux-Garzon et al. 2014, Bachere et al. 2015) (Figure 2 et 4).

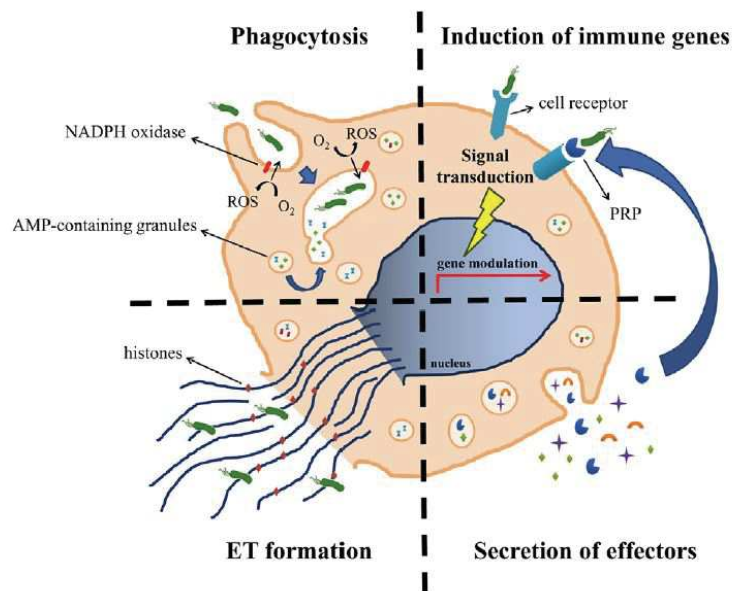


Figure 2 | Schéma des différentes fonctions de l'hémocytes de l'huître *C. gigas*

Après reconnaissance du pathogène l'hémocyte peut le tuer par phagocytose à l'aide d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), d'enzymes hydrolytiques et de lysozyme. Il peut également piéger et tuer le pathogène avec des pièges d'ADN associés à des histones et des peptides antimicrobiens. D'après Bachère et al 2015.

Dès le début des années 1970 des études sur plusieurs espèces d'huîtres ont essayé de classifier les différents types cellulaires selon de nombreux critères tels que leur ultrastructure, leur morphologie et leurs fonctions biologiques. Les hémocytes ont tout d'abord été classés en deux groupes en fonction de la présence ou de l'absence de granules dans leur cytoplasme : d'une part les granulocytes, pourvus de granules et d'autre part les agranulocytes, dépourvus de granules (Bachere et al. 2015). Cette classification a été affinée en 1999 et l'on distingue deux populations hémocytaires sans granule, les cellules blast-like et les hyalinocytes, ainsi qu'une population avec granule, les granulocytes (Bachere et al. 1988, Hine 1999, Bachere et al. 2004, Aladaileh et al. 2007). Au sein des hyalinocytes sont présents des phagocytes professionnels qui représentent entre 30 et 40% de la population totale des hémocytes (Bachere et al. 2015). Les granulocytes sont subdivisés en deux groupes. Les granulocytes basophiles avec des granules clairs et les granulocytes éosinophiles avec des granules denses aux électrons (Hine 1999). Certains auteurs émettent l'hypothèse que les différents types cellulaires correspondent en réalité à différents stades de développement de la

cellule allant des cellules blast-like vers les hyalinocytes puis les granulocytes (Bachere et al. 2015) (Figure 3). Néanmoins, une étude contradictoire de 2016 sur *C. gigas* propose une autre classification en fonction de la quantité du contenu cytoplasmique et du ratio nucléo-cytoplasmique (Jiang et al. 2016). En effet, il n'existe toujours pas à l'heure actuelle de consensus sur la classification des populations hématocytaires et une caractérisation moléculaire des types hématocytaires semble nécessaire afin de définir les différentes populations dans des lignages cellulaires et des stades de maturation distincts comme cela est le cas aujourd'hui pour de nombreuses espèces animales modèles.

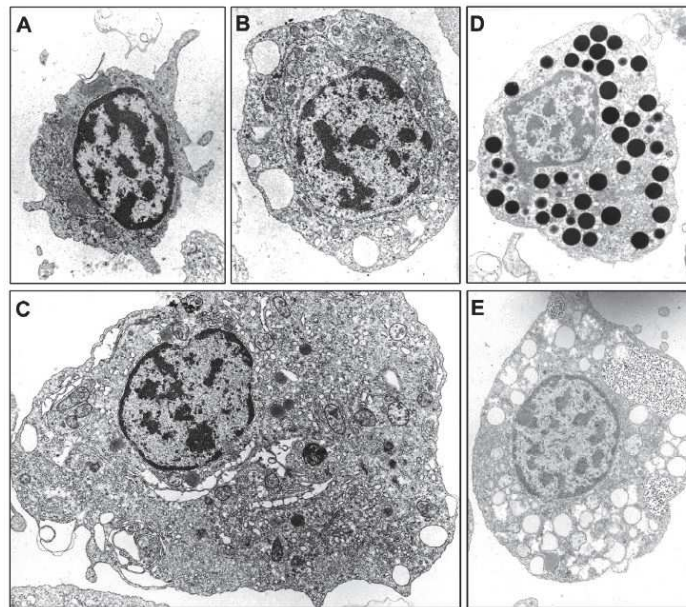


Figure 3 | Les différentes populations d'hémocytes en microscopie électronique à transmission

(A) Probablement un hémocyte jeune de petite taille ; (B) Hyalinocyte ; (C) Grand Hyalinocyte (D) granulocyte avec des granule dense aux électrons ; (E) Granulocytes avec des granules clairs avec probablement des résidus de phagocytose. D'après Bachère et al 2004

L'hématopoïèse est le processus de génération des cellules du sang dans le système circulatoire et les tissus. Les tissus hématopoïétiques restent inconnus à ce jour chez l'huître. Afin d'identifier l'origine des hémocytes, une étude sur *C. gigas* a suivi l'expression des 4 gènes *cg-timp*, *cg-EcSOD*, *cg-tal* et *drac3* spécifiquement exprimés par les hémocytes et considérés comme des marqueurs de ces cellules. Le gène *cg-tal* fait partie de la famille des tal1/SCL nécessaires à l'hématopoïèse chez les vertébrés. Or la localisation de l'expression du gène *cg-tal* suggère que les cellules hématopoïétiques dérivent de cellules endothéliales des veines et des artères (Tirape et al. 2007). Toutefois une autre étude utilisant un marquage par incorporation du bromo-desoxy-uridine pour identifier les cellules en prolifération a suggéré la présence de cellules précurseurs d'hémocytes à la base de l'épithélium de la branchie qui serait le site de l'hématopoïèse pour les auteurs (Jemaa et al. 2014, Pila et al. 2016). Une étude plus récente vient appuyer le rôle de la branchie dans

l'hématopoïèse car l'expression d'un facteur de transcription hématopoïétique dans la branchie augmente suite à l'infection par un *V. splendidus* (Li et al. 2017).

Au-delà des hémocytes, un certain nombre d'études ont montré que les épithéliums exprimaient des récepteurs et des effecteurs de l'immunité. Ils représentent l'une des premières barrières pour protéger l'hôte contre les micro-organismes de l'environnement. Il a été montré que *C. gigas* possède des récepteurs de reconnaissance du non-soi exprimés dans les épithéliums du manteau de la branchie et de la glande digestive (Itoh and Takahashi 2008). Les épithéliums synthétisent également des enzymes hydrolytiques (Itoh and Takahashi 2007, Itoh et al. 2010a) et des peptides antimicrobiens (Gueguen et al. 2006, Gonzalez et al. 2007b). Plusieurs études ont prouvé la présence de lysozyme au niveau de la glande digestive mais également au niveau du manteau (Matsumoto et al. 2006, Itoh and Takahashi 2007, Xue et al. 2010, Amaro et al. 2015). Du lysozyme a également été retrouvé dans le plasma (Itoh and Takahashi 2007). Parmi les peptides antimicrobiens, les défensines sont exprimées de manière constitutive dans le manteau (Gueguen et al. 2006). De même, les transcrits du peptide antimicrobien *CgBPI* ont été détectés dans de nombreux épithéliums tels que le manteau, la branchie, le tube digestif, la glande digestive et la gonade (Gonzalez et al. 2007b). Ces études suggèrent que les épithéliums en contact avec le milieu extérieur jouent un rôle important dans les défenses contre les pathogènes en sécrétant des peptides antimicrobiens qui vont agir en synergie à leurs surfaces (Figure 4) (Schmitt et al. 2012a). Etant donné que les épithéliums de la glande digestive et du manteau sont une source importante de composés microbicides et qu'ils sont exposés aux microorganismes de l'intestin et du milieu extérieur, on peut supposer qu'ils jouent un rôle majeur dans les premières lignes de défense contre les pathogènes.

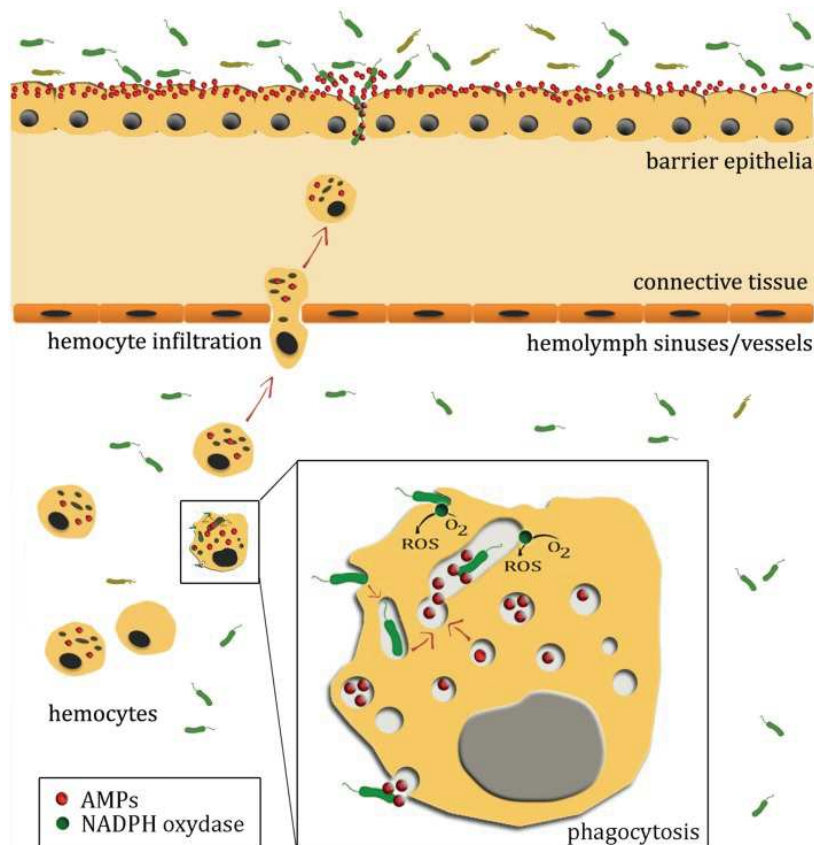


Figure 4 | Illustration schématique des tissus immunitaires de l'huître *C. gigas*

Les épithéliums sont en contact avec un microbiote très abondant. Chez une huître saine, ils représentent la première barrière de défense et contribuent à l'élimination des pathogènes en produisant des peptides antimicrobiens (AMP). Après une blessure ou une infection, des hémocytes s'infiltrent dans les tissus et apportent des AMP qui vont agir en synergie avec ceux produits par les épithéliums. Les microorganismes qui se trouvent dans les tissus sont phagocytés par les hémocytes qui utilisent, entre autres, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour dégrader le pathogène. D'après Schmitt et al 2012.

1.2.2 Molécules de reconnaissance du non soi

L'huître *C. gigas* possède un système immunitaire inné dont la première étape est la reconnaissance des pathogènes via des motifs moléculaires associés nommés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) et des motifs moléculaires associés aux dommages tissulaires appelés DAMPs (Damage-associated molecular patterns). Les principaux PAMPs bactériens reconnus par le système immunitaire sont les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, les acides lipoteichoïques des bactéries à Gram positif, mais aussi la flageline et le peptidoglycane. On retrouve également des PAMPs fongiques comme le β -1-3-glucane ou viraux comme des glycoprotéines de surface, l'ADN extracellulaire et l'ARN double brin (Mogensen 2009). Parmi les DAMPs on peut citer l'acide urique, les double brins d'ADN génomique et les protéines hsp (Heat-shock proteins) (Kono and Rock 2008). La reconnaissance est médiée par des récepteurs et des protéines cellulaires ou solubles avec des motifs de reconnaissance appelés PRP (Pattern Recognition Protein) et PRR

(Pattern recognition receptor). Le séquençage du génome a montré que les familles de gènes impliquées dans les défenses de l'huître avaient été l'objet d'expansion génétique chez l'huître (Zhang et al. 2012a). Plusieurs PRR ont pu être identifiés *in silico* chez l'huître *C. gigas* grâce à l'évolution des approches génomiques (Green et al. 2015).

Parmi eux, les **TLR** (Toll-like receptors) font partie des récepteurs les mieux caractérisés chez les vertébrés à ce jour. Chez les vertébrés les ligands des TLR sont particulièrement bien connus (voir tableau 1) (Kumar et al. 2011, Kawasaki and Kawai 2014). Une étude de 2015 a montré que les TLR sont très répandus dans le génome de l'huître, suggérant une grande diversité fonctionnelle. Le génome code 83 gènes de TLR dont 19 sont exprimés suite à une infection par un *Vibrio*, une autre bactérie ou un virus (Zhang et al. 2015). A ce jour 6 TLR (*CgToll-1*, *CgTLR1*, *CgTLR2*, *CgTLR3*, *CgTLR4*, *CgTLR6*) ont été caractérisés chez *C. gigas*. Ils ont été localisés au niveau de la membrane et de l'endosome tardif mais peu de leurs ligands ont été identifiés (Zhang et al. 2011a, Zhang et al. 2013). Toutefois, il a été montré récemment que le *CgTLR6* était capable de lier des bactéries à Gram négatif et positif ainsi que le LPS et le peptidoglycane (Wang et al. 2016).

Tableau 1 | Ligands des TLR découvert chez l'homme et la souris et leur localisation cellulaire

Adapté de Kumar et al 2011 et Kawasaki et al 2014

TLR	Localisation cellulaire	Ligands	Organismes
TLR1	Surface de la cellule	Lipoprotéine, peptidoglycane, acide lipotechoïque, zymosan, mannan, tGCI-mucine	Humain/Souris
TLR2	Surface de la cellule	Lipoprotéine, peptidoglycane, acide lipotechoïque, zymosan, mannan, tGCI-mucine	Humain/Souris
TLR3	Endosome	ARN double brin viral, petit ARN interférant, ARN dérivé des dommages de la cellule	Humain/Souris
TLR4	Surface de la cellule/Endosome	Lipopolysaccharide (LPS)	Humain/Souris
TLR5	Surface de la cellule	Flagelline	Humain/Souris
TLR6	Surface de la cellule	Lipoprotéine, peptidoglycane, acide lipotechoïque, zymosan, mannan, tGCI-mucine	Humain/Souris
TLR7	Endosome	ARN simple brin viral, ARN bactérien de streptococcus du groupe B, analogue de la purine	Humain/Souris
TLR8	Endosome	ARN viral et bactérien, analogue de la purine	Humain/Souris
TLR9	Endosome	ADN double brin viral et bactérien riche en motif CpG	Humain/Souris
TLR10	Surface de la cellule	Collabore avec le TLR2 dans la reconnaissance de ligand de listéria.	Humain
TLR11	Endosome	Flagelline, UPEC (unknown proteinaceous component of uropathogenic <i>E. coli</i>), profiline de toxoplasma gondii	Souris
TLR12	Endosome	profiline de toxoplasma gondii	Souris
TLR13	Endosome	ARNr 23S	Souris

Les **RLR** (Rig-like receptors) sont des senseurs antiviraux cytoplasmiques. Le génome de l'huître code pour 12 RLR (Zhang et al. 2015). Chez les vertébrés deux types de récepteurs essentiels de la réponse antivirale, RIG-I et MDA5, ont été décrits. RIG-I détecte les ARN double brins intracellulaire de petite taille (<300pb) alors que MDA5 lie les ARN double brins de grande taille (>1000pb) (Reikine et al. 2014). Le génome de *C. gigas* code 11 RIG-1 putatifs (Zhang et al. 2015). Un RLR appelé *CgRIGI* (pour Retinoic acid-inducible gene I) a été caractérisé chez *C. gigas* en 2014. Son expression peut être augmentée suite à l'injection de poly I:C (qui mime les ARN double brins viraux) mais également de PAMPs bactériens comme le LPS et le peptidoglycane. Son rôle dans l'immunité antivirale reste à spécifier (Zhang et al. 2014b).

Les membres de la famille des **C1q** sont des éléments de la voie du complément chez les vertébrés. Le système du complément possède divers rôles comme l'opsonisation, la reconnaissance du non-soi, l'induction de l'inflammation ainsi que des activités antimicrobiennes (Nonaka and Yoshizaki 2004). Les protéines contenant un domaine C1q (C1qDC) sont extrêmement nombreuses dans le génome de l'huître avec 321 gènes codant pour ces protéines. Mais parmi elles, une seule possède le domaine collagène typique des vertébrés (Zhang et al. 2015). Leurs tailles et leurs structures sont très variables. Les gènes codant les C1qDC peuvent avoir une taille allant de 600 pb à plus de 10000 pb. Un grand nombre d'entre eux sont exprimés de manière constitutive et tissu-spécifique. La glande digestive et la branchie sont les deux organes où l'expression de C1qDC est la plus forte (173 dans la glande digestive, 73 dans la branchie, 5 dans les hémocytes et 5 dans le manteau) (Gerdol et al. 2015). Chez l'huître, il a été montré que les C1qDC peuvent jouer le rôle d'opsonine et ainsi faciliter la phagocytose de *V. splendidus* alors que d'autres possèdent directement une activité antibactérienne (He et al. 2011, Jia et al. 2015). Plus récemment, une analyse transcriptomique suggère la présence d'un système du complément chez l'huître *C. gigas*. Les auteurs identifient des homologues de protéines associées au complément ainsi qu'un homologue du composé C3 (*CgC3*) qui joue un rôle central dans l'activation du complément chez les vertébrés (Wang et al. 2017c). D'autres rôles non immunitaires des C1qDC ont été identifiés chez l'huître notamment dans la biominéralisation de la coquille (Arivalagan et al. 2017) suggérant une diversification des fonctions des C1qDC chez *C. gigas*.

Les C1qDC ne sont pas les seules lectines qui ont la capacité de reconnaître les PAMPs. Plusieurs types de lectines ont été découvertes chez *C. gigas* parmi lesquelles on trouve les gicalines, les ficolines, les galectines et les **lectines de type C**, elles aussi hautement diversifiées chez l'huître (Tasumi and Vasta 2007, Yamaura et al. 2008, Jia et al. 2015, Li et al. 2015, Wang et al. 2017b). Li et ses collaborateurs ont montré qu'une lectine de type C appelée *rCg-Lec2* était capable de lier des PAMPs tels que le peptidoglycane, le LPS et dans une moindre mesure le mannane ainsi que les

bactéries *V. splendidus* et *V. anguillarum*. Le gène *cg-lec2* est surexprimé lors d'une infection par *Vibrio splendidus*, facilite la phagocytose par les hémocytes et pourrait jouer un rôle dans le système du complément (Li et al. 2015). Chez *C. gigas*, les lectines de type C ont été associées à une réponse immunitaire efficace à *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al. 2011).

Les **intégrines** sont des récepteurs jouant un rôle important dans la reconnaissance. Elles sont connues pour être impliquées dans la phagocytose chez l'huître (Terahara et al. 2006). Une étude de 2015 a montré que l'intégrine recombinante *rCg-integrin* liait le LPS (Jia et al. 2015). Par ailleurs, les travaux de l'équipe ont montré que des β -intégrines étaient impliquée dans l'internalisation du pathogène intracellulaire *V. tasmaniensis* LGP32 via la reconnaissance de l'opsonine plasmatique, la super oxyde dismutase extracellulaire *Cg-EcSOD* (Duperthuy et al. 2011).

D'autres PRP/PRR ont été identifiés chez l'huître notamment 6 protéines de reconnaissance du peptidoglycane (**CgPGRP**) (Itoh and Takahashi 2008, Iizuka et al. 2014, Yang et al. 2017), deux protéines de reconnaissance des β -1,3-glucanes (**Cg- β GBP-1** et **Cg- β GBP-2**) (Itoh et al. 2010b), la superoxyde dismutase extracellulaire Cu/Zn (**Cg-EcSOD**) qui lie le LPS (Gonzalez et al. 2005) et certaines porines bactériennes (Duperthuy et al. 2011) ainsi que 4 NLR (Nod-likereceptors) connus pour reconnaître des PAMPs bactériens anormalement présent dans le cytoplasme chez les vertébrés (Zhang et al. 2015).

1.2.3 Signalisation et communication

La reconnaissance du non-soi va activer des voies de signalisation cellulaire qui vont induire une réponse immunitaire adéquate afin de contrôler les microorganismes et assurer le maintien de l'homéostasie. Grâce au séquençage du génome de l'huître, plusieurs éléments des voies de signalisation ont pu être identifiés par homologie de séquence avec les vertébrés (Zhang et al. 2012a, Green et al. 2015, Zhang et al. 2015).

Plusieurs voies impliquées dans l'immunité antibactérienne ont pu être identifiées chez l'huître *C. gigas*, notamment la mieux décrite à ce jour, la voie Nf- κ B. Le génome de l'huître code 20 éléments de cette voie (Zhang et al. 2012a) dont plusieurs ont été caractérisés ces dernières années. Parmi ces éléments, on trouve un homologue du facteur de transcription Nf- κ B (*CgREL/Nf- κ B*) et deux inhibiteurs de Nf- κ B (*CgI κ B1*, *CgI κ B2*) dont l'activité inhibitrice a été démontrée. D'autres gènes associés à Nf- κ B ont été identifiés notamment des protéines adaptatrices MyD88, TRAF, ECSIT et Cactus (Escoubas et al. 1999, Gueguen et al. 2003, Montagnani et al. 2004, Montagnani et al. 2008, Zhang et al. 2011d). Parmi les récepteurs potentiellement capables d'activer la voie, des TLR (cf 1.4.2) et deux TNF-R (tumor necrosis factor receptor) ont pu être décrits chez *C. gigas* (Sun et al. 2014).

L'expression des gènes *cgREL/Nf- κ B*, *cgI κ B* et *myd88* est modulée après stimulation avec des PAMPs microbiens, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle dans la réponse antimicrobienne (Tirape et al. 2007, Green and Montagnani 2013, Zhang et al. 2013). L'activation de la voie Nf- κ B entraîne une expression d'une série d'effecteurs de l'immunité. Une étude a montré qu'un inhibiteur de métalloprotéinase (*Cgtimp*) pourrait être régulé via la voie Nf- κ B chez *C. gigas* (Montagnani et al. 2001, Montagnani et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'un micro ARN (*miR-2d*) pouvait favoriser la phagocytose de *V. splendidus* et diminuer l'apoptose en ciblant le gène *cgI κ B2* (Chen et al. 2016b).

Green et Montagnani ont exploré la réponse antivirale chez l'huître et ont montré *in silico* l'implication de gène homologue à la voie JAK/STAT. Ils suggèrent également l'existence d'une voie interféron chez l'huître *C. gigas* (Green et al. 2015). La réponse interféron a pourtant longtemps été considérée comme une spécificité des vertébrés car les génomes d'invertébrés comme celui de la drosophile ne codent pas pour l'interféron et ses effecteurs (Loker et al. 2004). Chez les vertébrés, les cellules produisent de l'interféron après reconnaissance d'acide nucléique viral comme les doubles brins d'ARN (Green et al. 2015). La liaison de l'interféron (IFN) avec les récepteurs associés va induire une transduction du signal par la voie JAK/STAT et la transcription de gènes stimulés par l'interféron (Green et al. 2015). Chez l'huître, plusieurs senseurs et molécules de signalisation ont pu être identifiés *in silico* dans le génome tels que les Toll-like receptors (TLR), les récepteur RIG-like (RLR), les facteurs de régulation de l'interféron (IRF) et des stimulateurs de l'interféron. On retrouve également des gènes stimulés par l'interféron tels qu'une synthétase (OAS), la protéine Mx, la viperine et ADAR-L (Figure 5) (Green et al. 2015). Plusieurs de ces gènes sont induits chez *C. gigas* après injection de poly I:C (Green and Montagnani 2013). Plus récemment, une nouvelle protéine IFN-like (*CgIFNLP*) a également été identifiée chez *C. gigas*. Cette protéine interagit avec le récepteur *CgIFNLR-3* et active des éléments de la voie JAK/STAT (Zhang et al. 2016).

Les voies d'activation de programme de mort cellulaire tels que l'apoptose et l'autophagie ont également été identifiées chez l'huître *C. gigas* (Green et al. 2015). Les gènes codant pour le système de l'apoptose sont hautement conservés chez les mollusques (Zhang et al. 2011b). Parmi ces gènes, on retrouve notamment des inhibiteurs de l'apoptose et des caspases (Zhang et al. 2011b, Qu et al. 2014, Sun et al. 2014). Toutefois le rôle de l'apoptose dans l'immunité des invertébrés a été peu étudié.

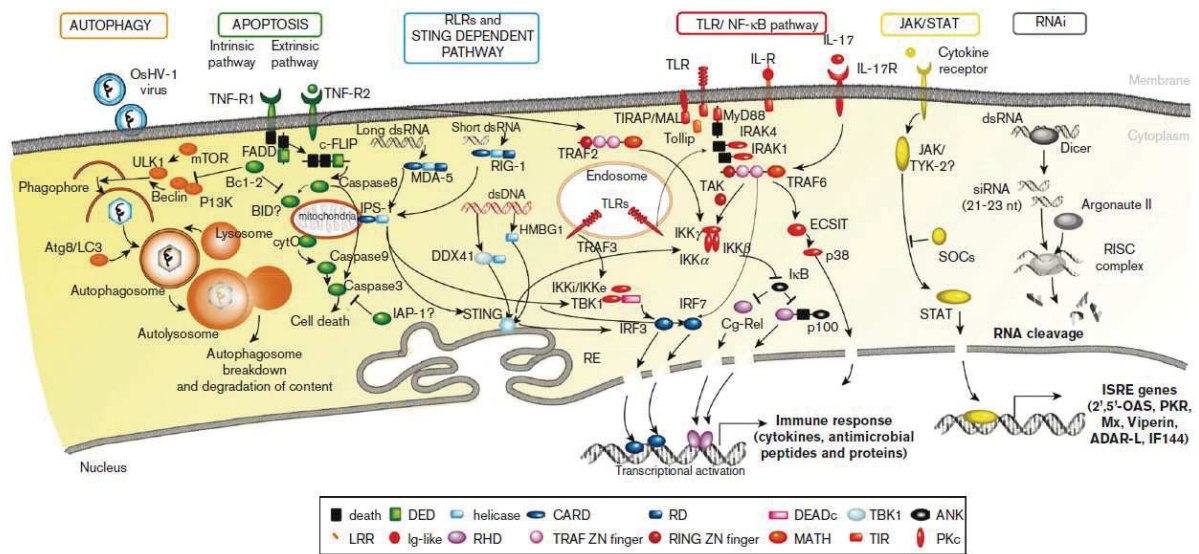


Figure 5 | Voie immunitaires conservées chez l'huître *C. gigas*

Ce schéma a été construit à l'aide d'une identification des séquences conservées au sein du génome de l'huître (Zhang et al 2012). Certaines interactions entre les composants de ces voies sont déduites de la littérature sur les vertébrés et les insectes et restent à élucider chez l'huître. Les domaines protéiques sont indiqués : TIR, Toll/IL 1 receptor; immunoglobulin ; DD, death domain ; LRR, Leucine rich repeat ; TM, transmembrane ; PKc, protein kinase ; RHD, rel homology domain; IPT, immunoglobulin-like fold, plexin, facteurs de transcription; RING, domaine RING-finger; zf-TRAF, TRAF type zinc finger, meprin et TRAF-C homology domain; UBL-TBK1-like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins. D'après Green et Montagnani 2015.

1.2.4 Mécanismes effecteurs de l'immunité

1.2.4.1 La phagocytose

La phagocytose est un processus de l'immunité innée qui permet l'ingestion de particules étrangères par des cellules spécialisées dont la fonction première est la détection et l'élimination de pathogènes (Prix Nobel Elie Metchnikov 1908). Cette réponse cellulaire hautement conservée au travers du règne vivant a été très bien décrite chez les vertébrés. Lors de la phagocytose le microorganisme est reconnu via des récepteurs de phagocytose puis internalisé par invagination de la membrane plasmique grâce à une réorganisation locale du cytosquelette d'actine-F et l'activité de moteurs moléculaires de type myosines favorisant la formation de pseudopodes autour du microorganisme. La reconnaissance des microorganismes peut-être soit directe via certains récepteurs de phagocytose appartenant aux PRR, soit indirecte via le mécanisme d'opsonisation des microorganismes par des protéines de l'hôte qui sont solubles et présentes dans les liquides biologiques, facilitant ainsi la phagocytose. Puis la membrane plasmique finit par fusionner autour de la particule afin de former une vacuole intracellulaire appelée phagosome (Flannagan et al. 2012, Freeman and Grinstein 2014). Le phagosome va ensuite subir une phase de maturation correspondant à une série de modifications via des échanges successifs avec différents

compartiments vésiculaires comme différents types d'endosomes et des lysosomes aboutissant à la formation d'un phagosolysosome possédant différentes activités antimicrobiennes et de dégradation des particules phagocytées. Différents stades de maturation du phagosome ont été caractérisés et sont définis comme le phagosome précoce, le phagosome intermédiaire, le phagosome tardif et le phagolysosome (Figure 6)(Flannagan et al. 2009). Au fur et à mesure de la maturation du phagosome, le lumen va devenir de plus en plus acide suite à l'acquisition de V-ATPase à sa membrane qui viennent enrichir en protons le contenu du phagosome. Celui-ci va également s'enrichir en espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS) via des systèmes enzymatiques dédiés, et s'enrichir en activité de type protéases et hydrolases, en métaux tels que le cuivre et le zinc et en peptides antimicrobiens (Flannagan et al. 2012). Le dernier stade de maturation, le phagolysosome, est un environnement hautement toxique pour les microorganismes qui résulte de la fusion avec les lysosomes et se caractérise par un pH très acide (pH<4.5) et une forte concentration en enzymes hydrolytiques.

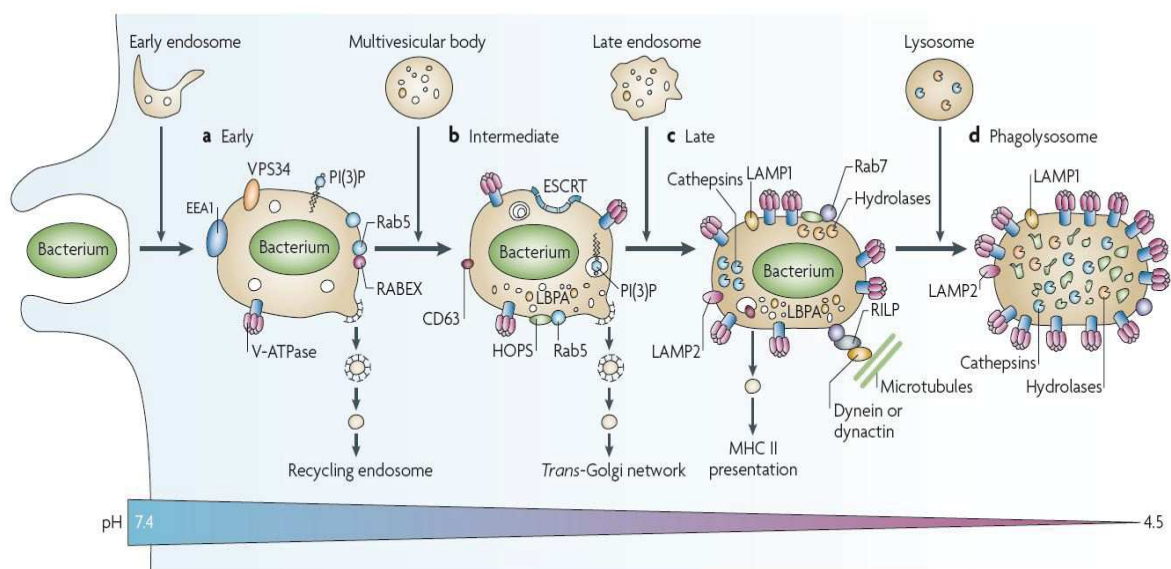


Figure 6 | Maturation du phagosome

La bactérie est internalisée ce qui induit la formation du phagosome précoce. Ce phagosome va subir des modifications successives par fusion avec des vésicules et des lysosomes et par acquisition de nombreux composés microbicides. Il subit également une acidification du lumen par accumulation de V-ATPase. Par Flannagan et al 2009.

Chez l'huître *C. gigas*, la phagocytose a été décrite en 1991 par Bachère et ses collaborateurs. Les auteurs ont montré qu'une partie des hémocytes se comportent comme des phagocytes professionnels capables de phagocyter des particules de zymosan (particules de β -glucan) et cela induit un burst oxydatif correspondant à une production forte et rapide d'espèces réactives de l'oxygène (Bachere et al. 1991, Poirier et al. 2014). Les phagocytes professionnels de l'huître correspondent à une sous-population particulière parmi les hyalinocytes (Bachere et al. 2015). Chez

l'huître peu de récepteurs de phagocytose ont été caractérisés, néanmoins, il a été démontré que la reconnaissance des microorganismes par les phagocytes peut se faire via les β -intégrines (Terahara et al. 2006). Par ailleurs, la protéine majoritaire du plasma, la *Cg-EcSOD*, peut jouer le rôle d'une opsonine permettant par exemple la reconnaissance du vibrio LGP32 par les β -intégrines et favorisant l'internalisation du pathogène par phagocytose (Duperthuy et al. 2011). D'autres gènes impliqués dans la phagocytose ont été identifiés dans le génome de *C. gigas* tels que *cgPI3K*, *cgRho J*, *cgMAPKK*, *cgRab 32* et *cgNADPH oxydase*. L'expression de ces gènes augmente suite à l'injection de *V. splendidus* (Zhang et al. 2014a). L'ensemble de ces données ainsi que l'identification de vibrio pathogènes capables d'inhiber la phagocytose comme *V. aesturianus* (Labreuche et al. 2006) ou de résister une fois internalisé comme *V. tasmaniensis* LGP32 (Duperthuy et al. 2011, Vanhove et al. 2015, Vanhove et al. 2016) montrent que la phagocytose joue un rôle majeur dans l'immunité de *C. gigas*.

1.2.4.2 Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des petites molécules hautement toxiques impliquées dans la défense contre les pathogènes. Les ROS représentent une part importante du pouvoir microbicide du phagosome. Chez l'homme, plusieurs complexes enzymatiques producteurs de ROS sont décrits notamment 5 NADPH oxydase (NOX1-NOX5) ainsi que deux enzymes membranaires les Dual oxydases (DUOX1-DUOX2) (Lambeth 2004).

La NADPH oxydase est un complexe protéique qui se forme soit au niveau de la membrane plasmique soit au niveau de la membrane du phagosome après reconnaissance de PAMPs par la cellule. Elle catalyse l'oxydation de NADPH en NAD^+ ainsi que la formation de l'ion superoxyde (O_2^-). Une autre enzyme, une superoxyde dismutase (SOD) intraphagosomale convertit l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Par la suite le peroxyde d'hydrogène est utilisé à son tour par une myéloperoxydase pour former de l'hypochlorite (HOCL) qui est hautement toxique pour les microorganismes (Figure 7) (Donaghy et al. 2012).

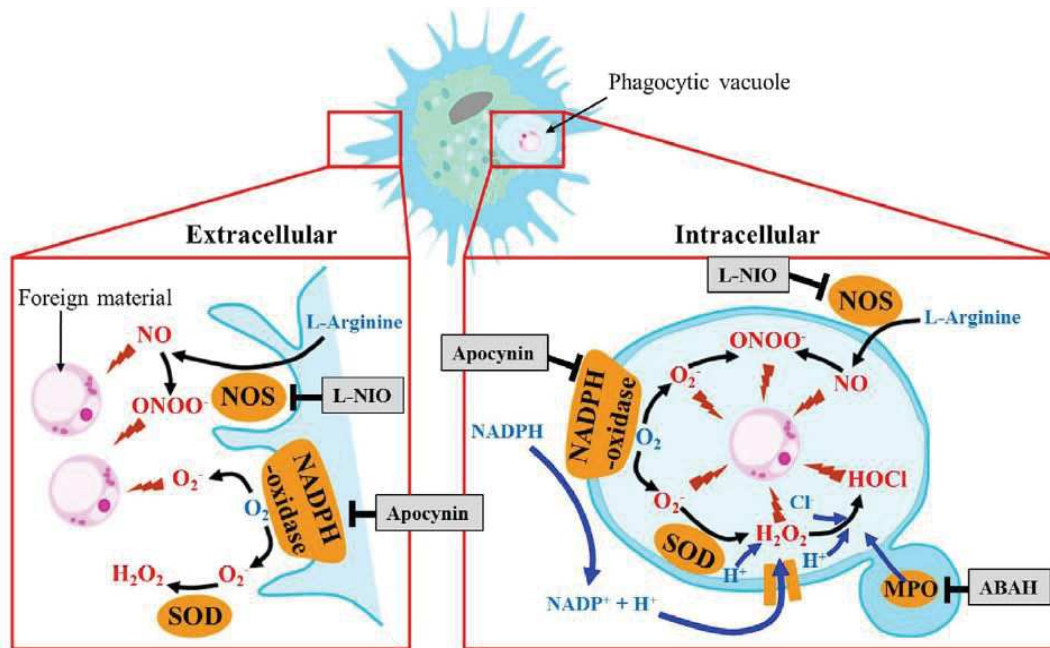


Figure 7 | Production de ROS/RNS au niveau extracellulaire et intracellulaire par un hémocyte de bivalve

Les enzymes sont en orange : NADPH oxydase, nitrite oxyde synthase (NOS), super oxydedismutase (SOD), myelopéroxydase (MPO). Les encarts gris indiquent les drogues pouvant inhiber l'activité de chaque enzyme. D'après Donaghy et al 2012.

Une part des effets cytotoxiques de O_2^- et de H_2O_2 est due à leur capacité à réagir dans le phagosome avec d'autres produits microbicides et générer d'autres ROS. Le peroxyde d'hydrogène peut favoriser la production d' OH^\bullet , particulièrement toxique, en réagissant avec O_2^- ou avec des métaux tels que le cuivre (Cu^{2+}) et le fer (Fe^{2+}) via les réactions successives de Haber-Weiss et Fenton (Birben et al. 2012). Par ailleurs, l'ion O_2^- peut réagir avec l'hypochlorite (HOCl) et former le radical OH^\bullet ainsi que de l'oxyde nitrique NO^\bullet qui est aussi catalysé par la synthase d'oxyde nitrique (NOS) (Robinson 2008). L'oxyde nitrique peut subir des conversions spontanées ou catalysées et donner lieu à la formation d'espèces réactives de l'azote (RNS) tels que le dioxyde d'azote (NO_2), le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) et le trioxyde de diazote (N_2O_3) (Flannagan et al. 2009).

Les ROS/RNS peuvent causer des dommages aux protéines, aux lipides mais l'une des cibles principales est l'ADN (Birben et al. 2012). En effet, les ROS/RNS oxydent les bases notamment la guanine, ce qui peut être mutagène, et créer des cassures sur les brins d'ADN qui peuvent s'avérer létales pour le microorganisme (Imlay 2008, Fang 2011). L'ensemble des ROS et des RNS exercent un effet fortement toxique de manière synergétique sur le microorganisme dans le phagosome.

Le génome de *C. gigas* code des gènes homologues à des NOX et DUOX (Fleury et al. 2009). Des études montrent que ces gènes jouent un rôle majeur dans la réponse antimicrobienne de l'huître *C. gigas*. En effet, Il a été montré que deux expositions successives de *C. gigas* à *V. splendidus* induisent l'expression du gène *cgNADPH oxydase* et de manière significativement plus élevée durant

la seconde exposition (Zhang et al. 2014a). De plus, l'expression d'un gène DUOX-like chez les hémocytes est associée à une réponse efficace de la part de *C. gigas* face aux vibrios pathogènes *V. aesturianus* et *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al. 2011).

Toutefois la production de ROS/RNS peut s'avérer toxique pour la cellule elle-même et pour l'ensemble de l'organisme. C'est pourquoi les cellules possèdent plusieurs enzymes détoxifiantes pour éviter ou réparer les dégâts causés par les ROS/RNS. Parmi elles on retrouve notamment les catalases, les peroxydases et les superoxyde dismutases (SOD) qui sont les plus étudiées chez l'huître. Chez les eucaryotes, il existe 3 catégories de SOD qui sont les SOD à cuivre/zinc exprimées en extracellulaire ou dans le cytoplasme (Tainer et al. 1982), les SOD à manganèse mitochondriales (Borgstahl et al. 1992) et les SOD exprimées dans la matrice extracellulaire (Folz and Crapo 1994). Le génome de l'huître *C. gigas* code pour une Cu/Zn-SOD extracellulaire (*Cg*-EcSOD) produite par les hémocytes qui a pu être caractérisée comme étant la protéine majeure du plasma (Gonzalez et al. 2005, Jo et al. 2008, Park et al. 2009).

Des études ont montré que les vibrios pathogènes *V. aesturianus* et *V. tasmaniensis* LGP32 sont capables d'inhiber la production de ROS par les hémocytes de l'huître (Labreuche et al. 2006, Duperthuy et al. 2011). Ces résultats et la présence d'enzyme NOX, DUOX et SOD dans le génome de l'huître suggèrent que la production de ROS est un élément majeur de la réponse immunitaire de *C. gigas*.

1.2.4.3 L'homéostasie des métaux

1.2.4.3.1 L'homéostasie du cuivre et du zinc

Les métaux tels que le cuivre, le zinc, le fer et le manganèse sont des composés indispensables pour les cellules car ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et sont des cofacteurs de nombreuses enzymes. C'est pourquoi maîtriser l'homéostasie des métaux est particulièrement crucial. Ceci l'est d'autant plus que le cuivre et le zinc peuvent s'avérer toxiques lorsque leur concentration est importante notamment à cause de leur pouvoir oxydant. Le rôle de ces métaux dans l'immunité est discuté depuis plusieurs années mais les mécanismes mis en jeu dans le phagosome sont encore peu décrits et n'ont jamais pu être mis en évidence chez l'huître *C. gigas*. Plusieurs études ont prouvé l'accumulation des métaux dans le phagosome chez les vertébrés (Soldati and Neyrolles 2012). En effet, Wagner *et al.* ont analysé la composition en sel et en métaux au sein du phagosome et montré que le TNF (Tumor necrosis factor) et IFN- γ (Interféron γ) induisent une accumulation de cuivre et de zinc 24h après la phagocytose dans les macrophages ayant internalisé *Mycobacterium tuberculosis* (Wagner et al. 2005a, Wagner et al. 2005b). De plus, il a été

démontré que l'accumulation de zinc co-localise avec *M. tuberculosis* dans le phagosome (Botella et al. 2011). De plus, la chélation du cuivre permet d'augmenter la capacité de survie en intracellulaire de *S. enterica* (Achard et al. 2012), soulignant le rôle antimicrobien majeur de ce métal dans l'activité microbicide du phagolysosome.

Le cuivre. Le cuivre est un métal qui possède deux états d'oxydation dans des conditions physiologiques, le Cu(I) et le Cu(II) (Neyrolles et al. 2015). C'est pourquoi le cuivre est utilisé par les organismes vivant notamment au niveau de certaines enzymes telles que les Cu/Zn-SOD et l'oxydase du cytochrome C, composant clef des systèmes antioxydants et de la respiration (Tainer et al. 1982, Festa and Thiele 2011). Toutefois, le cuivre est rarement libre dans la cellule car il est toxique lorsqu'il est en excès, tout particulièrement sous son état d'oxydation Cu(I). La résistance au Cu(I) dépend de sa séquestration par des protéines liant le cuivre mais aussi de son oxydation par des oxydases sous sa forme Cu(II) moins toxique (Hodgkinson and Petris 2012). Cette toxicité est due à plusieurs mécanismes concomitants. Tout d'abord, le cuivre réagit avec les ROS dans le phagosome notamment avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ce qui provoque la formation du radical hydroxyle (OH^\cdot) via la réaction de Fenton (Hodgkinson and Petris 2012, Neyrolles et al. 2015). Le radical hydroxyle est une espèce hautement réactive qui peut altérer de nombreuses molécules comme les lipides de la membrane, les protéines et l'ADN. Un autre mécanisme de toxicité est la destruction de la structure des protéines. En effet, le cuivre réagit avec les polypeptides par la réaction de Biuret et peut également provoquer l'exclusion de cofacteurs métalliques comme le fer de leurs ligands. Ce processus déstructure ainsi les protéines avec des groupements fer-soufre (Macomber and Imlay 2009).

L'influx du cuivre dans les cellules eucaryotes se fait à l'aide de transporteurs ayant une affinité pour le cuivre. Le transporteur de la membrane plasmique CTR1 (copper transport protein) est responsable de l'entrée du cuivre dans le cytoplasme (Figure 8 et 10) (Lee et al. 2002b). Un second transporteur CTR2 possède des similarités de séquence avec CTR1 et promeut également l'entrée du cuivre par la membrane plasmique. Les 2 transporteurs CTR1 et CTR2 sont localisés au niveau de la membrane plasmique et CTR2 au niveau de l'endosome et du lysosome (Bertinato et al. 2008, Wang et al. 2011). Le surplus de cuivre est séquestré par des métallothionéine du cytoplasme afin d'éviter un effet toxique du cuivre sur la cellule (Tapia et al. 2004). De plus, une fois le cuivre dans le cytoplasme, des protéines chaperonnes ont pour rôle de gérer le trafic intracellulaire du cuivre : la protéine Cox17 apporte le cuivre à l'oxydase du cytochrome C (Glerum and Tzagoloff 1997), la protéine CCS délivre le cuivre à la SOD1 (Culotta et al. 1997) alors que ATOX1 délivre le cuivre aux transporteurs appelés ATP7a et ATP7b (copper-transporting ATPase) (Pufahl et al. 1997). Les transporteurs de cuivre ATP7 sont des ATPases localisés au niveau de la membrane plasmique, du

réseau trans du Golgi et du phagosome (Figure 8 et 10) (Lutsenko et al. 2007). White et ses collaborateurs ont montré que l'INF- γ augmentait l'expression de CTR1, induisait l'entrée du cuivre dans la cellule et stimulait le transfert d'ATP7a du Golgi vers le phagosome (White et al. 2009). Une étude plus récente a montré que ATP7a était nécessaire à l'accumulation du cuivre dans le phagosome et à la résistance de la souris face au pathogène *Salmonella typhimurium* (Ladomersky et al. 2017). Le transporteur ATP7a permet également la détoxification du cuivre en présence de forte concentration en l'exportant du cytoplasme vers le milieu extérieur (Cobbold et al. 2003).

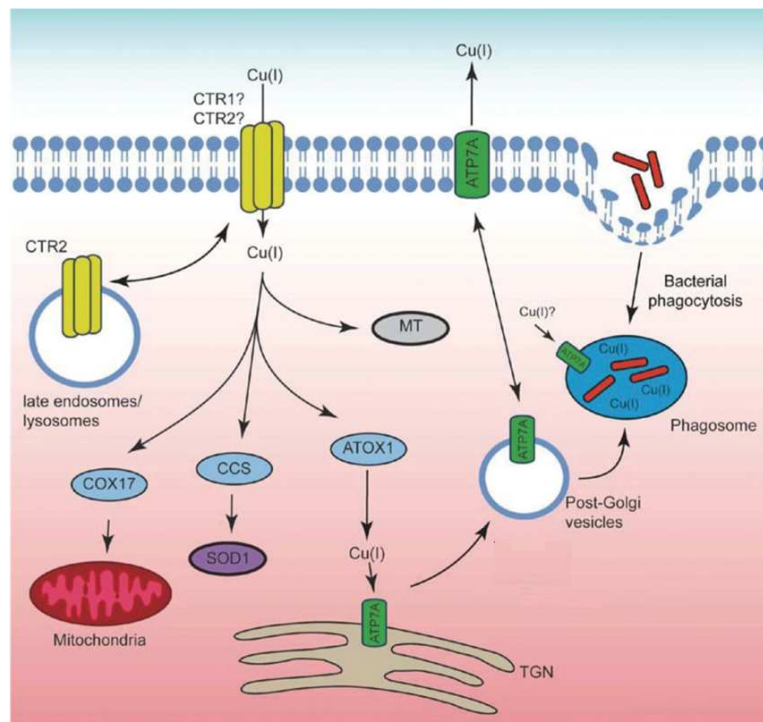


Figure 8 | Transport du cuivre dans la cellule

Le cuivre entre dans la cellule par les transporteurs CTR et va être immédiatement pris en charge par les protéines chaperonnes (COX17, CCS, ATOX1) et les métallothionéines (MT). Le cuivre est envoyé dans les vésicules et le phagosome par les transporteurs ATP7. Adapté de Stafford et al 2013.

Le zinc. Le zinc se trouve sous l'état d'oxydation Zn(II) dans la cellule. Des études ont montré que le Zn(II) est non seulement séquestré par des protéines chaperonnes pour empêcher son utilisation par les pathogènes mais il est aussi utilisé par l'hôte pour son pouvoir antimicrobien (Braymer and Giedroc 2014). Cette toxicité du zinc s'explique par le remplacement d'autres cations essentiels aux enzymes, bloquant ainsi leur activité (Stafford et al. 2013). A cause de sa toxicité, le zinc est hautement régulé dans la cellule et le zinc libre dans le cytoplasme est maintenu à faible concentration. Il peut être stocké dans des organelles intracellulaires, dans des vésicules et est fourni aux enzymes dont le fonctionnement dépend du zinc. Ces processus sont médiés par deux familles de transporteurs à zinc, les protéines Zrt et Irt-like (ZIP, SLC39A) et les transporteurs à Zn (Znt, SLC30A) (Kambe et al. 2015, Kimura and Kambe 2016). Chez les mammifères 14 ZIP et 9 Znt ont été

identifiés. Les transporteurs ZIP ont pour fonction de pomper le zinc du milieu extérieur, du Golgi et des vésicules vers le cytoplasme alors que les transporteurs Znt efflux le zinc du cytoplasme vers les vésicules et le milieu extérieur (Figure 9 et 10). L'excès de zinc est séquestré comme le cuivre par des métallothionéines (Figure 9) (Kambe et al. 2015, Kimura and Kambe 2016). Toutefois, le rôle de ces transporteurs dans les phagocytes est peu connu. Il a été montré que le transporteur Znt1 et les métallothionéines sont exprimés dans des macrophages infectés par *M. tuberculosis* (Botella et al. 2011, Botella et al. 2012).

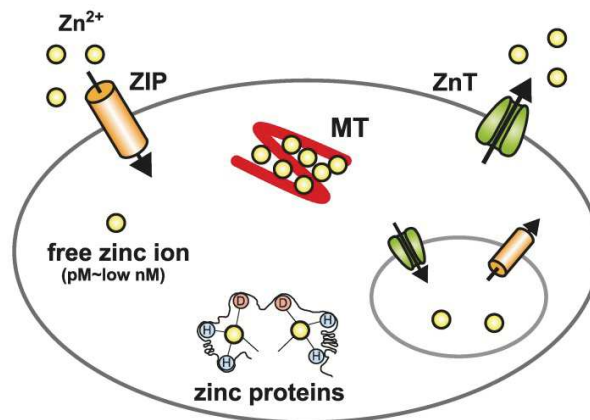


Figure 9 | Homéostasie du zinc dans la cellule

L'influx du zinc dans le cytoplasme se fait par les transporteurs ZIP. Le Zn(II) libre est à très faible concentration dans le cytoplasme car il est séquestré par des métallothionéines (MT) ou associé à des protéines qui ont besoin de zinc pour leur activité enzymatique. Le zinc est efflué par les transporteurs Znt vers les vésicules et le milieu extérieur. Extrait de Kimura et Kambe 2016

Aucun gène codant pour un homologue de transporteur de zinc ou de cuivre n'a été caractérisé fonctionnellement chez *C. gigas*.

1.2.4.3.2 L'homéostasie du fer et du manganèse

Le fer et le manganèse sont des métaux faiblement disponibles et néanmoins cruciaux pour la croissance bactérienne, tout particulièrement pour les bactéries pathogènes intracellulaires qui se livrent à une véritable lutte pour le fer avec le système immunitaire de leurs hôtes. Afin d'appauvrir le milieu phagosomal en fer et en manganèse les phagocytes effluent ces métaux du phagosome vers le cytosol à l'aide du transporteur NRAMP1 ce qui limite la disponibilité du fer pour les bactéries intraphagosomales (Figure 10)(Natural resistance associated macrophage protein). La protéine NRAMP1 participe au transport du fer mais aussi du manganèse. Elle est localisée au niveau du phagosome chez le macrophage humain et chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* alors que NRAMP2 est situé au niveau de l'endosome chez le macrophage humain et au niveau de la vacuole contractile chez *D. discoideum* (German et al. 2013). Une étude récente a montré que les transporteurs NRAMP sont nécessaires à la résistance contre *Franscilla* chez l'amibe *Dictyostelium* (Brenz et al. 2017). Le fer

peut également être efflué du phagosome puis de la cellule par des ferroportines (German et al. 2013). Les ferroportines sont exprimées chez les macrophages infectés par *M. tuberculosis* et sont localisées au niveau du phagosome et de la membrane plasmique (Van Zandt et al. 2008). Le fer peut s'avérer toxique pour la cellule car il est une source de production de radical hydroxyle (OH) par réaction de fenton. Du fait de sa toxicité et de son importance pour les processus biologique, le fer intracellulaire et extracellulaire n'est pas libre mais est complexé à différentes protéines comme la ferritine, la transferrine et la calprotectine (Neyrolles et al. 2015). La protéine calprotectine participe à l'inhibition de la croissance microbienne en diminuant le fer et le manganèse disponible (Nakashige et al. 2015). Le rôle des transporteurs du fer dans l'immunité n'a jamais été exploré chez l'huître *C. gigas*.

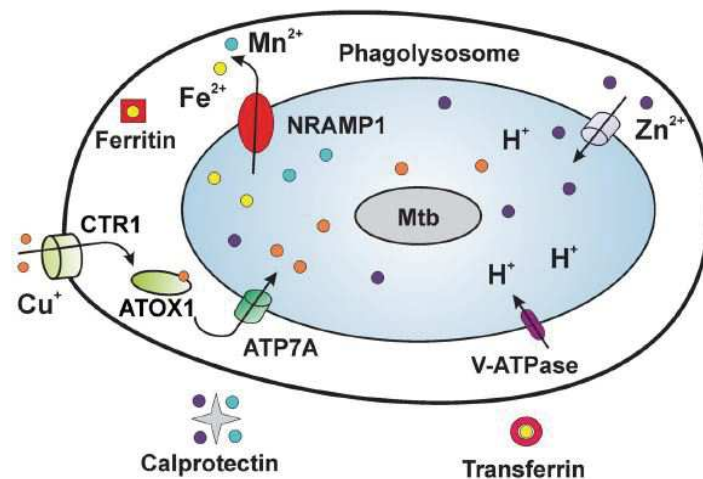


Figure 10 | Schéma résumant l'efflux et l'influx des métaux dans le phagosome de macrophage suite à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

Phagosome de macrophage après internalisation de *M. tuberculosis* (Mtb). Le cuivre est transporté vers la lumière du phagosome grâce au transporteur CTR1, ATP7A et la protéine chaperonne ATOX1. Le zinc est importé par le transporteur ZnT alors que le fer et le manganèse sont efflués via NRAMP1 ou séquestrés par des ferritines, transferrines et calprotectines. D'après Niederweiss et al 2015.

1.2.4.4 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont des effecteurs de l'immunité de taille souvent inférieure à 10kDa. Hydrophobes et cationiques, ils utilisent leur charge électropositive pour initier leur interaction avec les membranes négativement chargées des bactéries. Ils montrent une grande diversité de séquence et de conformation et agissent ainsi par une diversité de mécanismes qui va de la simple perméabilisation membranaire à l'inhibition de voies métaboliques ou de processus vitaux (synthèse de la paroi, transcription, traduction, etc...). Plusieurs d'entre eux ont pu être identifiés chez *C. gigas* par homologie de séquence et conservation de motifs caractéristiques des AMPs. Les AMP d'huître *C. gigas* ont été classés en 5 familles appelées Molluscidine (*Cg*-molluscidin), Défensine

(*Cg-Defm*, -h1 et -h2), Big-défensines (*Cg-BigDef1* à 3), Peptides riche en proline (*Cg-Prp*) et Bactericidal/permeability increasing protein (*Cg-BPI*). La plupart de ces peptides ont des activités antibactériennes et/ou antifongiques.

Bactericidal/permeability increasing protein (*Cg-BPI*)

Un homologue de la protéine humaine BPI a été identifié chez *C. gigas* par criblage d'une librairie d'ADNc d'hémocyte. Il ne s'agit pas d'un peptide mais bien d'une protéine antimicrobienne (50.1 kDa) cationique (*pI*: 9.3) formée de deux domaines. Le gène ***cg-BPI*** (Bactericidal/permeability increasing protein) est exprimé constitutivement dans les épithéliums et est inductible dans les hémocytes suite à une infection (Gonzalez et al. 2007b). La protéine *Cg-BPI* est active sur les bactéries à Gram négatif dont elle lie le LPS et induit une perméabilité membranaire (Gonzalez et al. 2007b). Un second gène codant pour la protéine *Cg-BPI2* a été identifié dans une banque d'ADNc d'hémocytes. Elle partage 56,4% d'identité de séquence avec *Cg-BPI* et aurait pour origine une duplication du gène *cg-BPI* (Zhang et al. 2011c). *Cg-BPI2* est exclusivement efficace contre les bactéries à Gram négatif (Zhang et al. 2011c). Comme pour les BPI humaines, le domaine N-terminal est nécessaire à l'activité antibactérienne (Bachere et al. 2015).

Les défensines

Les **défensines** (*Cg-Def*) sont les AMPs les mieux décrits chez l'huître *C. gigas*. Elles sont de petite taille (4-5 kDa), cationiques (*pI* : 8.5-8.7), et leur structure compacte est maintenue par 4 ponts disulfures intramoléculaires. Trois défensines, nommées *Cg-Defm*, *Cg-Defh1* et *Cg-Defh2*, ont été identifiées par approche génomique. La défensine *Cg-Defm* est exprimée constitutivement dans le manteau de l'huître ; elle est essentiellement active contre les bactéries à Gram positif sur lesquelles elles ont des activités extrêmement puissantes (Gueguen et al. 2006). Les défensines *Cg-Defh1* et *Cg-Defh2* ont toutes deux été identifiées à partir d'ADNc d'hémocyte. Le gène *cg-Defh2* est exprimé constitutivement dans les hémocytes (Gonzalez et al. 2007a). Tout comme *Cg-Defm*, les défensines *Cg-Defh1* et *Cg-Defh2* possèdent principalement une activité contre les bactéries à Gram positif par inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane en se liant à son précurseur, le lipide II (Schmitt et al. 2010). La spécificité d'action des défensines contre les bactéries à Gram positif peut être due à l'accessibilité du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram positif alors que la paroi est cachée par la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif (Bachere et al. 2015).

Les big-défensines

Les **big-défensines** sont des polypeptides antimicrobiens que l'on trouve uniquement chez certaines espèces de mollusques, d'arthropodes et de céphalochrodés. Chez *C. gigas*, les big-

défensines représentent une famille composée de trois membres nommés *Cg-BigDef1* (10.7 kDa), *Cg-BigDef2* (9.8 kDa) et *Cg-BigDef3* (9.7 kDa) (Bachere et al. 2015). Ce sont des polypeptides antimicrobiens cationiques (pI : 8.6-9.2) produits exclusivement par les hémocytes. Ils sont dotés d'un domaine N-terminal globulaire et hydrophobe et d'un domaine C-terminal apparenté aux β -défensines de vertébrés (trois ponts disulfures intramoléculaires). Seules *Cg-BigDef1* et les *Cg-BigDef2* sont inductibles par les vibrios (Rosa et al. 2011). L'expression de *Cg-Bigdef3* serait quant à elle constitutive. Comme pour les α -défensines humaines, cette famille de peptides antimicrobiens est soumise à un fort polymorphisme de nombre de copies et particulièrement à une variation de présence/absence (PAV). Il est ainsi fréquent qu'un des trois membres de la famille ne soit pas présent à l'échelle des génomes individuels (Rosa et al., 2014). Les big-défensines montrent une activité antimicrobienne contre les champignons, les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Delmas et al en préparation).

Les molluscidines

Une autre famille d'AMP appelée **Cg-Molluscidines** a été purifiée à partir de branchies de *C. gigas* (taille : 5.5 kDa, pI : 11.28). La séquence est organisée en 10 répétitions de résidus dibasiques incluant Lysine-Lysine ou Lysine-Arginine séparées par des acides aminés hydrophobes. Elles ne montrent aucune homologie de séquence avec d'autres AMPs. Elles sont actives sur les bactéries à Gram positif et négatif (Seo et al. 2013). Les transcrits des *cg-Molluscidines* ont été retrouvés dans le manteau et la branchie. Néanmoins, les molluscidines pourraient être exprimées par des hémocytes infiltrés dans les tissus (Bachere et al. 2015).

Proline rich peptide (Prp)

Les **peptides riches en proline** (*Cg-prps*) forment un groupe de peptides diverses riches en résidus Proline et Arginine produits par les hémocytes. Chez de nombreuses espèces, les peptides riches en proline n'induisent pas la perméabilisations de la membrane bactérienne mais pénètrent dans le cytoplasme par translocation et perturbent des fonctions cellulaires essentielles (Bachere et al. 2015). Le mécanisme d'action le mieux décrit est le blocage de la traduction (Graf et al. 2017). Chez *C. gigas* des séquences d'ADNc montrent une homologie de leurs séquences avec des Prp. Les *Cg-prp* sont exprimés par les hémocytes (Gueguen et al. 2009). Toutefois, ils ne montrent pas d'activité antimicrobienne seule mais présentent des effets synergiques avec les défensines contre les bactéries à Gram positif et négatif (Schmitt et al. 2012a). Comme les Big-défensines, les PRPs sont soumis au PAV (Bachère et al., communication personnelle).

A ce jour, les peptides antimicrobiens de l'huître *C. gigas* n'ont pas été étudiés pour leurs propriétés antivirales. Toutefois des AMPs avec une activité antivirale ont été caractérisés chez la moule *Mytilus galloprovincialis*. En effet, la myticine C a été identifiée à partir de l'hémolymphe et des hémocytes et montre une activité potentiellement antivirale contre le virus pathogène *OsHV-1* μ Var. En effet l'hémolymphe et la myticine C inhibe la réplication du virus sur les hémocytes de *C. gigas* (Novoa et al. 2016).

1.2.4.5 Les pièges d'ADN extracellulaire (Etose)

Un processus de mort cellulaire appelé NETose (neutrophil extracellular traps) a été identifié pour la première fois en 2004 par Brinkmann *et al* sur des neutrophiles de mammifère (Brinkmann et al. 2004). Les auteurs ont montré que les neutrophiles libéraient, après activation, de l'ADN dans le milieu extracellulaire formant ainsi un réseau de chromatine. De nombreuses protéines antimicrobiennes provenant des granules du neutrophile adhèrent aux pièges d'ADN extracellulaires (NETs). Parmi ces composants antimicrobiens on trouve, entre autres, des histones, des myéloperoxydases, des élastases, des gélatinases, des cathépsines, des protéinases 3 et des lactoferrines (Brinkmann et al. 2004, Delgado-Rizo et al. 2017). Les NETs participent à la réponse immunitaire innée par leurs capacités à lier les pathogènes et empêcher leur dissémination mais aussi par la concentration en agents antimicrobiens permettant la dégradation des facteurs de virulence et des pathogènes (Brinkmann et al. 2004). Il a été montré que les NETs étaient produits en réponse aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aux virus, aux parasites et aux champignons (Delgado-Rizo et al. 2017).

A ce jour, trois types de NEToses sont connues. La première est la NETose suicide qui est la mieux décrite à ce jour. La reconnaissance de PAMPS par un récepteur induit l'activation de la voie des Kinases Raf, MEK et ERK, l'augmentation du calcium cytoplasmique et l'activation du complexe NADPH oxydase. L'élastase et la myéloperoxydase sont transloquées des granules du neutrophile vers le noyau. Puis une perte de l'intégrité de la membrane des granules et du noyau se produit ainsi que la décondensation de la chromatine qui se mélange avec le contenu du cytoplasme. Pour finir, la membrane plasmique perd son intégrité et le neutrophile libère les NETs (Figure 11). Une seconde NETose, appelée NETose vitale, ne nécessite pas la perte de l'intégrité de la membrane nucléaire ni de production de ROS. Il existe également une autre NETose vitale qui permet la libération de l'ADN mitochondriale de manière ROS dépendante (Delgado-Rizo et al. 2017).

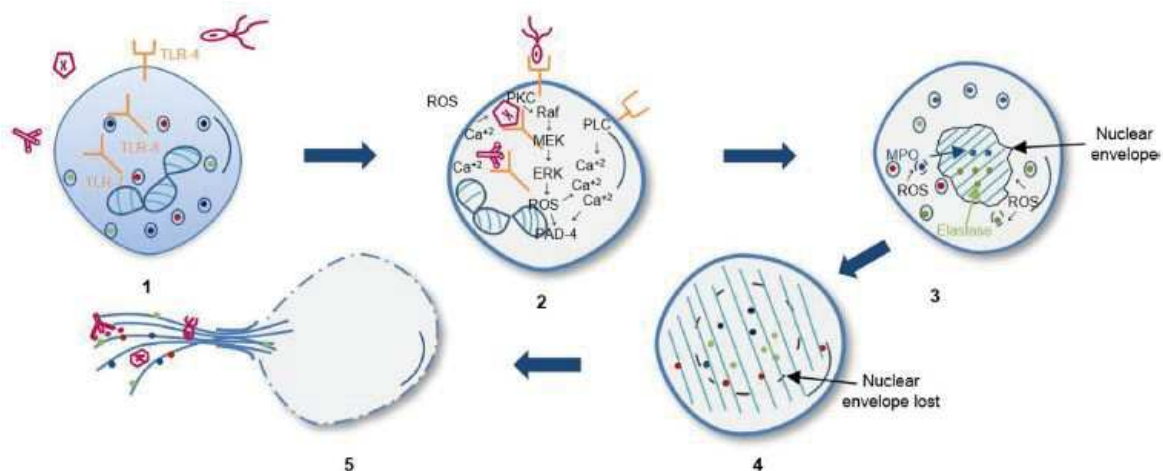


Figure 11 | Différente étape de mort cellulaire par ETose suicide

(1) Reconnaissance de PAMPS par des récepteurs. (2) Activation de la voie des Kinase Raf, MEK et ERK, augmentation du calcium dans le cytoplasme et production de ROS par l'activation de la NADPH oxydase. (3) Translocation de la myéloperoxydase et de l'élastase des granules vers le noyau grâce à la production de ROS. (4) La membrane nucléaire et des granules perdent leurs intégrités et se mélangent dans le cytoplasme. (5) L'ADN est expulsée par la cellule avec les histones et des protéases provenant des granules. Par Delgado-Rizo et al 2017

Le processus de NETose a été mis en évidence chez plusieurs espèces d'invertébrés notamment chez le crabe *Carcinus maenas* et la moule *Mytilus edulis* (Robb et al. 2014) et l'huître *C. gigas* (Poirier et al. 2014). Chez l'huître *C. gigas*, des histones H1 et H5 ayant une activité antimicrobienne sont associées à ces réseaux extracellulaires d'ADN dans lesquels sont piégés les vibrios (Figure 12). Il a été montré que des histones antimicrobiennes sont actives contre les vibrios et qu'elles sont libérées des hémocytes avec leur contenu en ADN en réponse aux ROS. Ainsi, en réponse à l'infection microbienne, les histones antimicrobiennes s'accumulent dans les tissus de l'huître infiltrés par les hémocytes comme les branchies (Poirier et al. 2014). Ces observations suggèrent que les histones extracellulaires jouent un rôle dans la défense antimicrobienne de *C. gigas* via la formation de pièges extracellulaires d'ADN dans un phénomène de mort cellulaire conservé dans le règne animal et appelé ETose (Figure 12) (Brinkmann et al. 2004, Poirier et al. 2014, Robb et al. 2014).

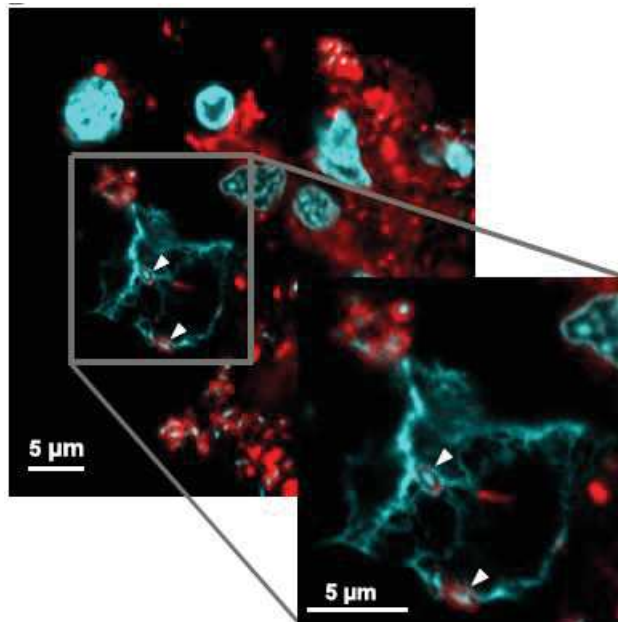


Figure 12 | Les hémocytes d'huître libèrent des pièges d'ADN extracellulaires dans lesquels *V. tasmaniensis* LGP32 est piégé

Les bactéries sont piégées par les ETs comme indiqué par les flèches blanches. Les acides nucléiques ont été marqués au DAPI et les membranes au WGA-TRITC sur une section de 0.2μm d'épaisseur. D'après Poirier et al. 2014.

2 Les vibrioses

2.1 Les vibrios pathogènes

2.1.1 Biologie des vibrios

Les vibrios sont des bactéries à Gram négatif ubiquitaires des environnements aquatiques que l'on retrouve principalement sur les zones côtières, les estuaires et en eau douce. Présents principalement dans les zones tempérées ou tropicales, ils tendent aujourd'hui à progresser vers des latitudes nord (Baker-Austin et al. 2013). Les vibrios sont des bacilles flagellés de forme droite ou incurvée aérobies-anaérobies facultative, cultivables à des températures pouvant aller de 10 à 40°C avec un pH optimal de 7. La plupart des vibrios nécessitent des milieux salins. Ils peuvent vivre sous forme planctonique libre ou sous forme de biofilms. Dans la colonne d'eau, ils sont associés à une grande diversité d'organismes hôtes tels que des algues ou des copépodes. Ainsi, les vibrios peuvent être impliqués dans des symbioses de type pathogène, commensale ou mutualiste (Romalde et al. 2014) (Le Roux 2016). Dans le règne animal, les vibrios sont associés à de très nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés. Certains causent des maladies très graves chez l'homme et les espèces aquacoles. Les vibrios pathogènes pour l'homme incluent principalement *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. En outre, les vibrios sont associées à de très nombreuses maladies en aquaculture à la fois chez les poissons, les crustacés et les mollusques. Parmi eux, on trouve *V.*

anguillarum responsable de septicémie hémorragique chez plus 50 espèces de poissons marins et d'eau douce, *V. nigriculchritudo* pathogène pour la crevette *Litopenaeus stylirostris* ainsi que *V. harveyi* qui induit des mortalités chez l'ormeaux *Haliotis tuberculata* (Goarant et al. 2006, Frans et al. 2011, Cardinaud et al. 2015). D'autres au contraire établissent une relation mutualiste avec leur hôte. C'est le cas de la bactérie luminescente *V. fischeri* et de son hôte le calmar *Euprymna scolopes* dont l'organe lumineux est colonisé par le vibrio (Nyholm and McFall-Ngai 2004, Mandel and Dunn 2016, Schwartzman and Ruby 2016).

2.1.2 Taxonomie des vibrios

Les vibrios font partie de la famille des *Vibrionaceae* qui appartient à la sous-division des γ protéobactéries (Thompson et al. 2001, Thompson et al. 2003). Cette famille comprend une grande diversité d'espèces dont la diversité taxonomique a pu être décrite grâce aux technologies de biologie moléculaire : MLSA (multilocus sequencing analysis) et la FAFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism) (Thompson et al. 2001, Thompson et al. 2003, Thompson et al. 2009). On compte à ce jour 142 espèces réparties dans 7 genres: *Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* et *Vibrio*. Du fait des limitations de la phylogénie sur l'ARN 16S, Sawabe et ses collaborateurs ont défini 14 clades monophylétiques, et plus de 60 espèces de vibrio en développant une analyse MLSA sur 9 gènes de ménage (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* et l'ARN 16s) sur 58 souches (Sawabe et al. 2007). Plus tard, la phylogénie des *vibrionaceae* a été améliorée par Sawabe et ses collaborateurs en utilisant 86 souches de vibrio, 10 génomes de vibrio séquencés et 8 gènes de ménage (Figure 13). Huit nouveaux clades ont pu être identifiés et neuf autres ont été actualisés (Sawabe et al. 2013). Parmi eux, le clade Splendidus contient 12 espèces dont les *Vibrio tasmaniensis* et les *Vibrio crassostreae* qui sont des bactéries associées aux pathologies de l'huître *C. gigas* (Gay et al. 2004b, Lemire et al. 2014, Bruto et al. 2017).

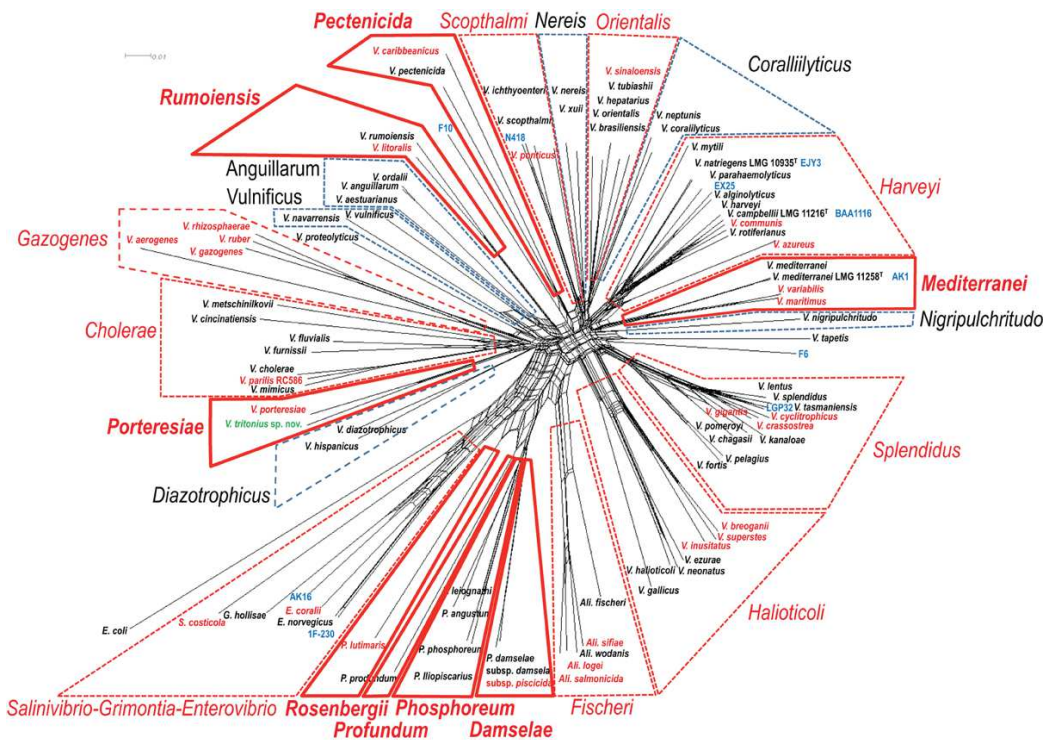


Figure 13 | Arbre phylogénétique des Vibrios.

Phylogénie des vibrios réalisée sur 86 souches, 10 génomes séquencés et 8 gènes de ménage (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* et l'ANR 16s). D'après Sawabe et al 2013

De manière inhabituelle chez les bactéries, les Vibrios possèdent deux chromosomes circulaires. Par rapport au chromosome 2, le chromosome 1 est plus grand et possède davantage de gènes impliqués dans la réparation et la réplication d'ADN, la transcription, la synthèse de la paroi, le métabolisme et la virulence. A l'opposé, le chromosome 2, dont l'origine est plasmidique, contient une fraction plus importante de gènes hypothétiques et de gènes dont les fonctions sont inconnues (Heidelberg et al. 2000).

2.1.3 Les vibrios pathogènes de l'homme

2.1.3.1 *V. cholerae*

L'agent du cholera, *V. cholerae*, est un pathogène humain qui cause des pathologies diarrhéiques. Il existe plus de 200 sérogroupes de *V. cholerae* notamment les souches O139 et O1 responsables des épidémies de cholera. Il existe également des souches non-O1 et non-O139, pathogènes, qui sont impliquées dans des cas de gastroentérites et d'infections intestinales (Kaper et al. 1995). Chez l'homme, la virulence des *V. cholerae* O139 et O1 est associée à l'acquisition d'un phage CTX qui code pour la toxine cholérique (CT) et un îlot génomique qui code pour le facteur de virulence TCP (toxin co-regulated pilus) (Kaper et al. 1995). Suite à la consommation d'aliment ou d'eau contaminée, la bactérie se retrouve dans l'intestin et adhère à la surface de l'épithélium intestinal via le TCP. Suite à l'adhésion *V. cholerae* sécrète des facteurs de virulence. La toxine

cholérique est sécrétée via un système de sécrétion de type II (T2SS). Un récepteur membranaire (GM1) va reconnaître la sous unité P de la CT ce qui induit l'entrée de la toxine par endocytose dans les cellules de l'épithélium intestinal. La vésicule contenant la toxine va fusionner avec le réseau du Golgi. La sous-unité A interagit avec les protéines G. Elles vont cibler la cyclase adénylate qui va convertir l'ATP en cAMP ce qui a pour conséquence la libération des ions du cytoplasme par le transporteur CFTR. Cela entraîne une hypersécrétion d'eau qui est responsable des très fortes diarrhées caractéristiques du cholera (Bharati and Ganguly 2011).

La toxine RtxA, qui fait partie toxine de la famille RTX (groupe des MARTX: pour multifunctional autoprocessing RTX toxins), a également été identifiée comme un facteur de virulence majeur de *V. cholerae* (Satchell 2015). Les toxines RTX (Repeats-in-toxin) se caractérisent par une séquence riche en glycine et en aspartate en C terminal, par un nombre important de site de liaison au Ca^{2+} et par un mode de sécrétion dépendant d'un ABC transporteur (T1SS). La classification des RTX ne dépend pas de leurs modes d'action puisqu'elles peuvent avoir une activité lipase, protéase, interagir avec l'actine ou former des pores membranaires (Linhartova et al. 2010). Chez *V. cholerae*, la toxine RtxA perturbe le cytosquelette d'actine et cause l'arrondissement des cellules de l'hôte (Satchell 2015). La virulence de *V. cholerae* repose également sur la sécrétion d'hémolysines formant des pores membranaires.

Longtemps considéré comme un pathogène extracellulaire, *V. cholerae* est aussi capable de survivre à la dégradation par phagocytose des macrophages et des prédateurs eucaryotes (Ma et al. 2009, Van der Henst et al. 2016). Il a été montré que la bactérie injecte la protéine VgrG dans les macrophages grâce à un système de sécrétion de type VI. Cette protéine perturbe la polymérisation d'actine et bloque la phagocytose. Ce mécanisme nécessite l'entrée de la bactérie dans les cellules de l'hôte (Ma et al. 2009). En 2015, Satchell propose que certaines cellules de *V. cholerae* se sacrifient pour bloquer la phagocytose afin de protéger les bactéries encore extracellulaires (Figure 14) (Satchell 2009).

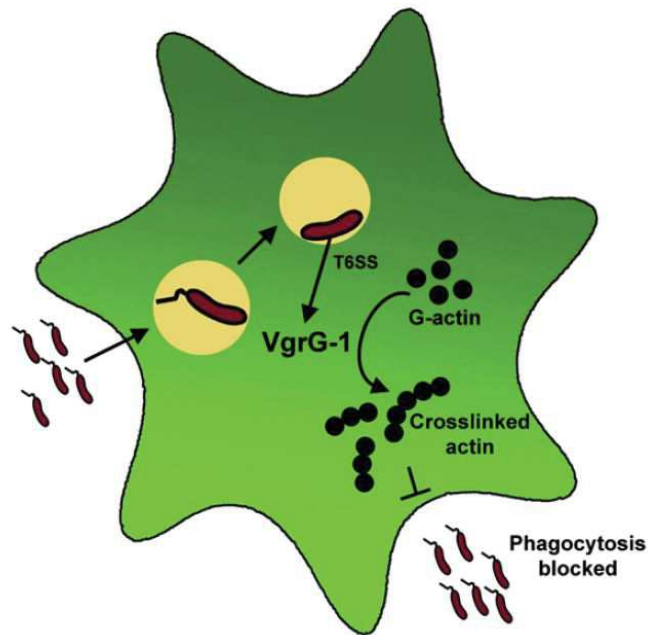


Figure 14 | Mécanisme d'inhibition de la polymérisation d'actine par *V. cholerae* au cours de stades intracellulaires.

Les *V. cholerae* sont internalisés via un mécanisme d'internalisation dépendante de l'actine. Après internalisation, le vibrio injecte la protéine VgrG-1 dans le cytoplasme par le T6SS. Cette protéine possède un domaine permettant de créer des liaisons covalentes entre les monomères d'actine ce qui empêche la formation de filament et inhibe la phagocytose. Les bactéries extracellulaires sont ainsi préservées car la cellule phagocytaire est désactivée. D'après Satchell 2009.

2.1.3.2 *V. vulnificus*

V. vulnificus est une espèce bactérienne très diversifiée c'est pourquoi la classification des souches est complexe. Une méthode consiste à classer les différentes souches dans des biotypes. Il en existe 3 dont le biotype 1 composé des souches cliniques humaines et de souches environnementales, le biotype 2 contenant des souches pathogènes de différents animaux aquatiques et le Biotype 3 contenant des souches hybrides qui sont géographiquement limitées à l'Israël (Phillips and Satchell 2017). *V. vulnificus* biotype 1 cause différentes maladies chez l'homme selon la voie d'entrée dans l'organisme et le statut immunitaire de l'individu. Il peut à la fois causer l'infections d'une blessure suite à des activités en bord de mer et provoquer une septicémie après consommation d'huître chez les patients immunodéprimés (Oliver 2005). A l'inverse, *V. vulnificus* biotype 2 induit la "vibriose de l'eau chaude" chez différentes espèces animales aquatiques telles que la crevette *Penaeus vannamei*, la truite *Oncorhynchus mykiss* et les plus susceptibles étant les anguilles *Anguilla anguilla* et *A. japonica* (Amaro et al. 2015). Isolé pour la première fois en 1999, *V. vulnificus* biotype 3 diffère des autres biotypes par ses caractéristiques biochimiques. Ce biotype est impliqué dans des cas de fasciite et d'osteomyélite nécrosante (Oliver 2005).

L'ensemble des *V. vulnificus* pathogènes sont décrits comme des pathogènes extracellulaires exprimant une série de facteur de virulence causant de graves dégâts aux tissus de leurs hôtes. La capsule est reconnue comme un facteur de virulence majeur de *V. vulnificus* Biotype 1 chez l'homme. Elle permet l'échappement à la phagocytose et facilite la dissémination de la bactérie dans l'organisme (Wright et al. 1990). En revanche, la capsule ne semble pas indispensable à la virulence des souches du Biotype 2 chez l'anguille (Biosca et al. 1993). Parmi les facteurs de virulence de *V. vulnificus* on retrouve également une toxine MARTX (RtxA1). Cette toxine est importante dans les cas de septicémie chez la souris infectée par *V. vulnificus* biotype 1. Cette toxine peut induire la lyse de divers types cellulaires comme les cellules épithéliales, les érythrocytes et les macrophages (Satchell 2015). Les souches pathogènes d'anguille possèdent un gène chromosomique et un gène plasmidique codant chacun pour une toxine MARTX. Elles possèdent toutes les deux un domaine ACD ce qui suggèrent qu'elles peuvent perturber la polymérisation d'actine comme la toxine RTX de *V. cholerae*. La perte des deux copies de MARTX impacte fortement la virulence de *V. vulnificus* (Amaro et al. 2015, Satchell 2015). Chez *V. vulnificus* biotype 1 on retrouve également une métalloprotéase Vvp. Cette enzyme est capable de dégrader un grand nombre de substrats différents et elle cause de sérieux dommages hémorragiques chez la souris. Toutefois son implication dans la pathologie humaine n'est pas claire car sa délétion n'induit pas de perte de virulence (Amaro et al. 2015).

2.1.3.3 *V. parahaemolyticus*

Le pathogène *Vibrio parahaemolyticus* est responsable de gastroentérites chez l'homme suite à la consommation d'aliments non-cuits provenant de la mer ou d'eau contaminée. La pathologie se caractérise par des douleurs abdominales accompagnées de diarrhées, vomissements, de nausées et de fièvre. *V. parahaemolyticus* peut également passer la barrière intestinale et causer une septicémie ce qui induit un fort taux de mortalité chez les malades (Wang et al. 2015). La bactérie adhère aux cellules de la barrière épithéliale et injecte des effecteurs Vop grâce à deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS1 et T3SS2). Seul le T3SS2 est considéré comme l'un des facteurs majeurs de l'enterotoxigénité de *V. parahaemolyticus* car il permet l'injection dans le cytoplasme des cellules de l'hôte des effecteurs VopZ, VopV (O'Boyle and Boyd 2014). Quant au T3SS1, il est impliqué dans la cytotoxicité par induction de l'autophagie et l'arrondissement des cellules. *V. parahaemolyticus* produit également les 3 toxines hémolytiques TDH, TRH et TLH nécessaires à la cytotoxicité. Seules TDH et TRH sont impliquées dans l'enterotoxigénité (O'Boyle and Boyd 2014). Récemment il a été montré que *V. parahaemolyticus* pouvait également envahir des cellules non phagocytaires notamment grâce à l'effecteur VopC (de Souza Santos and Orth 2014, de Souza Santos et al. 2017). Là encore, le T3SS2 est déterminant pour la survie intracellulaire. En effet,

l'injection de l'effecteur VopL inhibe la production de ROS en perturbant le cytosquelette d'actine (de Souza Santos et al. 2017).

Depuis 2009, des souches de *V. parahaemolyticus* ont aussi été caractérisées comme pathogènes de la crevette provoquant ainsi de lourdes pertes dans l'industrie aquacole. La bactérie induit la maladie de la nécrose aigue de l'hépatopancréas (AHPND: acute hepatopancreatic necrosis disease) (Williams et al. 2017). La virulence est dépendante de l'acquisition par transfert horizontal d'un plasmide codant pour une toxine. Cette toxine est homologue à la toxine PirAB du pathogène d'insecte *Photorhabdus*. La toxine PirAB^{vp} agirait par formation de pores membranaires (Sirikharin et al. 2015, Xiao et al. 2017).

2.1.4 Les vibrios pathogènes d'huître

Les vibrios ont été décrits comme faisant partie du microbiote commensal de mollusques bivalves comme l'huître ou la coquille Saint-Jacques (Romalde et al. 2014, Wendling et al. 2014, Lokmer and Wegner 2015). Toutefois, des vibrios pathogènes ont été décrits chez la plupart des phyla d'invertébrés marins (cnidaires, mollusques et arthropodes). Ainsi, *Vibrio shiloi*, *Vibrio harveyi*, *V. aesturianus* et *V. parahaemolyticus* sont pathogènes pour le corail, l'ormeau, l'huître et la crevette respectivement (Banin et al. 2003, Labreuche et al. 2006, Pichon et al. 2013).

L'évolution des technologies dites "NGS" (New Generation Sequencing) a permis le séquençage de nombreux génomes de vibrios pathogènes d'invertébrés marins ces dernières années. En 2009, Le Roux et ses collaborateurs ont ainsi séquencé le génome du pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 (Le Roux et al. 2009) qui a ouvert la voie aux études transcriptomiques ultérieures par RNAseq (Vanhove et al. 2016). Plus récemment, plusieurs génomes de vibrios du clade Splendidus ont été séquencés notamment au sein de la population pathogène des *Vibrio crassostreae* (Lemire et al. 2014, Vanhove et al. 2016, Bruto et al. 2017). L'accès à ces génomes ouvre la possibilité de comparer la diversité des génomes des vibrios pathogènes d'huîtres et facilite l'identification de facteurs de colonisation et de virulence chez les vibrios.

Les chapitres suivants décrivent les principaux vibrios causant des maladies chez l'huître et les mécanismes de virulence caractérisés à ce jour.

2.1.4.1 *Vibrio tubiashii*

V. tubiashii, qui appartient au clade Orientalis, est un pathogène de larve de bivalve marin (Sawabe et al. 2013). Il fut isolé pour la première fois en 1965 par Tubiash et al. à partir de larves moribondes de la palourde *Mercenaria mercenaria* (Tubiash et al. 1965, Hada et al. 1984). D'autres

souches (R15, R22 et R98) de *V. tubiashii* virulent ont été isolées à partir de larve d'huître *C. gigas* aux Etats Unis (Estes et al. 2004, Hasegawa et al. 2008). Les produits de sécrétion (ECP pour « extracellular products ») de la souche R22 sont hautement toxiques pour les larves. Dans ces ECP, deux enzymes ont pu être identifiées notamment une métalloprotéase (VtpA) et une hémolysine (VthA) dont l'expression dépend de la densité cellulaire. La métalloprotéase VtpA partage des homologies de séquences avec plusieurs espèces de vibrio et est un facteur de virulence majeur de *V. tubiashii* R22. A l'inverse, l'hémolysine *vthA* n'est pas nécessaire à la toxicité des ECP de *V. tubiashii* (Hasegawa et al. 2008). A partir de 2014, neuf souches de *V. tubiashii* ont été isolées et associées à des mortalités de larve de *C. gigas* dans les élevages français (Travers et al. 2014). La virulence et la toxicité des produits de sécrétion (ECP) de la souche représentative 07/118 T2 a été démontré sur les larves de *C. gigas*. (Travers et al. 2014). Ces produits de sécrétion inhibent les capacités d'adhésion et de phagocytose des hémocytes. Parmi ces ECP, une nouvelle métalloprotéase à zinc a pu être identifiée par spectrométrie de masse. Cette métalloprotéase est phylogénétiquement éloignée de la métalloprotéase VtpA identifiée dans les ECP des souches américaines. Elle affecte les capacités d'adhésion et de phagocytose des hémocytes *in vitro* mais son rôle dans la toxicité des ECP reste à spécifier (Mersni-Achour et al. 2014).

En 2015 Richards et al ont associé *V. tubiashii* ATCC 19105, R22 et R98 à des mortalités chez les espèces d'huître *C. virginica* et *C. gigas*. Les auteurs ont montré que la souche ATCC 19105 est en fait un *V. coralliilyticus* et que ce dernier est plus virulent encore pour les larves d'huîtres (Richards et al. 2015). Une sous-espèce, *V. tubiashii subsp. Europaeus*, a également été identifiée comme virulente pour la palourde *R. decussatus* (Dubert et al. 2017). Le génome de *V. tubiashii subsp. Europaeus* a été séquencé en 2009 ce qui a permis d'identifier des facteurs de virulence potentiels tels que des phospholipases et des hémolysines partageant une homologie de séquence avec d'autres vibrios pathogènes (Spinard et al. 2016).

2.1.4.2 *Vibrio aestuarianus*

V. aestuarianus est un pathogène d'huître faisant partie du clade Anguillarum (Sawabe et al. 2013). Les huîtres adultes montrent une plus grande sensibilité à *V. aestuarianus* que les huîtres juvéniles, il est associé à des épisodes de mortalité d'huître adulte (Labreuche et al. 2006, Garnier et al. 2008, Travers et al. 2017). Plusieurs souches virulentes ont été isolées mais la majorité des études d'interaction hôte pathogène ont été réalisées avec la souche *V. aestuarianus* 01/32 qui produit des ECP toxiques pour l'huître lorsqu'ils sont injectés expérimentalement. De plus, la phagocytose des hémocytes est affectée par les ECP *in vitro*. En effet, une dose inférieure à 2 g/ml inhibe la phagocytose de 30% par rapport aux hémocytes contrôles (Labreuche et al. 2006). La capacité

d'adhésion des hémocytes est également diminuée par les ECP. Néanmoins, les ECP provoquent une augmentation de la production de ROS *in vitro* chez deux populations d'hémocytes : les granulocytes et les hyalynocytes (Labreuche et al. 2006). En 2010, Labreuche et al. ont montré que les ECP de *V. aestuarianus* possédaient une activité métalloprotéase associée au gène *vam* (pour *vibrio aestuarianus metalloprotease*) codant pour une métalloprotéase dépendante du zinc. Pour comprendre le rôle de ce gène dans la toxicité des ECP envers les huîtres, le gène *vam* a été exprimé dans *Vibrio tasmaniensis* LMG20 012T non pathogène pour l'huître. Les résultats ont révélé que les huîtres injectées avec les ECP de *V. aestuarianus* 01/32 et les ECP de *V. tasmaniensis* LMG20 012T exprimant Vam mouraient rapidement. Au vu de ces résultats, la métalloprotéase Vam est un facteur de toxicité majeur de *V. aestuarianus* 01/32 (Labreuche et al. 2010). Le rôle majeur de Vam dans la virulence a été récemment confirmé par Goudenège et al. qui ont montré que le gène *varS* du système à deux composants VarA/VarS était nécessaire à la pathogénicité de *V. aestuarianus* et que la production de la métalloprotéase Vam était dépendante du gène *varS* (Goudenege et al. 2015).

Plus récemment en 2017, Travers et al ont testé la virulence de plusieurs souches de *V. aestuarianus* provenant de différents épisodes de mortalité d'huître adulte. Ils ont confirmé la virulence de *V. aestuarianus* en infection expérimentale par injection. De manière intéressante, un protocole d'infection standardisé par balnéation a également pu être mis en place à partir d'une eau contaminée par des huîtres préalablement injectées avec *V. aestuarianus* (donneurs). La DL50 en balnéation est de 3×10^4 bactéries/ml. Les animaux donneurs libèrent plus de bactéries dans l'eau que la DL50 dans les jours qui précèdent leur mort. Ce qui signifie que la maladie est susceptible de se répandre au sein de populations sensibles. La DL50 est comparable pour toutes les souches virulentes testées (Travers et al. 2017).

2.1.4.3 Les vibrios du clade Splendidus

Le **clade Splendidus** est régulièrement associé aux mortalités d'huîtres juvéniles. Ils montrent une très grande diversité génétique (Lemire et al. 2014). Au sein de ce clade, deux populations pathogènes, *Vibrio tasmaniensis* et *Vibrio crassostreae*, ont pu être associées positivement aux huîtres durant la période de mortalité (Bruto et al. 2017).

V. tasmaniensis LGP32 fut isolée pour la première fois à partir d'huîtres juvéniles moribondes par Gay et al. en 2004 (Gay et al. 2004b). Depuis, elle a été utilisée au laboratoire comme modèle pour caractériser les interactions hôtes/pathogènes entre l'huître et les vibrios associés aux surmortalités de juvéniles. Des travaux précédents ont permis de montrer qu'il s'agit d'un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes de l'huître (Duperthuy et al. 2011, Vanhove et al. 2015, Vanhove et al. 2016). LGP32 est en effet capable d'entrer dans les hémocytes de l'huître et de

survivre au processus de phagocytose. L'internalisation de la bactérie s'opère via la reconnaissance par des β -intégrines, et requiert la présence d'une protéine majoritaire du plasma d'huître, Cg-SOD qui joue le rôle d'opsonine. Cette opsonine reconnaît la porine OmpU qui est indispensable à l'entrée dans les hémocytes et à la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 *in vivo*. L'équipe a également montré que la virulence et la survie de LGP32 dans les hémocytes de l'huître dépendaient de sa capacité à résister aux activités microbicides au cours de la phagocytose (Figure 15)(Duperthuy et al. 2010, Duperthuy et al. 2011).

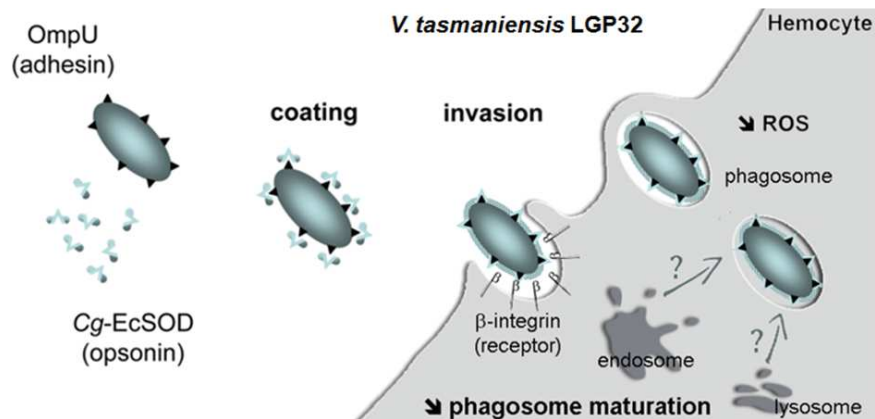


Figure 15 | Mécanisme d'entrée dans l'hémocyte de *V. tasmaniensis* LGP32

L'internalisation de *V. tasmaniensis* LGP32 est dépendante de la β -intégrine de l'hémocyte. Elle fait intervenir la porine OmpU qui joue le rôle d'adhésine, et la protéine plasmatique Cg-EcSOD comme opsonine. La porine OmpU est reconnue par la Cg-EcSOD qui va recouvrir la bactérie. *V. tasmaniensis* LGP32 est alors reconnu au niveau de la membrane puis internalisé.

Divers travaux ont montré que les produits de sécrétion extracellulaire (ECP) jouaient un rôle dans la toxicité de LGP32. Le Roux et al ont en effet montré que l'injection des ECP de LGP32 était particulièrement toxique pour les huîtres. Cette toxicité est due à une métalloprotéase sécrétée nommée Vsm (*V. splendidus* metalloprotease) qui est absente chez la souche non pathogène *V. tasmaniensis* LMG20 012T. Toutefois, si Vsm est un facteur de toxicité majeur des ECP de *V. tasmaniensis* LGP32, la délétion du gène *vsm* codant cette protéine n'affecte pas la virulence *in vivo* (Le Roux et al. 2007, Binesse et al. 2008). Parmi les ECP de LGP32, il a également été montré au laboratoire que la sécrétion de vésicules de membrane externe (OMV pour « outer membrane vesicles ») permet de délivrer des facteurs de virulence aux hémocytes notamment une protéase à sérine sécrétée (Vsp pour vesicular serine protease) qui est une gélatinase/caséinase qui partage 47.5% d'identité avec la sérine protéase de *V. cholerae* VesA. La délétion du gène *vsp* induit une diminution significative de la virulence de LGP32. Les OMV de LGP32 sont sécrétées dans le milieu extracellulaire mais également au sein des phagosomes dans les hémocytes (Figure 16). Ils confèrent également une protection contre les peptides antimicrobiens indépendamment de la protéine Vsp (Vanhove et al. 2015).

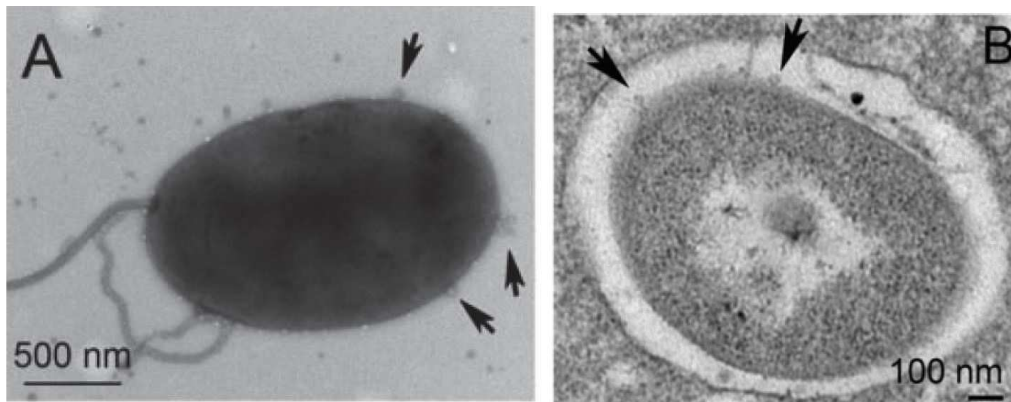


Figure 16 | Production d'OMV par *Vibrio tasmaniensis* LGP32 aux cours de stades extracellulaires et intracellulaires.

(A) Microscopie électronique d'une culture en phase de croissance logarithmique de *V. tasmaniensis* LGP32. (B) Microscopie électronique d'un *V. tasmaniensis* LGP32 intraphagosomale. Les OMV sont indiqués par les flèches noirs. D'après Vanhove et al 2015.

Des souches de la population *V. crassostreae* ont été isolées dès 2004 à partir d'hémolymphe d'huître *C. gigas* moribondes de la côte Atlantique notamment les souches LGP8 et LGP107 (Faury et al. 2004). Toutefois, celles-ci sont restées non caractérisées du point de vue de leurs processus pathogènes. Dix ans plus tard, en 2014, la population *V. crassostreae* a été associée au syndrome de mortalité des huîtres juvéniles par l'équipe de Frédérique Le Roux (Lemire et al. 2014). Les auteurs ont montré que la maladie était associée à un remplacement progressif de souches de vibrios non pathogènes par des souches de vibrios pathogènes et que celles-ci formaient une population écologique. Par génomique comparative, ils ont pu identifier 8 gènes spécifiques des souches virulentes au sein d'un îlot génomique appelé R5. Seul le gène R-5.7 est nécessaire à la virulence de la bactérie. Cependant, l'expression de ce gène dans une souche non pathogène n'est pas suffisante pour la rendre virulente. Ce gène coderait pour une protéine de 798 acides aminés mais aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié à ce jour (Lemire et al. 2014). Dans une seconde étude, les vibrios associés aux huîtres et à différentes fractions de la colonne d'eau ont été échantillonnés pendant et hors période de mortalité. Les résultats ont montré que 10 des 24 populations échantillonnées sont associées aux huîtres pendant les mortalités. Cependant, seule la population des *Vibrio crassostreae* est négativement associée à la colonne d'eau ce qui suggère qu'elle est la seule population exclusivement associée aux huîtres (Figure 17). La comparaison de la distribution de la population *V. crassostreae* dans les différents organes de l'huître a montré une association positive à l'hémolymphe. Parmi les souches de la population de *V. crassostreae*, 75% induisent plus de 50% de mortalité en infection expérimentale (Bruto et al. 2017). La virulence observée coïncide avec la présence d'un plasmide appelé pGV1512 dont la perte par la bactérie induit une diminution importante de la virulence. Il n'est en revanche pas nécessaire à la colonisation de l'huître.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que pGV1512 code des facteurs de virulences. L'annotation manuelle a permis d'identifier un système de réplication, un appareil de conjugaison (système de sécrétion de type IV, relaxase), un groupe de gènes *cus/cop* de résistance au cuivre et un système de sécrétion de type VI (TSS6). Néanmoins aucun de ces gènes n'est nécessaire à la virulence. Seule les régions intergéniques entre *cus/cop* et *t6ss* et entre *t6ss* et *t4ss* sont nécessaires à la virulence mais aucun facteur de virulence n'a pu être identifié par homologie de séquence dans ces régions (Bruto et al. 2017). C'est pourquoi les mécanismes de virulence et d'échappement au système immunitaire de l'huître par les *V. crassostreae* sont encore méconnus.

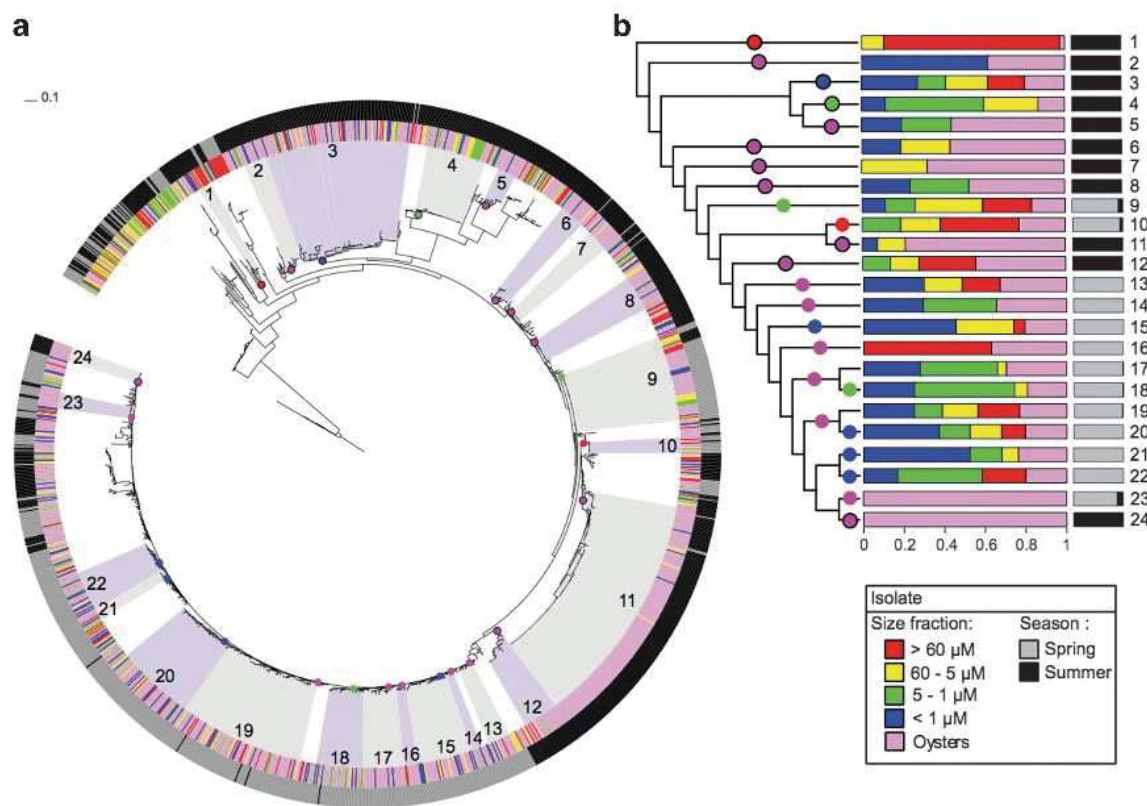


Figure 17 | Prédiction des structures des populations des *Vibrionaceae* isolées à partir de différentes fractions d'eau et de tissus d'huître pendant 2 saisons

(a) Phylogénie de 1635 isolats basée sur le gène marqueur *hsp60*. Le cercle intérieur indique dans quel échantillon la souche a été isolée (Fractions d'eau ou huître). Le cercle extérieur indique la saison de l'échantillonnage. La population 11 correspond aux *V. crassostreae* et la 24 aux *V. tasmaniensis*. (b) Cladogramme résumant la distribution normalisée de chaque population au cours des saisons en fonction des fractions d'eau et de l'huître.

2.2 Syndrome de mortalité des huîtres juvéniles

Les huîtres sont des organismes filtreurs sans cesse exposés aux microorganismes de leur environnement. Leurs tissus, loin d'être stériles hébergent un important microbiote commensal

(Wendling et al. 2014, Lokmer and Wegner 2015). Néanmoins, il arrive que des microorganismes se multiplient de manière conséquente dans leurs tissus. Ce phénomène est observé pour des virus et des bactéries pathogènes lors du syndrome de mortalité des huîtres juvéniles. Aussi, au cours de ces dernières années un travail important sur ces pathogènes a été entrepris par les équipes de recherche françaises.

2.2.1 Le virus OsHV-1

Plusieurs pathogènes ont été associés aux évènements de mortalité des huîtres juvéniles. Parmi ces pathogènes, un virus appelé Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1) est systématiquement détecté lors des épisodes de mortalités d'huîtres depuis 1991 (Renault et al. 1995). OsHV-1 est un pathogène de bivalve marin capable d'infecter diverses espèces tels que *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus* et *C. gigas* (Arzul et al. 2001). Son génome à ADN double brin a une taille de 180 kbp (Le Deuff and Renault 1999). Il appartient à la famille des *Malacoherpesviridae* du genre *Ostreavirus* avec une capsid de forme icosaédrique enveloppée (Le Deuff and Renault 1999, Davison et al. 2005, Davison et al. 2009).

Depuis 2008, un nouveau variant, l'OsHV-1 μ var, a été régulièrement détecté au sein des huîtres moribondes lors des épisodes de "surmortalités" observés depuis 2008 sur les juvéniles (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011, Azema et al. 2015, Azema et al. 2017). Le génome de l'OsHV-1 μ var est identique à 94,4% au génome de référence d'OsHV-1 néanmoins il est plus petit d'environ 205 kbp. Cinq délétions et trois insertions ont été trouvées dans le génome d'OsHV-1 μ var par rapport au génome de référence. Ces modifications induisent la perte totale de 5 ORF, la perte partielle d'une ORF et le gain de 4 autres ORF (Burioli et al. 2017). De plus, Burioli et ses collaborateurs ont trouvé deux variants d'OsHV-1 μ var, nommés A et B, qui diffèrent de 68 nucléotides (Burioli et al. 2017). Toutefois, l'impact de ces substitutions et insertions sur la biologie du virus et la maladie n'est pas connu (Segarra et al. 2010, Burioli et al. 2017). L'absence de lignée cellulaire de bivalve empêche encore à ce jour la production contrôlée d'OsHV-1 μ var et l'étude de ses effets cytopathologiques a été freinée par cela. Cependant, des particules virales peuvent être obtenues par broyage et filtration d'huîtres infectées. Une étude de 2016 montre qu'une faible dose de d'ADN viral ne tue pas les huîtres (10^1 copies ADN viral par huître) à l'inverse de la forte dose (10^8 copies ADN viral par huître) (Segarra et al. 2016). De plus, des cellules infectées ont pu être détectées par hybridation *in situ* après injection de la forte dose au sein du tissu conjonctif du manteau, dans le ventricule du cœur, dans l'hémolymphe au sein des sinus et dans des tissus conjonctifs de la gonade (Segarra et al. 2016). Une étude plus récente a démontré la présence de protéine virale et de capsid

au sein des hémocytes par immunomarquage (Martenot et al. 2017). Ces résultats suggèrent que l'*OsHV-1- μ var* a pour tropisme les cellules circulantes de l'hémolymphe, les hémocytes.

Les travaux accumulés ces dernières années sur le virus *OsHV-1 μ var* montrent ainsi qu'il est un pathogène majeur et récurrent des huîtres juvéniles. De plus, de manière remarquable, la stimulation de l'immunité antivirale des huîtres par injection d'un ARN double brin synthétique (poly I:C) a un effet protecteur tout à fait exceptionnel. En effet, non seulement l'injection de poly I:C protège les huîtres contre le virus en infection expérimentale (Green and Montagnani 2013) mais il diminue aussi significativement le syndrome de mortalités des juvéniles dans l'environnement durant les épisodes infectieux (Lafont et al en révision).

2.2.2 Les bactéries du genre *Vibrio*.

De manière surprenante, si le virus *OsHV-1* apparaît nécessaire à la maladie des huîtres juvéniles, un filtrat de virus dépourvu de bactéries ne permet pas d'induire des mortalités d'huîtres par balnéation en absence d'anesthésie. Il en va de même pour les vibrios du clade Splendidus, qui sont les principales bactéries pathogènes à avoir été isolées durant les surmortalités d'huîtres juvéniles (Le Roux et al. 2002, Faury et al. 2004, Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b, Le Roux et al. 2009, Lemire et al. 2014, Bruto et al. 2017) et qui ne sont pas capables d'induire des mortalités par balnéation. Néanmoins, Petton *et al.* ont montré le rôle essentiel des bactéries dans le syndrome des mortalités de juvéniles. En effet, lorsque l'on reproduit en conditions contrôlées les mortalités de terrain, en exposant des huîtres saines à des huîtres "donneuses" préalablement immergées dans l'estuaire durant un épisode de mortalité, un traitement des huîtres aux antibiotiques réduit les mortalités de deux à quatre fois. Les auteurs observent également que la colonisation de l'huître par des bactéries du genre *Vibrio* se produit après le début de la réplication virale (Petton et al. 2015b). Ces résultats montrent que le virus est nécessaire mais ne suffit pas à déclencher des mortalités et suggèrent qu'il s'agit d'une infection polymicrobienne virale et bactérienne, qui implique notamment des bactéries du genre *Vibrio* qui sont vraisemblablement des opportunistes.

2.2.3 Facteurs environnementaux

De par leur lieu et leur mode de vie, les huîtres *C. gigas* sont soumises à des variations importantes de plusieurs facteurs environnementaux telles que la température et la salinité. Or les mortalités massives d'huîtres juvéniles sont le résultat complexe de plusieurs facteurs génétiques, physiologiques, environnementaux et de l'infection par divers pathogènes (Samain et al. 2007, Samain 2008, Samain 2011).

Température. La température est le facteur environnemental déclenchant les mortalités. En effet, elles se produisent en zone conchylicole sur l'ensemble des côtes françaises lorsque le seuil de 16°C est dépassé. Ce phénomène a été observé aussi bien dans les élevages de la côte atlantique que sur ceux de la côte méditerranéenne (Pernet et al. 2012, Degremont 2013, Petton et al. 2013, Pernet et al. 2014a, Pernet et al. 2014b, Renault et al. 2014, Petton et al. 2015a). Le rôle majeur de la température dans le syndrome de mortalité des juvéniles a été confirmé expérimentalement. En effet, une étude de Petton et al en 2013 montre que la transmission du virus d'huîtres malades vers des huîtres saines peut être observée entre 16 et 22°C mais pas à 13°C (Petton et al. 2013). Enfin, lorsque le virus est directement injecté aux huîtres, les mortalités augmentent avec la température quelle que soit la dose de virus injectée (de Kantzow et al. 2016).

Salinité. La salinité de l'eau est un autre facteur de l'environnement qui fluctue dans les estuaires en particulier sous l'effet des crues. Si son rôle dans les mortalités n'a été que peu étudié, une étude de 2016 montre qu'une salinité faible diminue les mortalités induites par OsHV-1 μ var en infection expérimentale chez des huîtres ayant cohabitées avec des huîtres infectées dans l'environnement (Fuhrmann et al. 2016).

Facteurs toxiques. L'impact de différents composés toxiques a été étudié ces dernières années tels que celui de polluants ou de toxines algales. En effet, l'exposition d'huîtres juvéniles à l'algue toxique *Alexandrium catenella* en condition expérimentale augmente les mortalités suite à l'injection de *V. tasmaniensis* LGP32 (Abi-Khalil et al. 2016). Des travaux ont montré que *A. catenella* induit l'apoptose des hémocytes contrairement à l'algue non toxique *A. tamarense*. En effet, l'algue *A. catenella* produit une toxine nommée saxitoxine ainsi que des dérivés de cette toxine qui induisent une mort cellulaire des hémocytes caspase-dépendante (Abi-Khalil et al. 2017). L'ensemble de ces résultats prouvent que les algues toxiques peuvent affaiblir l'huître et participer ainsi à l'aggravation des mortalités. En plus des toxines algales, l'impact de polluants comme le pesticide nommé Diuron a également été testé. Bachère et ses collaborateurs ont montré que l'exposition d'huîtres génitrices durant la gamétogénèse au Diuron modifiait la capacité de survie de leur descendance dans l'étang de Thau et la baie de Marenne-Oléron (Bachere et al. 2017).

Pratiques culturelles. Les pratiques culturelles de l'huître *C. gigas* jouent également un rôle aggravant dans la maladie. Pernet et ses collaborateurs ont démontré que les huîtres hors des zones d'élevages avaient un taux de mortalité inférieur à celles des fermes ostréicoles et que la co-culture d'huîtres avec des moules diminuait la pression de la maladie sur les huîtres. Ces résultats montrent notamment que la pression exercée par les pathogènes est moindre hors des zones ostréicoles (Pernet et al. 2012, Pernet et al. 2014b).

3 Diversité des mécanismes d'interactions hôte-vibrio

3.1 Facteur de virulence des vibrios pathogènes

Ces dernières années l'étude des vibrioses a permis d'identifier une diversité de mécanismes d'échappement à la phagocytose et de résistance aux composés microbicides utilisés par l'hôte. Par ailleurs, de nombreuses protéines sécrétées nécessaires à la virulence ont été découvertes chez les vibrios. Parmi elles ont retrouvés notamment des toxines altérant l'intégrité des membranes et des protéases. Les mécanismes de résistance aux systèmes immunitaires de l'hôte et les facteurs de virulence feront l'objet de cette seconde partie.

3.1.1 Les protéases

Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines et participent au maintien de l'homéostasie chez les eucaryotes et les procaryotes. Néanmoins les protéases produites par des vibrios pathogènes sont connues pour avoir une activité toxique sur leurs hôtes (Miyoshi 2013). Ces enzymes peuvent être classées en plusieurs groupes comme les protéases à aspartate, à cystéine, à sérine et les métalloprotéases selon les caractéristiques de leur site actif. Une grande partie des protéases nécessaires à la virulence des vibrios font partie des métalloprotéases et des protéases à sérine.

3.1.1.1 Les métalloprotéases

Parmi les métalloprotéases, l'hémagglutinine (HA) est un facteur de virulence majeur chez les souches pathogènes de *V. cholerae* (Naka et al. 1995). Cette métalloprotéase, appelée aussi Vibriolysine, induit des dégâts aux cellules épithéliales notamment par la rupture des jonctions serrées. HA clive l'occuline, protéine transmembranaire au sein des jonctions serrées, ce qui provoque un réarrangement de la protéine associée aux jonctions serrées (ZO-1) et de l'actine F. Il en résulte une rupture de la barrière épithéliale (Wu et al. 2000, Benitez and Silva 2016). Elle pourrait également être impliquée dans l'activation de facteurs de virulence majeurs tels que la toxine cholérique et la toxine HlyA (Benitez and Silva 2016). Plus récemment, une nouvelle métalloprotéase nommée VchC a été identifiée chez *V. cholerae*. Cette protéase dégrade le collagène de type I mais n'est pas nécessaire à la colonisation de l'intestin du poisson zèbre (Park et al. 2015).

Chez *V. parahaemolyticus*, 2 gènes codants pour des métalloprotéases, appelées prtV et vppC, ont été découverts (Yu and Lee 1999, Kim et al. 2002). La protéase PrtV montre une activité

enzymatique sur les collagènes de type I, II, III, IV et l'élastine alors que la protéase VppC est capable de dégrader le collagène de type I, la gélatine, la caséine et l'élastine (Yu et al. 2000, Kim et al. 2002). Par ailleurs, une étude de Myoshi en 2008 montre que la protéase PrtV n'est pas exprimée *in vitro* et suggère que l'activité protéase de *V. parahaemolyticus* est principalement due à la VppC (Miyoshi et al. 2008). Toutefois, un homologue de PrtV a été retrouvé chez *V. cholerae* et montre un effet cytotoxique sur des cellules intestinales humaines (Vaitkevicius et al. 2008). Des métalloprotéases impliquées dans des mécanismes de virulence ont également été retrouvées chez d'autres vibrios pathogènes comme *V. anguillarum*, *V. vulnificus* et *V. alginoliticus* (Takeuchi et al. 1992, Yang et al. 2007, Miyoshi 2013).

3.1.1.2 Les protéases à sérine et à cystéine

Outre les métalloprotéases, plusieurs protéases à sérine ont été associées à la virulence de vibrios pathogènes. Chez *V. cholerae*, l'analyse des produits sécrétés par le système de sécrétion de type 2 a permis d'identifier 3 protéases VesA, VesB et VesC faisant partie de la famille des Chymotrypsines (Sikora et al. 2011). La protéase VesA est la principale protéase impliquée dans la synthèse de la sous unité A de la toxine cholérique (CT) (Sikora et al. 2011) alors que la protéase VesB est homologue à la trypsine et à la trombine (Gadwal et al. 2014). On retrouve également une protéase à sérine appelée protéase A/VPP1 chez *V. parahaemolyticus*. Elle est impliquée dans la virulence de *V. parahaemolyticus* envers les souris (Ishihara et al. 2002, Lee et al. 2002a). Myoshi et ses collaborateurs ont montré que la suppression du gène *vppc* augmente la production de la protéase A/VPP1 (Miyoshi et al. 2008).

Parmi les autres protéases on peut citer la présence d'une protéase à cystéine chez *V. harveyi* qui a été caractérisée comme étant une toxine majeure impliquée dans la virulence de la bactérie envers la crevette (Liu and Lee 1999). Une autre protéase à cystéine a été découverte chez *V. penaeicida*. Elle est également impliquée dans la virulence de la bactérie chez la crevette (Aguirre-Guzman et al. 2005).

Plusieurs métalloprotéases et protéases à sérine ont été identifiées chez les pathogènes de l'huître, *V. aesturianus*, *V. tubiashii* et *V. tasmaniensis* LGP32, dont certaines sont homologues à celles décrites chez les pathogènes humains.

3.1.2 Protéines altérant l'intégrité membranaire

Des protéines capables d'altérer l'intégrité des membranes eucaryotes, aussi appelées hémolysines, sont sécrétées par les bactéries à Gram négatif s'attaquant aux membranes des cellules de l'hôte. Elles détruisent les membranes plasmiques par formation de pore dans la membrane

phospholipidique ou par une activité phospholipase c'est à dire par une hydrolyse des lipides. Il existe ainsi une redondance entre les protéines dénommées hémolysines et phospholipases. D'une part, les phospholipases comme les hémolysines lysent les cellules en ciblant les membranes. D'autre part, il a été décrit que certaines hémolysines de *Vibrio* montrent des activités phospholipases. Les vibrios pathogènes produisent une grande diversité d'hémolysines souvent associées à la virulence. A ce jour, les hémolysines les mieux décrites chez les vibrios sont l'hémolysine de El Tor *V. cholerae* (HlyA) ainsi que l'hémolysine direct thermostable **TDH** et les hémolysines thermolabiles **TLH** et **δ-VPH** chez *V. parahaemolyticus*. Plusieurs homologues de ces hémolysines ont été retrouvés chez diverses espèces de *Vibrio* pathogènes.

3.1.2.1 Hémolysines formant des pores membranaires

Les hémolysines **HlyA** sont produites par les souches de *V. cholerae* El Tor O1 et non O1. Ces hémolysines sont cytotoxiques, entérotoxiques et induisent la formation de nombreuses vacuoles sur les cellules de mammifères (Ichinose et al. 1987, Figueroa-Arredondo et al. 2001). L'hémolysine HlyA est une toxine RTX qui forme des pores dans la membrane par formation d'oligomère (Sathyamoorthy et al. 1997, Kumar et al. 2011). Comme toutes les toxines RTX, l'hémolysine HlyA est sécrétée par un système de sécrétion de type 1 et possède un domaine C terminal riche en glycine et en aspartate (Boardman and Satchell 2004, Linhartova et al. 2010). La protéine HlyA peut également être délivrée par les vésicules de membranes bactériennes externes (OMV) de *V. cholerae* et est capable d'induire l'autophagie sur des cellules de mammifère (Elluri et al. 2014). Elle est un facteur de virulence important de *V. cholerae* chez la souris juvénile (Alm et al. 1991). Des gènes homologues à HlyA ont été décrits comme impliqués dans la virulence et la cytotoxicité des vibrios virulents *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis* et *V. mimicus* (Hirono et al. 1996, Miyoshi et al. 1997, Kim et al. 2010, Choi et al. 2014, Song et al. 2015).

Chez *V. parahaemolyticus*, la majorité des souches pathogènes produisent des hémolysines **TDH** (thermostable direct hemolysin) et **TRH** (TDH-related hemolysin) codées par les gènes *tdh* et *trh* respectivement (Nishibuchi and Kaper 1995). La protéine TDH est une toxine qui possède une activité cytotoxique, entérotoxique et qui cause la lyse des érythrocytes par formation de pores dans la membrane (Yanagihara et al. 2010). L'altération du flux d'ion est responsable des diarrhées observées durant la maladie. L'hémolysine TRH est une toxine thermolabile qui partage 70% d'homologies avec TDH. Les deux toxines sont considérées comme des facteurs de virulence majeurs bien qu'elles n'expliquent pas à elles seules la pathogénicité de *V. parahaemolyticus* (Ceccarelli et al. 2013). Il a été montré que 4 gènes, *tdh1*, *tdh2*, *tdh3* et *tdh4* sont présents dans le génome de souches cliniques de *V. parahaemolyticus*. Le gène *tdh2* est le principalement responsable de

l'activité hémolytique (Zhang et al. 2017). Des homologues de TDH et TRH ont été retrouvés chez *V. cholerae* et *V. mimicus* (Baba et al. 1991, Shi et al. 2000, Miller et al. 2012). *V. parahaemolyticus* produit également une autre hémolysine thermolabile nommée δ -VPH dont la séquence nucléotidique diffère de TDH, TRH (Taniguchi et al. 1990). Un homologue de **δ -VPH** (71.5%) a été retrouvé chez *V. cholerae* (**Vc - δ TH**) codé par le gène *dth* (Fallarino et al. 2002). Toutefois le rôle de **δ -VPH** et **Vc - δ TH** dans la virulence n'a jamais été déterminé.

D'autres hémolysines ont pu être identifiées chez des vibrios pathogènes humains. Le gène *hlx* code pour une protéine possédant une activité hémolytique chez *V. cholerae* et chez *V. mimicus* mais son rôle dans la virulence n'est pas élucidé (Nagamune et al. 1995, Shi et al. 2000). Deux autres gènes codant pour des hémolysines, **vIIY** et **hlyIII**, ont été identifiés chez *V. vulnificus* (Chang et al. 1997, Chen et al. 2004). L'importance de vIIY et hlyIII dans la virulence n'est pas connue.

3.1.2.2 Enzymes ayant une activité phospholipase

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides des membranes en acide gras et autres composés lipidiques. Elles sont généralement classées en fonction de leur spécificité pour hydrolyser les ponts esters à différentes localisations du phospholipide. Il existe 5 groupes nommés par les lettres A₁, A₂, B, C et D en fonction du site d'action de l'enzyme sur le phospholipide. Certaines de ces enzymes ont été associées à la virulence de bactéries pathogènes notamment chez *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (Shinoda et al. 1991, Fiore et al. 1997, Schmiel and Miller 1999).

Chez *V. vulnificus* des phospholipases A ont été identifiées et associées à la virulence (Testa et al. 1984, Koo et al. 2007). A l'inverse, la phospholipase A₂ caractérisée chez *V. anguillarum* n'est pas nécessaire à la virulence (Li et al. 2013). Toutefois, elle est capable de provoquer la lyse des cellules de poisson tout comme la phospholipase A découverte chez *V. mimicus* (Lee et al. 2002c). Parmi les autres groupes de phospholipases, une phospholipase D a été retrouvée chez *V. damsela* et est impliquée dans la lyse des érythrocytes (Kreger et al. 1987).

Chez *V. parahaemolyticus*, les souches virulentes produisent une autre **hémolysine thermolabile** nommée TLH. Elle possède une activité **phospholipase** mais son rôle dans l'entérotoxicité de *V. parahaemolyticus* au cours d'une infection chez l'homme n'est pas connu (Shinoda et al. 1991). On trouve deux gènes homologues de TLH appelés *vhhA* et *vhhB* chez les souches pathogènes de *V. harveyi* (Zhang et al. 2001). L'activité phospholipase de VhhA est nécessaire à la virulence *V. harveyi* sur le poisson *Scophthalmus maximus* (Sun et al. 2007).

3.1.3 Protéines ciblant le cytosquelette d'actine

Les filaments d'actine sont impliqués dans divers mécanismes immunitaires comme la phagocytose. C'est pourquoi la perturbation de la polymérisation d'actine est un mécanisme de virulence répandu chez les bactéries pathogènes notamment chez les vibrios. Chez *V. cholerae*, la toxine RTX nommée RtxA (groupe des MARTX: pour multifunctional autoprocessing RTX toxins) est un facteur de virulence capable de perturber le cytosquelette d'actine et de causer l'arrondissement des cellules de l'hôte. Elle est sécrétée, comme toutes les toxines RTX, par un système de sécrétion de type 1. Les domaines CPD (protéase à cystéine), ACD (actin cross-linking domain) et RID (Rho GTPase inactivation domain) sont transloqués à travers la membrane de la cellule hôte. Le domaine CPD va cliver les domaines ACD et RID qui sont ainsi libérés dans la cellule hôte (Satchell 2015). Le domaine ACD provoque des liaisons covalentes entre les monomères d'actine G (Cordero et al. 2006, Kudryashov et al. 2008) et le domaine RID induit la dépolymérisation de l'actine par inactivation des petites Rho GTPases (Pei and Grishin 2009). Les deux domaines de la toxine participent à une inhibition forte de la polymérisation d'actine (Figure 18). Par ailleurs, le domaine ACD est suffisant pour inhiber la phagocytose des macrophages mais les deux domaines sont capables de rompre l'intégrité des jonctions serrées des cellules épithéliales indépendamment l'un de l'autre (Dolores et al. 2015). On retrouve des homologues de RtxA chez plusieurs autres vibrios pathogènes comme *V. vulnificus* et *V. anguillarum* (Satchell 2015). De plus, des domaines ACD ont été caractérisés chez d'autres protéines que les toxines RTX, notamment VgrG qui est un effecteur associé au système de sécrétion de type 6. Là encore, l'inhibition de la polymérisation d'actine et de la phagocytose a été démontré chez *V. cholerae* (Ma et al. 2009). Le facteur de virulence VopL chez *V. parahaemolyticus* possède également un domaine ACD qui est impliqué dans la formation de filament d'actine anormaux, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase (de Souza Santos et al. 2017). *V. parahaemolyticus* sécrète également l'effecteur VopS qui inhibe la polymérisation d'actine en interagissant avec une Rho GTPase (Yarbrough et al. 2009).

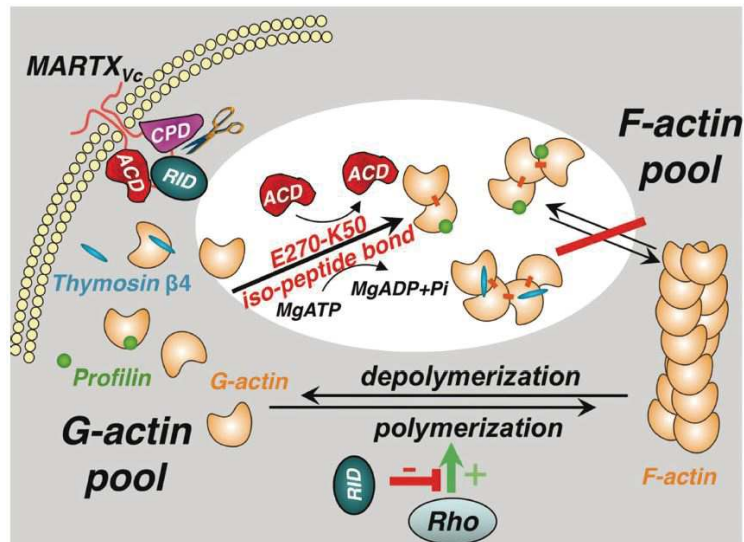


Figure 18 | Mécanismes d'inhibition de l'actine par la toxine cholérique MARTXvc (RtxA).

Après translocation au travers de la membrane, le domaine CPD (protéase à cystéine) coupe et libère dans le cytoplasme les domaines RID (Rho GTPase inactivation domain) et ACD (actin cross-linking). RID affecte l'équilibre en l'actine F et l'actine G en inhibant l'activité des Rho GTPases. Le domaine ACD utilise l'actine G, maintenu par la thymosine et la profiline, comme substrat pour provoquer la formation d'oligomère d'actine. Ce mécanisme, dépendant de l'hydrolyse d'ATP, est incompatible avec la polymérisation d'actine et est irréversible. D'après Kudryashov et al 2008.

3.2 Rôle des systèmes de sécrétion dans la virulence

Les bactéries à Gram négatif sécrètent une multitude de protéines dans l'espace extracellulaire ou directement dans la cellule de l'hôte via des systèmes de sécrétion transmembranaires. A ce jour, il a été décrit qu'il existe 6 types de TSS chez les bactéries à Gram négatif. Le transport de protéines vers le milieu extérieur par les T1SS et T5SS nécessite une première étape de translocation par la voie Sec ou Tat. La protéine SecB agit comme une chaperonne qui empêche la conformation des protéines et qui les délivre à l'ATPase SecA qui guide la protéine non conformée vers le canal de translocation SecYEG. La protéine est ensuite conformée dans le périplasme. Contrairement à la voie Sec, la voie Tat permet la translocation de protéines déjà conformées vers le périplasme. La protéine peut ensuite être sécrétée via le T2SS ou le T5SS. A l'opposé, certains TSS transportent leurs substrats à travers la membrane externe en une seule étape indépendamment des voies Sec et Tat. Le T1SS sécrète les protéines du cytoplasme vers le milieu extérieur et les T3SS, T4SS et T6SS permettent l'injection de protéine directement dans le cytoplasme de la cellule cible (Figure 19) (Costa et al. 2015, Green and Meccas 2016).

Plusieurs TSS ont été décrits comme étant impliqués dans la sécrétion de facteur de virulence chez les vibrios. Chez *V. cholerae*, le T1SS est un ABC transporteur qui permet la sécrétion de la toxine RTX (Boardman and Satchell 2004). De même, le T2SS permet la sécrétion de facteur de

virulence majeur de *V. cholerae* notamment la toxine cholérique CT et des protéases à sérine telles que Ves A, Ves B et Ves C (Sikora et al. 2011, Sikora 2013). Chez *V. vulnificus*, le T2SS est également impliqué dans la sécrétion de toxine RTX et de l'hémolysine VvhA et est nécessaire à la virulence chez la souris (Hwang et al. 2011). Le T3SS permet l'injection d'une variété de protéines directement dans la cellule cible. Le génome de *V. parahaemolyticus* code pour deux T3SS. Le T3SS1 n'est pas nécessaire à l'entérotoxicité mais joue un rôle dans la cytotoxicité envers les lignées cellulaires (Hiyoshi et al. 2011). A l'inverse le T3SS2 est considéré comme un facteur de virulence majeur dans les cas de gastroentérite (Hiyoshi et al. 2011). Le T3SS2 promeut l'entrée de *V. parahaemolyticus* dans des cellules non phagocytaires et joue un rôle important dans la survie intracellulaire (Zhang et al. 2012b, de Souza Santos et al. 2017). En effet, il permet l'injection dans la cellule hôte des facteurs de virulence VopL et VopS qui bloque la polymérisation d'actine (Yarbrough et al. 2009, de Souza Santos et al. 2017). D'autres vibrios pathogènes possèdent également un T3SS comme par exemple *V. alginolyticus* qui induit l'apoptose des cellules de poisson de manière T3SS dépendante. Parmi les autres systèmes de sécrétion, le T6SS est nécessaire à la virulence de *V. cholerae* et favorise sa dissémination durant une infection chez la souris (Ma et al. 2009). Par ailleurs, le T6SS joue un rôle dans la résistance aux prédateurs eucaryotes et dans la compétition bactérienne (Metzger et al. 2016).

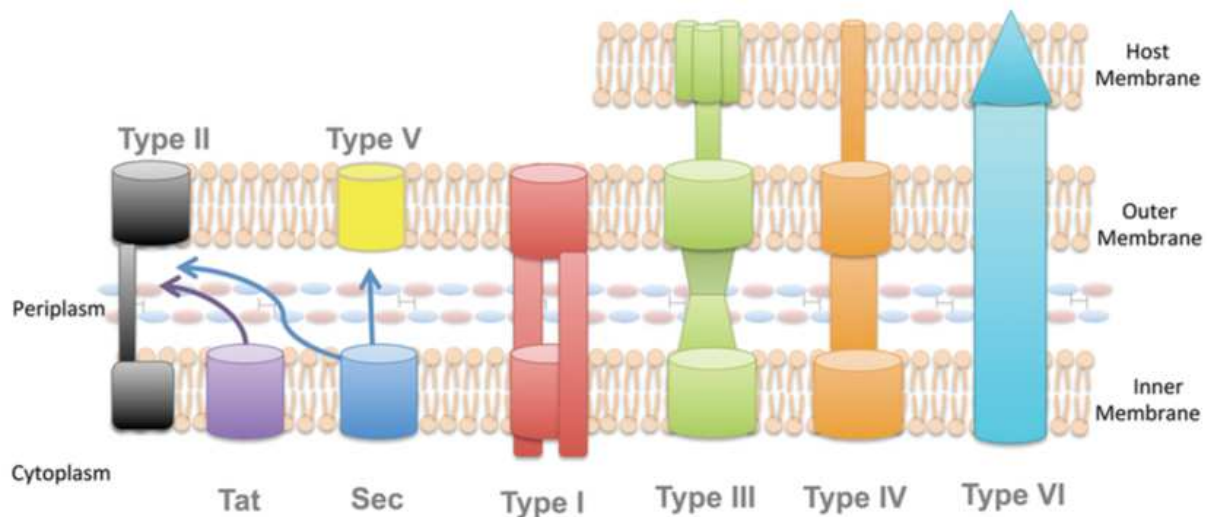


Figure 19 | Schéma des systèmes de sécrétion membranaire des bactéries à Gram négatif
D'après Green et Meccas 2016

3.3 Résistance au système immunitaire

Au cours de l'évolution, les bactéries pathogènes ont mis en place diverses stratégies afin d'échapper aux différents mécanismes microbicides de leurs hôtes. L'internalisation du pathogène dans les cellules de leur hôte peut être considérée comme délétère ou avantageuse selon l'espèce

bactérienne. Certains pathogènes peuvent échapper à l'internalisation à travers l'inhibition de la reconnaissance par le phagocyte ou par sécrétion d'effecteurs qui interfèrent directement avec la signalisation cellulaire et le cytosquelette. D'autres au contraire ont développé des stratégies pour survivre dans le phagocyte et sont devenus des spécialistes de la niche intracellulaire.

3.3.1 Echappement à la phagocytose

Le phagosome est un environnement hostile pour les bactéries à cause de sa forte concentration en composés antimicrobiens. C'est pour cette raison que de nombreux pathogènes mettent en place des stratégies pour échapper à l'internalisation par les cellules phagocytaires. En effet, certains pathogènes peuvent cacher ou modifier leurs PAMPs afin d'éviter d'être reconnus par les phagocytes. D'autres produisent des effecteurs interférant avec la signalisation ou avec le cytosquelette de la cellule après adhésion à la membrane. Il en résulte une inhibition de l'internalisation du pathogène (figure 20).

L'une des stratégies d'échappement à la phagocytose consiste à masquer ou à modifier les PAMPs à la surface de la bactérie afin de ne pas être reconnu par les cellules immunitaires de l'hôte. Pour cela, les pathogènes peuvent produire des exopolysaccharides qui vont former une capsule tout autour de la bactérie. Cette capsule va ainsi cacher leurs PAMPs évitant la reconnaissance par les cellules immunitaires ou par les opsonines. Cette stratégie est utilisée par nombreux pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et les *Streptococcus pneumoniae* (Sarantis and Grinstein 2012). Dans le cas des vibrios, il a été montré que la sécrétion d'une capsule par *V. vulnificus* favorisait l'inhibition de l'opsonisation et l'échappement à la phagocytose (Linkous and Oliver 1999, Jones and Oliver 2009). Toutefois, une autre étude a montré que *V. cholerae* sécrétait une capsule mais que celle-ci n'avait pas d'impact sur l'efficacité de phagocytose (Meno et al. 1998). Une seconde stratégie consiste à modifier chimiquement les PAMPs afin de ne plus être reconnu par l'hôte. Par exemple plusieurs pathogènes tels que *Salmonella typhimurium* et *Helicobacter pylori*, modifient leurs LPS ou la flagelline (Sarantis and Grinstein 2012).

Au lieu d'inhiber la reconnaissance par le phagocyte, d'autres pathogènes sécrètent des effecteurs afin de perturber directement la phagocytose. Le cas le plus emblématique est celui des *Yersinia* qui inhibent la phagocytose notamment en perturbant l'assemblage du cytosquelette via l'injection dans la cellule hôte des protéines Yop par un T3SS (Sansonetti 2004, Atkinson and Williams 2016). Chez les vibrios, le pathogène *Vibrio vulnificus* est capable de produire une toxine RTX qui favorise sa survie en inhibant la phagocytose (Lo et al. 2011). Par ailleurs, grâce à un système de sécrétion de type I, *V. cholerae* sécrète également une toxine RtxA qui se lie à l'actine G qui induit un réarrangement du cytosquelette et prévient de la phagocytose (Fullner and Mekalanos 2000). De

plus, une autre étude a montré que *V. cholerae* a la capacité de perturber la polymérisation de l'actine-F grâce à l'effecteur VgrG1 associé au T6SS (Durand et al. 2012).

3.3.2 Résistance aux composés microbicides de l'immunité

Alors que certains pathogènes évitent ou inhibent la phagocytose, plusieurs bactéries pathogènes ont développé des stratégies de résistance à l'activité microbicide du phagosome. Certaines d'entre elles sont devenues de véritables spécialistes de ce mode d'infection et utilisent les cellules épithéliales et les phagocytes professionnels comme des niches répliquatives. C'est le cas de *Mycobacterium tuberculosis* ou de *Legionella pneumophila* qui sont intravacuolaires et qui modifient le phagosome à leur avantage ou empêchent sa maturation (figure 20). D'autres comme *Listeria monocytogenes* lysent la membrane du phagosome et se multiplient dans le cytoplasme (Flannagan et al. 2009). Plus récemment, des stades intracellulaires ont été décrits chez les vibrios. En effet, *V. cholerae* survit dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (Van der Henst et al. 2016), *V. parahaemolyticus* envahit les cellules épithéliales HeLa (de Souza Santos and Orth 2014) et *V. tasmaniensis* LGP32 survie à la dégradation par la phagocytose dans les hémocytes de l'huître *C. gigas* (Duprethuy et al. 2011, Vanhove et al. 2015, Vanhove et al. 2016).

Les stratégies d'adaptation sont multiples mais toutes les bactéries pathogènes doivent résister aux molécules microbicides massivement utilisées par les cellules hôtes. Pour l'ensemble des composés toxiques, les pathogènes ont développé des mécanismes de résistance et d'efflux afin de survivre à la dégradation par le phagosome.

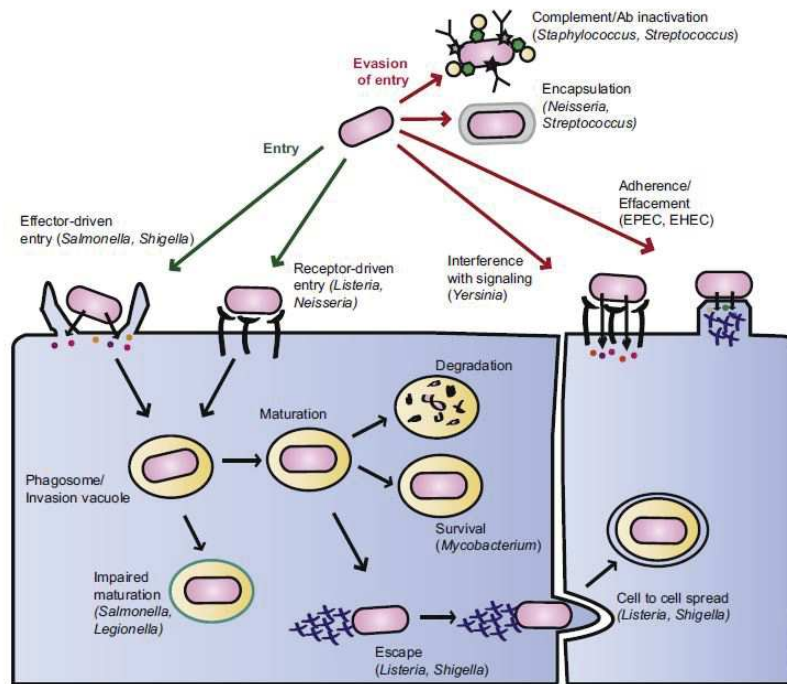


Figure 20 | Mécanismes d'échappement/résistance à la phagocytose.

Les pathogènes peuvent être internalisés dans la cellule hôte soit par injection d'effecteurs soit par reconnaissance par un récepteur membranaire. La vacuole une fois formée est censée subir une maturation pour tuer le pathogène. Toutefois, les pathogènes survivent à cette étape que ce soit en bloquant la maturation, en survivant aux conditions toxiques du phagosome ou en s'échappant dans le cytoplasme. A l'opposé, d'autres pathogènes inhibent la phagocytose par injection d'effecteurs dans la cellule hôte pour ne pas être reconnus ou pour interférer avec la signalisation cellulaire. Parmi ceux qui évitent la phagocytose il y a aussi les bactéries qui forment une capsule d'exo polysaccharides ou modifient les composants de leurs membranes pour de plus être reconnus par les opsonines et les cellules de l'hôte. D'après Sarantis et Grinstein 2012.

3.3.2.1 Résistance aux peptides antimicrobiens

Pour faire face à l'activité des peptides antimicrobiens produits par leurs hôtes (que ce soit dans le phagosome, l'hémolymphe ou les tissus), ou par les microorganismes avec qui ils cohabitent dans les tissus de l'huître, les vibrios utilisent plusieurs stratégies : (1) la modification de la membrane externe, (2) l'induction de la réponse au stress, (3) l'efflux des peptides antimicrobiens, (4) l'immunosuppression par la répression de l'expression des AMPs.

Les bactéries ont la capacité de diminuer la charge électro négative de leur membrane externe car les interactions électrostatiques jouent un rôle prépondérant dans l'interaction des AMP cationiques avec les membranes bactériennes. Pour cela, les bactéries à Gram négatif ont acquis des mécanismes de modification de leur LPS, un composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Le LPS est composé de 3 régions : le lipide A anionique qui permet l'ancrage dans la membrane, le corps de l'oligosaccharide et enfin l'antigène O du polysaccharide (Hankins et al. 2011, Destoumieux-Garzon et al. 2014). Le pathogène *V. cholerae* produit une acétyltransférase

(Lpx ou MsbB) qui modifie le LPS en transférant une chaîne d'acide gras secondaire sur le lipide A. Cette modification induit une résistance des souches El Tor contre au moins deux peptides antibactériens, la polymixine B et la cathélicidine LL-37 (Matson et al. 2010). En effet, cet acide gras est le support d'une modification structurale affectant la charge de la membrane bactérienne grâce aux protéines AlmG, AlmF et AlmE qui catalysent l'ajout d'une glycine ou d'une diglycine au lipide A par estérification (Figure 21). Grâce à l'amine libre apportée par la glycine, la charge électro négative membranaire de la bactérie est amoindrie et l'interaction avec les peptides cationiques moins favorable. Ainsi, la délétion des gènes *alm* induit une diminution drastique de la concentration minimale inhibitrice de peptides antibactériens cationiques comme la polymixine B (Henderson et al. 2014).

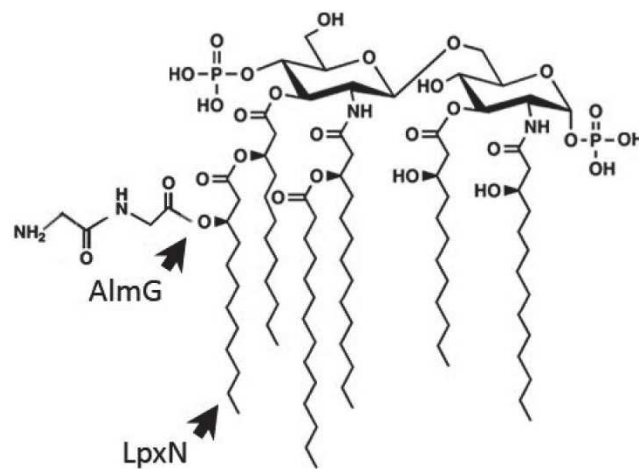


Figure 21 | Structure modifiée du lipide A chez *V. cholerae* El Tor

D'après Destoumieux-Garzon et al 2014.

La membrane étant la cible de nombreux AMP, la détection externe des stress membranaires est cruciale pour réparer les dégâts avant qu'ils ne soient irréversibles. Ce processus dépend du facteur alternatif σE codé par le gène *rpoE*. Il est exprimé suite à un stress membranaire et va ensuite réguler l'expression de plusieurs facteurs qui jouent un rôle dans la restauration de l'intégrité membranaire (Destoumieux-Garzon et al. 2014). Le facteur σE est nécessaire à la résistance de *V. cholerae* aux AMP. En effet la perte de σE induit une plus grande sensibilité à un peptide de synthèse dérivé de BPI. En amont, ce processus est contrôlé par la porine OmpU dont l'absence induit également une perte de résistance aux peptides antimicrobiens. Les AMP induisent une perturbation de la conformation de OmpU qui va activer σE ; ainsi OmpU semble agir comme un senseur dans une voie de transduction du signal (Mathur and Waldor 2004, Mathur et al. 2007). Des observations similaires ont été obtenues chez le pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 puisque la porine OmpU participe à la résistance aux *Cg*-Defm et aux *Cg*-BPI (Duperthuy et al. 2010). Le facteur σE peut réguler également la résistance aux AMP par la production de vésicules de membrane externe (OMV)

qui vont soit les titrer avant qu'ils n'interagissent avec la membrane, soit éliminer les portions membranaires contenant des AMP. Diverses études ont ainsi montré que la sécrétion d'OMV protège les vibrios des peptides antimicrobiens. Une étude de 2013 a montré que la production des OMVs produites par *V. cholerae* en présence de doses sublétales de polymixine B permettaient de protéger *V. cholerae* de l'activité antimicrobienne de la cathélicidine LL-37 (peptide antimicrobien humain). Ce mécanisme de résistance est dû à la présence de la protéine Bap1 au niveau des OMV en présence de polymixine B. Cette protéine capture la cathélicidine LL-37 et inhibe ainsi son activité microbicide (Duperthuy et al. 2013). Chez le pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 les OMVs ont également un effet protecteur en titrant les peptides antimicrobiens, évitant ainsi leur interaction avec la membrane externe (Vanhove et al. 2015).

Une autre stratégie de résistance consiste à effluer les peptides antimicrobiens internalisés à l'aide de pompes à efflux. Ce mécanisme a été clairement démontré chez les vibrios. En effet, les systèmes d'efflux de type RND sont nécessaires à la résistance aux AMP chez *V. cholerae*. Plusieurs pompes RND ont été identifiées notamment VexAB, VexCD, VexEF, VexGH, VexIJK et VexLM (Kitaoka et al. 2011). Parmi eux, la pompe VexAB est impliquée dans la résistance à la polymixine B mais également à d'autres composés microbicides comme les détergents et les antibiotiques (Bina et al. 2006, Bina et al. 2008). La pompe VexGH efflue les antibiotiques et les détergents mais dans une moindre mesure que VexAB. Les pompes VexEF et VexLM sont nécessaires à la virulence de *V. cholerae* mais ne participent pas à l'efflux des AMPs. Ils jouent un rôle dans la sécrétion de facteurs de virulence comme la toxine cholérique (Taylor et al. 2012).

En parallèle des mécanismes de résistance présentés précédemment, les vibrios utilisent également la répression transcriptionnelle des AMP pour favoriser la colonisation de l'hôte. Ce phénomène a été observé chez *V. cholerae*. Effectivement l'expression de la cathélicidine LL-37 est sous exprimée au niveau des cellules épithéliales ; ce phénomène est associé à la toxine cholérique (Chakraborty et al. 2008). Chez les invertébrés, le pathogène du corail *V. coralliiticyus* inhibe l'expression de l'AMP darmicorine chez son hôte, le cnidaire *Pocillopora damicornis* (Vidal-Dupiol et al. 2011). A ce jour, ces mécanismes n'ont jamais été mis en évidence chez les vibrios pathogènes de l'huître *C. gigas*.

3.3.2.2 Résistance aux ETs

Depuis que les bactéries et leurs produits de sécrétion ont été décrits comme stimulant la production des ETs, les mécanismes d'évasion des pathogènes ont beaucoup été étudiés. En effet, de nombreux pathogènes comme *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli* et *S. typhimurium* produisent des

effecteurs capables de favoriser l'échappement aux ETs. L'une des stratégies les plus répandue étant la dégradation de l'ADN par des DNases (Delgado-Rizo et al. 2017).

Il a été démontré au laboratoire que les vibrios pouvaient déclencher l'ETose (Poirier et al. 2014). Par contre, peu de mécanismes de résistance à l'ETose ont été caractérisés chez les vibrios. Chez *V. cholerae* deux nucléases extracellulaires Dns et Xds sont nécessaires à la colonisation de la souris sauf lorsque celle-ci est dépourvue de polynucléaires neutrophiles qui sont chez les vertébrés les cellules productrices des ETs (appelés NETs pour neutrophil extracellular traps). De plus, ces nucléases sont indispensables à la dégradation des ETs et favorisent l'échappement et la survie de *V. cholerae* face aux neutrophiles (Seper et al. 2013). Ces résultats sont appuyés par une étude de 2014 qui montre que deux DNases de *V. cholerae* sont produites dans l'intestin des souris nouvellement nées au cours d'une infection. La délétion de ces nucléases induit une augmentation de la quantité d'amas d'ADN présents dans l'intestin ce qui suggère qu'elles servent à dégrader les ETs (Bishop et al. 2014).

3.3.2.3 Résistance aux espèces réactives de l'oxygène

3.3.2.3.1 Le Régulon SoxRS et les enzymes détoxifiantes de l'ion superoxyde

Les **superoxyde dismutases (SOD)** bactériennes convertissent l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 23). On trouve 3 gènes codant pour des SOD chez les bactéries à Gram négatif : deux SOD cytoplasmiques utilisant comme co-facteur le fer ou le manganèse et une SOD à cuivre/zinc périplasmique. Comme l'anion superoxyde ne passe pas les membranes, ces diverses localisations subcellulaires permettent de protéger chaque compartiment de la cellule contre l' O_2^- (Imlay 2013). Le facteur de transcription SoxR active l'expression du gène *soxS* en réponse à la présence d'ion superoxyde. La protéine SoxS va induire une augmentation de nombreux gènes dont la superoxyde dismutase SodA. Le Régulon SoxRS est nécessaire à la résistance aux ROS, aux RNS et aux métaux lourds chez *E. coli* (Zheng et al. 1999).

Chez les vibrios, la SOD à manganèse a été caractérisée chez *Vibrio mimicus*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus* (Kimoto et al. 2001). De plus, une étude de Ju-Sim Kim de 2005 a montré que SoxR induit l'expression d'une SOD à manganèse qui est nécessaire à la résistance à l'acidité chez *Vibrio vulnificus* (Kim et al. 2005). De plus, la délétion des SOD à cuivre/zinc, à Manganèse et à fer a montré qu'elles sont toutes nécessaires à la survie contre les ROS de la cellule hôte (In-Hye et al. 2007). Par ailleurs, le gène SoxR induit l'expression de la SOD à manganèse en présence d'ion superoxyde (In-Hye et al. 2007). Chez *V. cholerae*, trois SOD (SodA, SodB et SodC) ont été caractérisées. SodA, qui est une SOD à cuivre/zinc, pourrait jouer un rôle protecteur contre les ROS

(Gabbianelli et al. 2004). Une SOD a également été identifiée chez *V. shiloi* comme étant nécessaire à la protection en intracellulaire contre les ROS produit par les algues symbiotiques des zooxanthelles du corail (Banin et al. 2003).

3.3.2.3.2 Le Régulon OxyR et les enzymes détoxifiantes du peroxyde d'hydrogène.

Les SOD bactériennes et les SOD du phagosome génèrent de manière concomitante de l' H_2O_2 à partir du radical O_2^- (ion superoxyde) hautement réactif. Mais le peroxyde d'hydrogène reste un composé toxique pour la cellule bactérienne. Chez *E. coli*, deux types d'enzymes réduisant le H_2O_2 en H_2O (non toxique) sont particulièrement bien décrites : l'alkylperoxyde réductase (Ahp) et les catalases (Mishra and Imlay 2012). L'enzyme **Ahp** appartient aux alkylperoxyde réductase. Chez *E. coli*, c'est en réalité un système de deux protéines, AhpC et AhpF qui adoptent des états multimériques (figure 22). Ce complexe utilise le NADH comme donneur d'électron pour réduire le H_2O_2 en molécule d'eau. En plus de l'Ahp, il existe des catalases capables d'éliminer l' H_2O_2 (Figure 23). Deux familles de catalases sont décrites chez les bactéries selon la nature de leurs cofacteurs : les catalases à hème, utilisant le fer, et les catalases à manganèse. Ces dernières sont nettement moins répandues que les catalases à hème. Toutes deux agissent en deux étapes et utilisent respectivement le fer Fe^{3+} et le manganèse Mn^{2+} comme donneurs d'électrons (Mishra and Imlay 2012). L'Ahp est considérée chez *E. coli* comme la principale source d'élimination de l' H_2O_2 . L'Ahp est plus efficace dans la capacité à dégrader le peroxyde d'hydrogène. Cependant l'Ahp est saturée à de faibles concentrations ($10^{-5}M$). Le rôle de la catalase, dont le turn-over est plus rapide, serait prédominant lors d'exposition à de fortes concentrations de H_2O_2 , lorsque la cellule n'est plus en mesure de fournir le NADH nécessaire à l'Ahp (Seaver and Imlay 2001). Cependant, ces deux enzymes sont régulées, chez *E. coli*, par un même régulateur de transcription OxyR qui une fois oxydé par l' H_2O_2 induit la synthèse d'Ahp et de la catalase (Imlay 2013). Le gène *oxyR* régule également l'expression de la protéine Dps impliquée dans la protection de l'ADN face au stress oxydant (Xia et al. 2017).

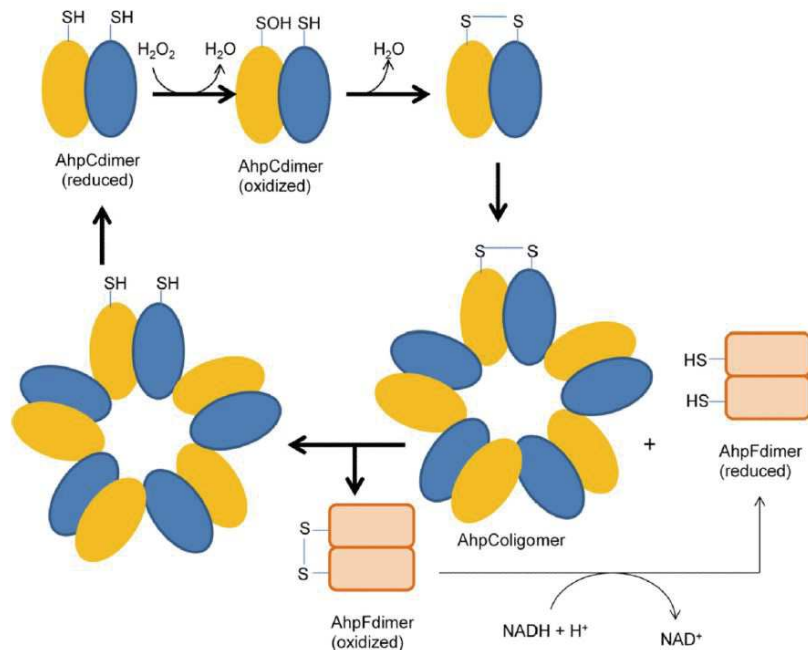


Figure 22 | Cycle enzymatique de l'alkylperoxyde réductase AhpCF

Au cours de la réaction, l' H_2O_2 oxyde les groupements thiol de deux cysteines conservées de AhpC formant ainsi un pont disulfure. Afin de restituer la conformation initiale d'AhpC, la flavoprotéine AhpF (une NADH : disulfure oxydoréductase) utilise du NADH pour réduire les ponts disulfures (Mishra et Imlay 2012).

OxyR est notamment présent chez *Vibrio cholerae* où il active positivement la peroxyrédoxine PrtxA et la protéine Dps (DNA-binding protein from starved cells) qui joue un rôle primordial pour les défenses contre le stress oxydatif (Xia et al. 2017). Par ailleurs, deux catalases extracellulaires KatG et KatB restaurent la capacité de résistance aux ROS du mutant ΔoxyR . De plus la coinfection du mutant avec la souche sauvage, mais pas avec le mutant $\Delta\text{KatG-KatB}$, complémente le défaut de colonisation de ΔoxyR observé *in vivo*. Ces résultats suggèrent que les catalases et le gène *oxyR* jouent un rôle primordial dans la résistance aux ROS et dans la virulence (Wang et al. 2012). Plus récemment une étude a montré l'existence d'un homologue de OxyR chez *V. cholerae* appelé OxyR2 qui active l'expression de l'alkyl hydroperoxidase AhpC qui est-elle même impliquée dans la régulation du gène OxyR rebaptisé OxyR1 (Wang et al. 2017a). Le génome du pathogène *V. vulnificus* code également pour deux OxyR, OxyR1 et OxyR2 qui active les peroxyrédoxines Prtx1 (AhpC de *V. vulnificus*) et Prxt2 respectivement (Kim et al. 2014, Bang et al. 2016). L'enzyme Prtx1 est exprimée en présence de H_2O_2 qu'elle réduit avec l'aide de la sous unité AhpF, elle-même régulée par OxyR1 (Baek et al. 2009). *V. parahaemolyticus* exprime quatre catalases KatE1, KatE2, KatG1 et KatG2 ainsi qu'une peroxyrédoxine AhpC. La catalase KatE1 est la principale enzyme détoxifiante de H_2O_2 extrinsèque en phase exponentielle de croissance et son activité est potentiellement complémentaire de la peroxyrédoxine AhpC (Chen et al. 2016a). La sous unité AhpC1 est nécessaire à la détoxification de l' H_2O_2 chez *V. parahaemolyticus* et son activité peut-être partiellement

complémentée par la sous unité AhpC2 (Chung et al. 2014). Le gène *oxyR* régule l'expression de KatE1 et AhpC1 et est nécessaire à la lutte contre les ROS (Chung et al. 2016).

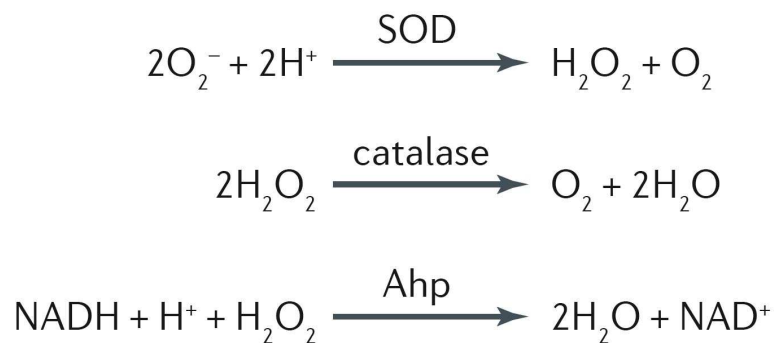


Figure 23 | Réaction enzymatique des enzymes antioxydantes SOD, Ahp et catalase.

La dismutation de l'ion hyperoxyde est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), ce qui a pour conséquence la synthèse de peroxyde d'hydrogène et de dioxygène. Le peroxyde d'hydrogène peut être éliminé par la catalase ou l'alkylhydroperoxide reductase (Ahp). L'Ahp utilisant le NADH+H⁺ comme cofacteur. Deux molécules d'eaux sont alors formées ainsi que du NAD⁺. La catalase utilise deux molécules de peroxyde d'hydrogène pour former de l'O₂ et deux molécules d'eau (Imlay 2013).

3.3.2.3.3 Le Régulon NorS et les enzymes détoxifiantes de l'oxyde nitrique.

Les bactéries utilisent de multiples mécanismes pour détoxifier l'oxyde nitrique (NO) synthétisé en grande quantité par la synthèse d'oxyde d'azote des phagocytes. Chez *E. coli*, plusieurs enzymes transforment le NO en composé azoté moins toxique pour la cellule : la réductase périplasmique du cytochrome C (*nrfA*) convertit le NO en ammonium (NH⁴⁺) ; la flavorubredoxine (*norV*) et la réductase d'oxyde nitrique dénitrifiante (*norB*) catalysent la conversion du NO en protoxyde d'azote (N₂O) ; alors que la flavohémoglobine (*hmp*) convertit le NO en N₂O ou en nitrate (NO₃⁻) (Stern and Zhu 2014). Chez *V. cholerae*, seul un homologue de la flavohémoglobine nommé HmpA possède une capacité dénitrifiante. L'expression de HmpA est contrôlée par le régulateur transcriptionnel NorS. Le gène *norS* contrôle aussi l'expression du gène *nrrS* qui code pour une protéine membranaire nécessaire à la résistance au NO *in vitro*. Les protéines HmpA et NorS sont nécessaires à la colonisation de l'intestin de la souris (Stern et al. 2012).

3.3.2.3.4 Inhibition de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

En parallèle des enzymes antioxydantes, certains pathogènes arborent une stratégie d'inhibition active de la production de ROS et de RNS. Parmi eux le pathogène intracellulaire facultatif *Franscilla Tularensis* et le pathogène intracellulaire obligatoire *Coxellia burnetti* inhibent le recrutement des sous unités du complexe de la NADPH oxydase et avec elle la production de ROS (McCaffrey and Allen 2006, Siemsen et al. 2009). Le pathogène *Yersinia* adopte une autre stratégie

en injectant la protéine YopE dans le phagocyte. Cet effecteur inhibe la phagocytose mais aussi la production des ROS en ciblant la voie des Rho GTPases (Songsunghong et al. 2010) (Pha and Navarro 2016). L'inhibition des ROS est une stratégie qui a également été rapportée chez les *Vibrio*. En effet, *V. parahaemolyticus* est un pathogène cytotoxique des cellules intestinales, capable d'induire une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et une inhibition la production de ROS et de NO (El-Malah et al. 2014). *V. parahaemolyticus* produit l'effecteur VopL qui provoque l'assemblage de filaments d'actines non fonctionnels ne pouvant plus assurer leur rôle dans la formation du complexe de la NADPH oxydase chez les cellules HeLa (de Souza Santos et al. 2017).

3.3.2.4 Homéostasie et mécanismes de résistance aux métaux

3.3.2.4.1 Mécanismes de résistance au cuivre

Afin d'échapper à la toxicité du cuivre utilisé par les phagocytes, les bactéries à Gram négatif utilisent différents mécanismes de tolérance au cuivre : (i) l'export du cuivre du cytoplasme vers le périplasme et le milieu extérieur ; (ii) la séquestration du cuivre par des protéines ; et (iii) l'oxydation du cuivre Cu(I) en Cu(II) moins toxique pour la bactérie (Ladomersky and Petris 2015, Ladomersky et al. 2017).

Plusieurs transporteurs ont été identifiés chez les bactéries à Gram négatif. Parmi eux on trouve les transporteurs de type ATPase incluant CopA chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, Golt chez *Salmonella typhimurium*, CopA1 (aussi appelé cueA) et CopA2 chez *Pseudomonas aeruginosa* et CtpV chez *Mycobacterium tuberculosis* (Ladomersky and Petris 2015, Neyrolles et al. 2015). Ces transporteurs exportent le Cu(I) du cytoplasme vers le périplasme en hydrolysant de l'ATP comme source d'énergie. Outre leur rôle dans la résistance au cuivre, ces transporteurs délivrent le cuivre aux enzymes périplasmiques qui le nécessitent (Osman et al. 2013). En plus, des transporteurs ATPases certaines bactéries comme *E. coli* possèdent un complexe quadripartite composé de CusABC et de la metallochaperone CusF qui exporte le cuivre du cytoplasme et du périplasme vers le milieu extérieur (Franke et al. 2003). Le complexe Cus est composé d'un transporteur de membrane interne utilisant les protons comme substrat (CusA) et d'une protéine formant un pore dans la membrane externe (CusC) reliées par la protéine CusB. La protéine CusF peut acquérir le cuivre directement auprès du transporteur CopA. Le cuivre séquestré par CusF peut être acquis par le complexe CusABC via CusB (Figure 24) (Kim et al. 2011). Le pathogène *M. tuberculosis* exporte le cuivre vers le milieu extérieur par la protéine formant des ports dans la membrane externe MctB (Wolschendorf et al. 2011).

Le rôle de ces transporteurs a été étudié chez plusieurs pathogènes. Chez *M. tuberculosis* la mutation des gènes *ctpV* et *mctB* induit une perte de virulence chez la souris et le cochon d'inde (Ward et al. 2010, Wolschendorf et al. 2011). De même, la mutation du gène *cueA* chez *P. aeruginosa* induit une augmentation de la sensibilité au cuivre et une perte de virulence chez la souris (Schwan et al. 2005). L'importance des gènes *copA* et *golT* a également été démontrée chez *Salmonella typhimurium*. En effet, la délétion des gènes *copA* et *golT* induit une perte de virulence chez la souris sauvage mais pas chez la souris dépourvue du transporteur Atp7a (Ladomersky et al. 2017).

Outre les transporteurs, les bactéries utilisent des protéines chaperonnes pour séquestrer le cuivre. La protéine CusF joue ce rôle en plus de celui décrit précédemment (Franke et al. 2003). De plus, bien que les métallothionéines soient rares chez les bactéries, une étude a montré que la métallothionéine MymT confère une résistance au cuivre à *M. tuberculosis* (Gold et al. 2008).

Les mécanismes de séquestration et d'efflux du cuivre sont couplés à une oxydation du Cu(I) en Cu(II) moins toxique. C'est pourquoi le périplasma contient des oxydases du cuivre qui protègent la bactérie de la toxicité du cuivre. Les oxydases CueO chez *E. coli* et MmcO chez *M. tuberculosis* ont été décrites comme conférant une tolérance au cuivre (Roberts et al. 2002, Rowland and Niederweis 2013). La mutation de *cueO* chez *S. typhimurium* induit un défaut de colonisation de la souris (Achard et al. 2010).

Les gènes *cueO* et *copA* sont régulés par un facteur de transcription appelé CueR alors que le gène *golT* est régulé par le facteur de transcription GolS (Pontel et al. 2007, Bittner et al. 2017). Chez *E. coli*, l'opéron *cusCFBA* est régulé par un système à deux composants impliquant le senseur périplasmique CusS et le régulateur transcriptionnel CusR (Munson et al. 2000).

Bien que les transporteurs du cuivre aient été peu étudiés chez les vibrios une étude de 2014 a montré que chez *V. fischeri* la perte des gènes *copA* et *cusC* induit un défaut de colonisation du calmar *E. scolopes* (Brooks et al. 2014).

3.3.2.4.2 Mécanismes de résistance au zinc

Le zinc est un métal de transition indispensable pour le métabolisme bactérien. Toutefois lorsqu'il est en excès comme dans le phagosome, il peut s'avérer toxique et les pathogènes doivent mettre en place des mécanismes de protections. C'est pourquoi les bactéries doivent maintenir une balance délicate entre avoir une quantité suffisante en zinc tout en limitant la concentration pour éviter des effets toxiques. Il existe deux types de transporteurs pour augmenter la concentration en zinc dans la cellule bactérienne : l'ABC transporteur ZnuABC et le transporteur ZupT qui fait partie de la famille des transporteurs ZIP que l'on retrouve également chez les eucaryotes. ZupT importe le

zinc dans des conditions où la quantité de zinc est modérée alors que ZnuABC intervient si la concentration en zinc est très faible. Le gène *zupT* est exprimé constitutivement chez *E. coli* et ZupT peut transporter également le fer. La régulation du transporteur ZnuABC dépend de la protéine Zur ainsi que de SoxR chez *E. coli* (Porcheron et al. 2013).

En parallèle, les bactéries utilisent des transporteurs qui exportent le zinc dans des conditions de forte concentration comme on peut les retrouver au sein du phagosome. Chez *E. coli*, la détoxification du zinc repose essentiellement sur le transporteur ZntA de type ATPase, sur les transporteurs ZitB et YiiP de type CDF (Cation Diffusion Facilitators), sur le transporteur MdtD qui fait partie de la famille des MFS (Major Facilitator Superfamily). Ces transporteurs exportent le Zn^{2+} du cytoplasme vers le périplasme (Porcheron et al. 2013). Il existe également une pompe à efflux du zinc RND nommée MdtABC qui expulse directement le Zn^{2+} du cytoplasme vers le milieu extérieur (Porcheron et al. 2013). L'efflux du zinc est contrôlé par le facteur de transcription ZntR de la famille des protéines Mer. L'expression de ZntA est régulée par ZntR lorsque la bactérie est exposée à de forte concentration contrairement à ZitB dont l'expression est constitutive (Figure 24) (Wang et al 2012). Par ailleurs l'expression des gènes *mdtA*, *mdtB*, *mdtC*, *mdtD* est contrôlée par un système à deux composants appelé BaeSR (Wang and Fierke 2013). Chez *M. tuberculosis* l'export du zinc se fait par le transporteur CtpC (Botella et al. 2011).

Les transporteurs du zinc ont été associés à la virulence chez plusieurs pathogènes comme *M. tuberculosis* et *S. enterica* (Botella et al. 2011, Ma et al. 2015). Chez les vibrios, le transporteur ZntA a été caractérisé chez *V. parahaemolyticus* et il est impliqué dans la cytotoxicité de la bactérie envers les cellules HeLa (Liu et al. 2013). Chez *V. cholerae*, deux ABC transporteurs (*znuABC* et *zrgABCDE*) ont été identifiés. Ils sont nécessaires à la colonisation de l'intestin chez la souris juvénile et adulte. Leur expression est contrôlée par le facteur de transcription Zur (Sheng et al. 2015).

3.3.2.4.3 Homéostasie du fer et du manganèse

Le fer et le manganèse sont des nutriments vitaux pour les bactéries car ils interviennent dans de nombreux processus biologiques. Toutefois, les pathogènes sont confrontés au fait que ces cations soient rarement libres au sein de l'hôte. C'est pourquoi, Ils ont développé des mécanismes d'acquisition de ces métaux basés principalement sur des ABC transporteurs, des molécules sécrétées comme les hémophores et les sidérophores qui ont une très grande affinité pour le fer et dont l'import dépend de systèmes de transduction de l'énergie comme le complexe TonB-ExbB-ExbD (Skaar 2010, Porcheron et al. 2013, Ma et al. 2015). Les sidérophores et les hémophores sont des petites molécules sécrétées qui possèdent une forte affinité pour le fer. Une fois qu'ils ont lié le fer, ils sont reconnus par des récepteurs à sidérophore/hémophore à la membrane externe et importés

dans le périplasma de manière énergie-dépendante grâce au couplage de leur récepteur au complexe TonB-ExbB-ExbD situé à la membrane interne (Skaar 2010, Payne et al. 2016). Une fois dans le périplasma, les complexes fer-sidérophores et fer-hémophores sont transportés vers le cytoplasme par des ABC transporteurs spécifiques (Forbes and Gros 2003, Skaar 2010, Ma et al. 2015). Le Fe^{2+} libre du périplasma peut également être transporté vers le cytoplasme par le transporteur FeoABC qui est présent chez de nombreux vibrios (Figure 24) (Payne et al. 2016).

Chez *E. coli* et *S. typhimurium*, l'import du Mg^{2+} est médié par des transporteurs de type NRAMP (MntH) et des ABC transporteurs (SitABCD et YfeABCD). Ces transporteurs pompent le Mg^{2+} du périplasma vers le cytoplasme. Le transport du manganèse au travers de la membrane externe reste peu compris à ce jour. Les transporters SitABCD et YfeABCD ont une affinité à la fois pour le Mg^{2+} et le Fe^{2+} (Porcheron et al. 2013). L'export du manganèse est bien moins connue néanmoins une pompe à efflux du Mg^{2+} (MntR) a été identifiée chez *E. coli* (Figure 24) (Waters et al. 2011).

Les vibrios notamment *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* et *V. vulnificus* possèdent plusieurs copies du gène *tonB* et produisent une grande variété de sidérophores tels que la Vibriobactine, la Vibrioferrine ou la Vulnibactine (Payne et al. 2016). Les sidérophores sont impliqués dans la virulence de *V. vulnificus* chez la souris (Litwin et al. 1996). Chez *V. anguillarum*, il existe deux copies du gène *tonB* dont seule la deuxième est nécessaire au transport du sidérophore Anguibactine et à la virulence (Stork et al. 2004). Le gène *tonB* est également nécessaire à la virulence de *V. alginolyticus* chez le poisson (Wang et al. 2008). De même, le transport du fer via les sidérophores et les hèmes joue un rôle important dans la virulence de *V. cholerae* (Henderson and Payne 1994). Par ailleurs, ces résultats ont été appuyés par une autre étude de Mey et ses collaborateurs en 2005. Ils ont identifié, chez *V. cholerae*, des transporteurs du fer (Feo et Fbp) dont l'expression est régulée par le facteur de transcription *fur*. De plus, *fur* est nécessaire à la colonisation de l'intestin de la souris et à la virulence de *V. cholerae* (Mey et al. 2005). Aucun transporteur du manganèse n'a été identifié chez les vibrios à l'exception de MneA. Le gène *mneA* est nécessaire à l'export du manganèse et pourrait jouer le même rôle que le gène non homologue *mntP* chez *E. coli*, toutefois son rôle dans la virulence n'a jamais été étudié (Fisher et al. 2016).

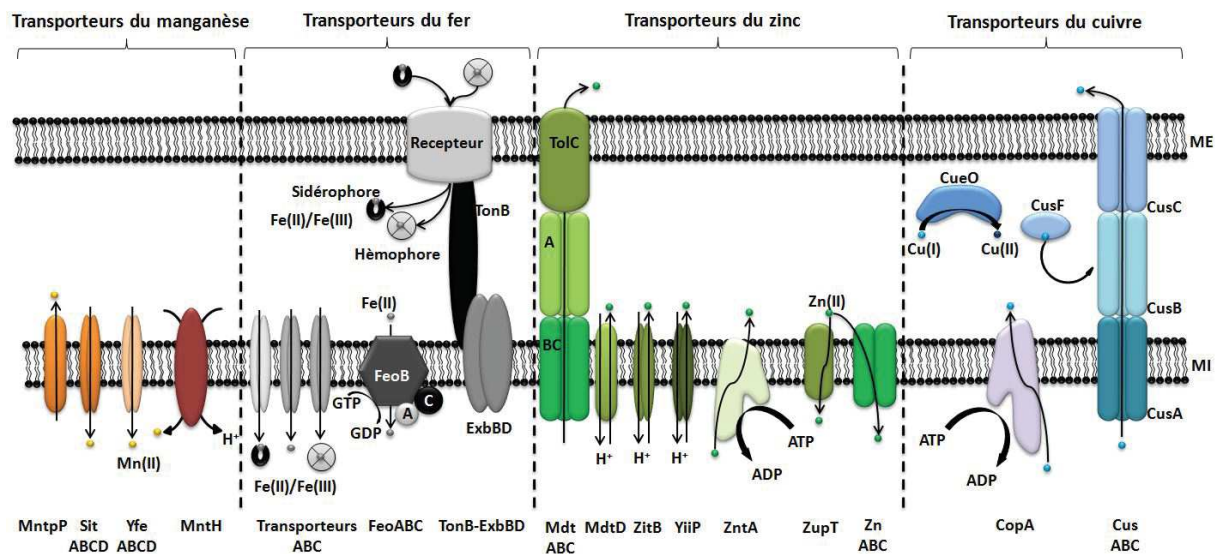


Figure 24 | Schéma des transporteurs des métaux chez les bactéries à Gram négatif.

L'homéostasie des métaux repose essentiellement sur des transporteurs qui effluent ou influent les métaux au travers de la membrane interne (MI) ou externe (ME). Le nom des transporteurs est indiqué au-dessous du schéma. Adapté de Skaar et al 2010, Porcheron et al 2013, Ma et al 2015, Ladomersky et Petris 2015 et Payne et al 2016.

CHAPITRE II: RESULTATS

CHAPITRE II: RESULTATS

Section A: Rôle essentiel de l'efflux du cuivre dans la survie intracellulaire, la colonisation de l'hôte et la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32

Sur la base des résultats précédents de l'équipe ayant montré (i) que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire des hémocytes d'huîtres (Duperthuy et al. 2011), et (ii) qu'il induit des dommages cellulaires importants aux hémocytes l'ayant phagocyté (Vanhove et al. 2015), nous sommes intéressés ici à la caractérisation des mécanismes de résistance et d'adaptation de LGP32 au milieu intra-phagosomal. Pour cela, nous avons mené une étude innovante dans laquelle nous avons couplé une approche de transcriptomique comparative avec une approche de biologie cellulaire à la fois *in vivo* et *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les interactions cytotoxiques LGP32/hémocytes à l'échelle cellulaire en prenant pour contrôle non virulent la souche *V. tasmaniensis* LMG20 012T. Dans un deuxième temps, afin d'identifier les fonctions impliquées dans la survie intrahémocytaire de LGP32 et dans sa cytotoxicité, nous avons réalisé une étude de transcriptomique comparative *in vitro*. Pour cela, nous avons établi le transcriptome de LGP32 en intracellulaire (après 1h de phagocytose), que nous avons comparé à son transcriptome extracellulaire, lorsque la souche est maintenue 1h en eau de mer stérile. Cette analyse comparative nous a permis d'identifier un certain nombre de gènes bactériens très fortement surexprimés en condition intracellulaire. Puis nous avons caractérisé l'implication fonctionnelle de ces gènes dans la survie intracellulaire, la cytotoxicité et la pathogénicité de LGP32 à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'approche globale utilisée a permis de montrer qu'au cours de son adaptation au milieu intraphagosomal LGP32 surexprime un grand nombre des gènes du métabolisme glucidique ainsi que des systèmes antioxydants et d'efflux du cuivre. Au cours de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que LGP32 devient cytotoxique pour les hémocytes uniquement après internalisation et que les systèmes d'efflux du cuivre jouent un rôle clé dans la survie intracellulaire, la cytotoxicité, et la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32.

Synthèse des résultats

Afin de caractériser de manière fine les interactions entre les hémocytes et LGP32 *in vitro*, nous avons mis au point un test permettant d'estimer la survie intracellulaire et la croissance du vibrio. Ce test est basé sur l'interaction entre des cultures primaires d'hémocytes et des vibrios exprimant la GFP de manière constitutive. Nos résultats ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est

capable de croître au contact des hémocytes à l'inverse de son plus proche voisin phylogénétique non virulent, *V. tasmaniensis* LMG20 012T. De plus, ni LGP32 ni LMG20 012T n'ont la capacité de croître en absence d'hémocytes. Ceci suggère fortement que l'interaction LGP32/hémocyte est nécessaire à la croissance du vibrio alors qu'elle ne permet pas à la souche non virulente (également phagocytée) de survivre et de croître.

Suite à ces observations, nous avons suivi la dynamique d'interaction entre les hémocytes et LGP32 en microscopie confocale dans les mêmes conditions. Nous avons observé que l'entrée rapide de LGP32 dans les hémocytes (plus de 30% des hémocytes ont phagocyté LGP32 en 1 heure) entraînait un stress cellulaire important (arrondissement et décollement des hémocytes) puis une perte de leur intégrité avec une lyse cellulaire dès 5 heures après le début de leur interaction contrairement à la souche non virulente. Afin de quantifier l'activité cytotoxique de LGP32 au cours du temps, nous avons mis au point un test en microplaque à l'aide du Sytox green qui émet une fluorescence verte en présence d'ADN lorsque les cellules sont perméabilisées, les cellules viables restant imperméables à ce composé. Le suivi de l'intensité de fluorescence du Sytox Green (Life Technologies) au cours du temps a montré que les hémocytes commençaient à être perméabilisés entre 5 et 7 heures après la phagocytose de LGP32. Par ailleurs, nous avons montré que l'activité cytotoxique de LGP32 était totalement inhibée en présence de la cytochalasine D, qui est un inhibiteur de la polymérisation d'actine F et qui permet d'inhiber l'activité de phagocytose des hémocytes. L'ensemble de ces résultats montrent donc **(i) que seule la souche virulente *V. tasmaniensis* LGP32 est cytotoxique pour les hémocytes, et (ii) que la phagocytose et la survie intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32 sont nécessaires à la cytotoxicité envers les hémocytes.**

Le stade intracellulaire de LGP32 apparaissant comme une étape critique de son mécanisme de pathogénèse, nous avons choisi de réaliser une analyse de transcriptomique comparative par RNAseq afin de caractériser les mécanismes d'adaptation de LGP32 au milieu intraphagosomal. Les transcrits de LGP32 ont été obtenus à partir d'une monocouche d'hémocytes ayant phagocyté *V. tasmaniensis* LGP32 (1h de contact). Le niveau d'expression des gènes de LGP32 a été comparé avec celui de LGP32 extracellulaire maintenu pendant 1 h en eau de mer en absence d'hémocytes. Nous avons pu vérifier qu'à cette étape du processus, l'ensemble des vibrios sont dans un stade intracellulaire. Par ailleurs, les dommages aux hémocytes ne sont pas observés à ce stade. Les résultats du RNAseq ont montré une forte surexpression des gènes du métabolisme de LGP32 en intracellulaire avec en particulier une surexpression des gènes de la glycogénèse indiquant une importante activité métabolique cohérente avec la reprise d'une croissance cellulaire. De même, nous avons observé une forte induction des gènes de la biosynthèse de l'enveloppe, du LPS et de la capsule. Cette activité biosynthétique pourrait traduire là encore la reprise de croissance observée.

On peut également penser que cela traduit une défense contre les activités microbicides du phagosome qui attaquent particulièrement les membranes et induisent chez LGP32 la sécrétion de vésicules de membrane externe comme observé précédemment (Vanhove et al. 2015).

Toutefois, nous avons particulièrement focalisé notre attention sur la réponse au stress et l'homéostasie des métaux qui sont apparues parmi les fonctions les plus affectées dans la condition intracellulaire. Particulièrement, les gènes de la réponse antioxydante et l'homéostasie du cuivre sont ressortis parmi les plus fortement induits. En effet, parmi les 34 gènes surexprimés plus de 50 fois, 5 sont impliqués dans l'homéostasie du cuivre notamment ceux du système transporteur RND *cusCBAF* ainsi que celui de l'ATPase de type P *copA*. Parmi les systèmes antioxydants, on trouve le gène *sodA* qui code pour une superoxyde dismutase et les gènes *ahpC/ahpF* qui codent pour une alkylhydroperoxydase. Cette analyse a révélé que ***V. tasmaniensis* LGP32 semble s'adapter au milieu intraphagosomal en mettant en jeu différents mécanismes de résistance via des modifications de la structure de son enveloppe et de la régulation de systèmes de détoxification de différents composés toxiques comme les ROS et le Cuivre. L'ensemble de ces mécanismes de résistance soutende très probablement la forte reprise d'activité métabolique observée pour LGP32 lors de stades intrahémocytaires relativement précoces.**

Dans le but de valider l'implication fonctionnelle des gènes identifiés au cours de l'analyse en transcriptomique comparative, des mutants isogéniques ont été produits par délétion de plusieurs gènes. Parmi les gènes étudiés par mutagenèse, nous nous sommes particulièrement intéressés aux systèmes de résistance au stress oxydant et de détoxification des métaux en étudiant les mutants des gènes suivant : *copA* (VS_0768), *cusA* et *cusB* (VS_110517, VS_0515), *ahpC* (VS_2126), *tsa* (VS_110625), *sodA* (VS_291). Nous avons également étudié le double mutant du gène *ahpC* et de la seconde copie du gène *ahpC* (*tsa*). Le phénotype des différents mutants a été analysé à l'aide des tests de survie intracellulaire et de cytotoxicité *in vitro*. Nous avons ainsi pu montrer que la délétion des gènes *sodA* et *copA* induisait une diminution de la survie intracellulaire et une perte de la cytotoxicité de LGP32. De plus, la complémentation en trans avec un plasmide pMRB exprimant *sodA* ou *copA* a permis de restaurer la capacité de survie intracellulaire et la cytotoxicité des mutants $\Delta sodA$ et $\Delta copA$ respectivement. Le mutant $\Delta copA$ s'est également montré plus sensible que la souche sauvage au cuivre *in vitro* validant ainsi le rôle de cette ATPase de type P dans la résistance de LGP32 au cuivre. A l'inverse, nous n'avons pas observé de modification significative du phénotype des mutants $\Delta cusAB$, $\Delta ahpC$ et $\Delta ahpC/tsa$. **Ces résultats indiquent que la superoxyde dismutase SodA et de la pompe à efflux CopA jouent un rôle majeur dans la survie de LGP32 à l'intérieur du phagosome et donc par conséquent à sa cytotoxicité *in vitro*.**

Afin de vérifier l'implication potentielle de SodA et de CopA au cours de la pathogénèse induite par LGP32, nous avons caractérisé les phénotypes des mutants $\Delta sodA$ et $\Delta copA$ dans des expériences d'infections expérimentales sur des huîtres juvéniles. A ce jour, la seule manière standardisée de phénotyper la virulence des souches du clade Splendidus chez l'huître reste l'injection intramusculaire, qui a le défaut de contourner les barrières physiques de l'huître. Néanmoins, nous avons pu révéler par cette méthode des phénotypes importants pour nos mutants, sans doute parce que la survie à la phagocytose est un trait phénotypique majeur dans l'interaction pathogène *V. tasmaniensis* LGP32/*C. gigas*. Ainsi, la perte du gène *copA* a induit une perte de virulence significative, contrairement à la délétion du gène *sodA*. En effet, le taux de mortalité de 85% avec la souche sauvage est réduit à 65% de la cas du mutant $\Delta copA$.

Pour essayer de mieux comprendre l'implication de CopA dans la virulence de LGP32 *in vivo*, nous nous sommes aussi intéressés à son rôle dans la capacité de colonisation de LGP32, ainsi que son implication dans les dommages induits aux hémocytes au cours de l'infection. Pour estimer la capacité de colonisation de la souche sauvage ou délétée de *copA*, nous avons injecté la souche sauvage LGP32 et la souche mutante $\Delta copA$ exprimant la GFP dans des huîtres que nous avons broyées et étalées sur boîtes sélectives pour compter le nombre de bactéries cultivables ayant colonisées les tissus de l'huître 2h après l'injection. Les résultats montrent que le mutant $\Delta copA$ présente un défaut de colonisation significatif des huîtres par rapport à la souche sauvage. Pour compléter ces données, nous avons aussi réalisé des expériences de mesure de l'index de compétition entre la souche sauvage et le mutant $\Delta copA$ exprimant la GFP ou la mCherry afin de suivre chaque fond génétique. Les résultats ont montré que le mutant était totalement éliminé de l'huître dès 2h durant la coinfection avec la souche sauvage indiquant un défaut important de fitness *in vivo* pour le mutant $\Delta copA$. De même nous avons observé en imagerie confocale et en spectrofluorimétrie (internalisation du Sytox green) que la cytotoxicité du mutant $\Delta copA$ vis à vis des hémocytes était largement diminuée par rapport à celle observée dès 2h après injection de la souche sauvage de LGP32, confirmant ainsi les résultats obtenus *in vitro*. L'ensemble de ce travail a ainsi permis de montrer que **le gène *copA* est nécessaire à la colonisation de l'hôte, à la virulence et la cytotoxicité de LGP32 *in vivo*.**

Pour conclure, cette étude montre pour la première fois que l'efflux du cuivre est essentiel à LGP32 pour son adaptation à la vie intracellulaire dans l'hémocyte, et donc à son activité cytotoxique qui dépend de son entrée via la phagocytose, ainsi qu'à ses capacités de colonisation et de virulence *in vivo*. Ces résultats rappellent les mécanismes de survie intracellulaire des mycobactéries dans les macrophages humains et indiquent indirectement que comme les

macrophages humains, les hémocytes de l'huître sont des phagocytes professionnels qui utilisent l'influx de cuivre dans le phagosome comme mécanisme microbicide.

Le rôle des antioxydants (notamment le gène *sodA*) dans la cytotoxicité de LGP32 nous a également amenés à mesurer le burst oxydatif des hémocytes d'huîtres confrontés à la souche sauvage et à ses mutants isogéniques $\Delta sodA$, $\Delta ahpC$ et $\Delta\Delta ahpC/tsa$. Pour cela, nous avons mis au point un test de mesure de production de ROS *in vitro*. Toutefois, ni la souche souche ni les mutants n'ont permis d'induire un burst oxydatif significatif chez les hémocytes contrairement aux particules de zymosan, utilisées comme contrôle positif. Nous n'avons donc pas pu trancher cette question. En revanche, le développement de ce test a permis une collaboration avec d'autres membres de l'équipe dans le cadre des travaux de thèse d'Aurore Poirier qui a montré que LGP32 induisait la libération de pièges d'ADN extracellulaires par les hémocytes (Poirier et al. 2014). Nous avons en effet pu prouver que ce phénomène était médié par les ROS hémocytaires dont la production est bloquée par le Diphénylèneiodonium (DPI). Nous avons ainsi pu conclure à la conservation de l'implication de la production de ROS dans le mécanisme de formation des pièges extracellulaires d'ADN chez la majorité des organismes pour lequel ce mécanisme a été décrit (Poirier et al. 2014).

Publication 1

Copper homeostasis at the host vibrio interface : lessons from intracellular vibrio transcriptomics

Audrey S. Vanhove, Tristan P. Rubio, An N. Nguyen, Astrid Lemire, David Roche, Elena Disconzi, Evelyne Bachère, Frédérique Le Roux, Annick Jacq, Guillaume M. Charrière et Delphine Destoumieux-Garzon

Environmental microbiology, 2016

Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics

Audrey S. Vanhove,^{1†} Tristan P. Rubio,^{1†}
An N. Nguyen,² Astrid Lemire,^{3,4} David Roche,^{5,6}
Julie Nicod,¹ Agnès Vergnes,¹ Aurore C. Poirier,¹
Elena Disconzi,² Evelyne Bachère,¹
Frédérique Le Roux,^{3,4} Annick Jacq,²
Guillaume M. Charrière^{1‡} and
Delphine Destoumieux-Garzón^{1*‡}

¹*Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE), UMR 5244, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, Université de Montpellier, Montpellier 34095, France.*

²*Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay Cedex 91405, France.*

³*Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, Plouzané 29280, France.*

⁴*UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, Sorbonne Université, CS 90074, Roscoff cedex 29688, France.*

⁵*Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Génomique (IG), Génoscope, Evry cedex 91057, France.*

⁶*CNRS, UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatiques en Génomique et Métabolisme (LABGeM), Evry cedex 91057, France.*

Summary

Recent studies revealed that several vibrio species have evolved the capacity to survive inside host cells. However, it is still often ignored if intracellular stages are required for pathogenicity. Virulence of *Vibrio tasmaniensis* LGP32, a strain pathogenic for *Crassostrea gigas* oysters, depends on entry into hemocytes, the oyster immune cells. We investigated here the mechanisms of LGP32 intracellular survival and their consequences on the host–pathogen inter-

action. Entry and survival inside hemocytes were required for LGP32-driven cytolysis of hemocytes, both *in vivo* and *in vitro*. LGP32 intracellular stages showed a profound boost in metabolic activity and a major transcription of antioxidant and copper detoxification genes, as revealed by RNA sequencing. LGP32 isogenic mutants showed that resistance to oxidative stress and copper efflux are two main functions required for vibrio intracellular stages and cytotoxicity to hemocytes. Copper efflux was also essential for host colonization and virulence *in vivo*. Altogether, our results identify copper resistance as a major mechanism to resist killing by phagocytes, induce cytolysis of immune cells and colonize oysters. Selection of such resistance traits could arise from vibrio interactions with copper-rich environmental niches including marine invertebrates, which favour the emergence of pathogenic vibrios resistant to intraphagosomal killing across animal species.

Introduction

Vibrios have long been considered extracellular organisms. However, an increasing number of studies show that some vibrio strains have evolved cell invasive properties. The capacity to survive in host cells was reported for vibrio strains pathogenic for humans. Examples include *Vibrio cholerae*, which survives in mouse cell lines (Duperthuy *et al.*, 2010), and *V. parahaemolyticus*, which disrupts the intestinal epithelium (Ritchie *et al.*, 2012) and can also invade and replicate in human HeLa cell line (Zhang *et al.*, 2012; de Souza Santos and Orth, 2014). Interestingly, in a few animal species, such vibrio intracellular stages have been associated with diseases. For example, the coral pathogens *V. shiloi* (Rosenberg and Falkovitz, 2004) and *V. coralliilyticus* (Vidal-Dupiol *et al.*, 2011) enter coral epithelial cells as part of their pathogenic process. Similarly, the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 enters oyster immune cells, the hemocytes, and this is required for virulence in oysters (Duperthuy *et al.*, 2011).

Survival in professional phagocytes requires evading or resisting the phagosome hostile environment. Multiple stresses are used by professional phagocytes to kill phagocytosed microorganisms (Flannagan *et al.*, 2009).

Received 4 August, 2015; revised 24 September, 2015; accepted 27 September, 2015. *For correspondence. E-mail: ddestoum@ifremer.fr; Tel. +33 467 14 46 25; Fax: +33 468 66 22 81. †Audrey S. Vanhove and Tristan P. Rubio contributed equally in this study. ‡Guillaume M. Charrière and Delphine Destoumieux-Garzón contributed equally in this study.

The NADPH oxidase produces potent reactive oxygen species (ROS) which are delivered into the phagolysosome during its maturation together with a series of hydrolytic enzymes and antimicrobial peptides. Moreover, an acidic environment is created by accumulating protons in the lumen of the phagosome. This environment is both aggressive to the phagocytosed bacteria and optimal for the activity of the hydrolytic enzymes. Such microbicidal mechanisms are broadly conserved throughout evolution (Boulais *et al.*, 2010) and they have been well described in oyster hemocytes (Bachere *et al.*, 2015).

While vibrio intracellular stages have been associated with the expression of key virulence factors (Ma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), it is still often unknown whether those stages play an essential role in pathological processes induced by vibrios. In the *V. tasmaniensis* LGP32/oyster interaction, where vibrios behave as facultative intravacuolar pathogens (Vanhove *et al.*, 2015), a tight correlation has been found between entry into host immune cells and virulence in experimental infections (Duperthuy *et al.*, 2010; 2011). We indeed previously showed (i) that the major outer membrane protein OmpU of LGP32 was required for efficient plasma opsonization, β -integrin recognition and subsequent entry into oyster hemocytes (Duperthuy *et al.*, 2011) and (ii) that *ompU*-deletion mutants were strongly attenuated in terms of virulence (Duperthuy *et al.*, 2010). We also observed important cell damages in hemocytes heavily loaded with LGP32 (Vanhove *et al.*, 2015), suggesting that phagocytosed LGP32 could be cytotoxic to oyster hemocytes. Supporting this hypothesis, some virulence factors were shown to be secreted by outer membrane vesicles released by LGP32 inside the phagosome (Vanhove *et al.*, 2015). To the best of our knowledge, it is so far the only model in which invasion of professional phagocytes by vibrios has been so clearly associated with disease expression *in vivo*. Therefore, this model offers a great opportunity to decipher the causal relationships between intracellular stages and virulence in vibrios and decipher the molecular bases of vibrio survival in the hostile environment of the phagosome.

Here, we took advantage of this model to characterize vibrio intracellular stages and identify key functions required for vibrio intracellular survival in immune cells. LGP32 cytotoxicity was found to depend upon entry and survival in oyster hemocytes. By comparative transcriptomics, we identified antioxidant responses and copper efflux as functions highly induced intracellularly. Their key role in intracellular survival and cytotoxicity to host immune cells was demonstrated genetically. Altogether, our results identify copper homeostasis as a key player in the vibrio/phagocyte interaction and copper efflux as a major vibrio adaptive trait for oyster tissue

colonization and virulence in oyster experimental infections.

Results

Phagocytosis and intracellular survival of LGP32 are required to induce cytolysis

Characterization of the *V. tasmaniensis* strain LGP32/hemocyte interactions at the cellular level was performed by infecting primary cultures of oyster hemocytes maintained in sterile sea water (SSW) with GFP-expressing strains opsonized in oyster plasma. Plasma-opsonized LGP32 grew significantly in hemocyte co-cultures ($P < 0.001$), unlike the phylogenically related LMG 20012^T (Thompson *et al.*, 2003), an avirulent control strain used in our previous study (Duperthuy *et al.*, 2011; Fig. 1A). However, plasma-opsonized LGP32 was unable to grow in SSW in the absence of hemocytes (Fig. 1A), which showed that hemocytes are required to support the growth of LGP32 in such a nutrient-poor environment. The hemocyte/vibrio interaction was then monitored over the first 5 h of contact by epifluorescence microscopy. After a 1 h contact, oyster hemocytes were already heavily loaded with either LGP32 or LMG 20012^T. After 3 h, most LGP32 were intravacuolar but some bacteria-containing hemocytes harbouring cellular alterations had lost adherence: they were found in the culture supernatant together with some extracellular vibrios. After 5 h, no more LGP32-containing hemocytes were adherent; several hemocytes were present in the supernatant and most of the LGP32 were extracellular (Figs 1B, Supporting Information Fig. S1). On the contrary, LMG 20012^T remained within hemocytes over the course of the experiment without any sign of hemocyte alteration. Therefore, LGP32 entry into hemocytes triggers a loss of hemocyte integrity leading to the release of LGP32 through cytolysis ~5 h after phagocytosis.

To quantify the LGP32-induced cytolysis of hemocytes, we used the cell impermeant Sytox green DNA dye. In agreement with our microscopy data (Fig. 1B), 5 to 7 h after LGP32 phagocytosis, hemocyte monolayers generated a massive Sytox green fluorescent signal as opposed to LMG 20012^T ($P < 0.001$; Fig. 1C). Thus, alteration of hemocyte membrane integrity is observed after LGP32 phagocytosis. Remarkably, cytochalasin D, an inhibitor of F-actin polymerization that prevents phagocytosis, abolished LGP32-induced hemocyte cytolysis (Fig. 1C). We concluded that cytotoxicity of LGP32 towards oyster hemocytes is strictly dependent on phagocytosis. Altogether, those results show that intracellular LGP32 resists to the hemocyte killing machinery, and within few hours becomes cytotoxic, thereby promoting a hemocyte cytolysis that could sustain its own growth.

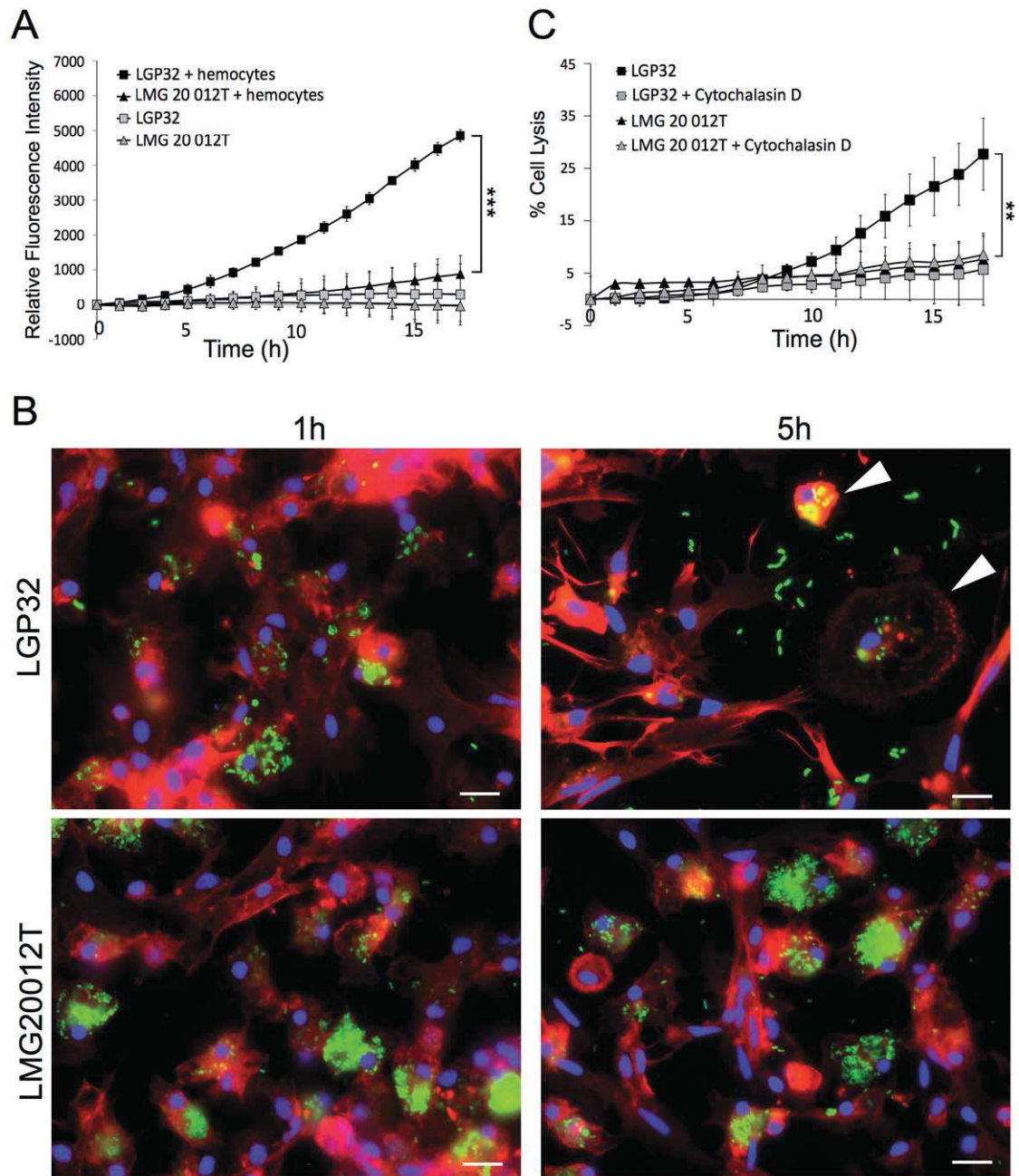


Fig. 1. Hemocyte phagocytosis and cytolysis support efficient replication of LGP32.

A. Phagocytosis-dependent growth of LGP32 in hemocyte co-cultures. In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LGP32 or the avirulent control LMG 20012^T. In controls, vibrios were incubated in SSW in the absence of hemocytes. Growth was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. Values are presented \pm SEM *** P < 0.001 (two-way rANOVA).

B. LGP32-induced hemocyte cytolysis and extracellular release of bacteria. Monolayers of hemocytes infected at a MOI of 50:1 with GFP-expressing LGP32 or LMG20012^T were observed 1 h and 5 h after contact. Both strains were rapidly phagocytosed. Major hemocyte lysis and release of extracellular vibrios was observed after 5 h upon exposure to LGP32 but not LMG 20012^T. Nuclei were stained with DAPI and actin cytoskeleton with phalloidin-TRIC. Scale bar: 5 μ m.

C. Phagocytosis-dependent cytolysis of hemocytes. Hemocyte monolayers were incubated with LGP32 or LMG 20012^T at a MOI of 50:1 for phagocytosis in the presence/absence of cytochalasin D. Hemocyte cytolysis was monitored by using cell impermeant Sytox green DNA dye. The percentage of hemocyte lysis was obtained by comparison with a Triton X100-included lysis (100% lysed hemocytes). Values are presented \pm SEM. ** P < 0.01 (RM-ANOVA).

Antioxidant responses and metal homeostasis genes are highly expressed intracellularly

To identify the mechanisms involved in LGP32 resistance to the hemocyte killing machinery and phagocytosis-dependent cytotoxicity, we used a global comparative RNAseq approach early after vibrio entry into hemocytes (1 h after phagocytosis). Transcripts of intracellular LGP32 were obtained from hemocyte monolayers and their relative level of expression was compared with that of transcripts of extracellular LGP32 obtained from vibrios kept in SSW alone. Out of 3230 genomic elements (not including rRNA genes), transcript levels of 1280 genes varied by more than fourfold in the intracellular condition, with a false detection rate of 5% in all triplicate conditions (Supporting Information Table S1; GEO Submission GSE73260). The RNAseq results were validated by qRT-PCR for 84% of the tested genes on another set of three independent experiments (Supporting Information Fig. S2). RNAseq revealed a massive activation of LGP32 metabolism inside the hemocytes. Indeed, the three functional categories that gathered most of the differentially expressed genes were *protein synthesis*, *carbon compound utilization and transport*, and *amino acid transport and metabolism*. An important up-regulation of genes involved in *glycogenesis*, *gluconeogenesis*, *TCA cycle*, as well as in *envelope*, *LPS* and *capsule biogenesis* was also observed (Supporting Information Table S1; Table 1).

Table 1. Functional categories referring to gene transcripts over/sub-represented in the intracellular condition.

Functional category	Number of genes
Protein synthesis	105/12
Carbon compound utilization and transport	83/31
Amino acid metabolism and transport	93/19
Transport (others)	22/41
Energy production and respiration	34/28
Stress response	25/32
Metal homeostasis	39/9
Nucleoside and nucleotide metabolism	30/5
Cofactor and small molecule carrier biogenesis	23/8
DNA replication, recombination and repair	21/9
Signalization	8/21
LPS and capsule biogenesis	21/7
Pilus biogenesis	18/10
Glycolysis/gluconeogenesis/TCA cycle	26/1
Virulence	10/13
Envelope biogenesis	15/6
Fatty acid and phospholipid metabolism	12/9
Central intermediary metabolism	13/3
Transcriptional regulation	6/7
Chemotaxis	9/3
Mobile genetic elements	0/11
Protein and peptide degradation	5/5
Cell division	6/0
DNA metabolism	2/3
Transcription	3/1
Motility	3/0

Finally, *stress response* and *metal homeostasis* were functions highly impacted by the intracellular environment.

Copper efflux and antioxidant genes were the most highly induced in the intracellular environment. Indeed, among 34 genes overexpressed more than 50 times (i.e. 0.8% of the transcriptome; Table 2), five genes were involved in copper efflux: *cusCBAF* (VS_II0514, VS_II0515, VS_II0516, VS_II0517) and *copA* (VS_0768), which encode a RND-transporter and a P-type ATPase respectively. Three additional genes were involved in the antioxidant response, namely *sodA* (VS_2918) and *ahpC/ahpF* (VS_2126, VS_2127), which encode a superoxide dismutase and an alkyl hydroperoxide reductase complex respectively. As RNAseq was performed in whole hemolymph, we evaluated the respective role of plasma versus the intracellular environment on the expression of candidate genes. As a control, vibrios were incubated in SSW for the same times. While the antioxidant genes *ahpC* and *sodA* were induced only after entry into hemocytes ($P < 0.01$), copper efflux genes *copA* and *cusB* were already induced in oyster plasma ($P < 0.01$). Still, after 1 h, *copA* expression remained 20 times higher in the intracellular condition than in the extracellular controls ($P < 0.01$; Fig. 2).

The antioxidant sodA gene is required for intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes

To determine whether the antioxidant response was necessary for LGP32 intracellular survival and phagocytosis-dependent cytotoxicity, we constructed deletion mutants lacking *sodA* (VS_2918) and *ahpC* (VS_2126). As a second copy of *ahpC* (VS_2126) referred to as *tsa* (VS_0593) was found in LGP32 genome (39.8% amino acid identity), we also constructed a Δ *ahpC/tsa* double mutant. Deletions were confirmed by PCR and sequencing (Supporting Information Fig. S3). Growth in Zobell medium or plasma and phagocytosis efficiency did not significantly differ from the wild-type LGP32 (Supporting Information Figs S4 and S5). Interestingly, for Δ *sodA*, but not Δ *ahpC* nor Δ *ahpC/tsa* (Supporting Information Fig. S6), we observed a strongly attenuated phagocytosis-dependent growth ($P < 0.001$) and cytotoxicity ($P < 0.001$) compared with the wild-type LGP32 (Fig. 3A and B). Complementation of Δ *sodA* with pMRB plasmids encoding *sodA* led to a dose-dependent restoration of the LGP32 cytotoxicity to hemocytes (Fig. 3B). Altogether, those results show the essential role of *sodA* in LGP32 resistance to phagocyte killing and subsequent cytotoxicity to hemocytes. However, the Δ *sodA* deletion mutant did not show any significant virulence attenuation in oyster experimental infections (Fig. 3C).

Table 2. List of the 34 transcripts enriched by more than 50 times in the intracellular condition.

Label	Product	log2 fold change
VS_II0905	Putative endoribonuclease, translation inhibitor	9.49
VS_II0514	Copper efflux outer membrane protein, <i>cusC</i>	9.2
VS_II0517	Periplasmic copper-binding protein, <i>cusF</i>	8.15
VS_II0904	Aldehyde dehydrogenase	7.65
VS_1283	Conserved hypothetical protein	7.26
VS_II0149	Phospholipase	6.96
VS_II1062	Secreted metalloprotease PrtV/InhA <i>prtV</i>	6.94
VS_2126	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C, <i>ahpC</i>	6.9
VS_2127	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F, <i>ahpF</i>	6.84
VS_II0515	Copper efflux membrane fusion protein, <i>cusB</i>	6.76
VS_1282	Putative methylcobalamin:homocysteine methyltransferase, <i>metE</i>	6.73
VS_2591	Maltodextrin transport system permease protein, <i>malC</i>	6.58
VS_1145	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate-homocysteine methyltransferase	6.55
VS_1068	Outer membrane protein	6.39
VIBSP2_misc_RNA_19	IGR VS_II0219-VS_II0220, <i>vsr217</i>	6.37
VS_2589	Cytoplasmic membrane-associated tetrahaem c-type cytochrome, <i>cymA</i>	6.33
VS_3121	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit, <i>purK</i>	6.33
VS_0992	Oligopeptide transport system permease protein <i>appC</i>	6.28
VS_2246	Putative succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	6.13
VS_1313	Putative tricarboxylate transport, <i>tctC</i>	6.12
VS_2244	succinate dehydrogenase, <i>sdhB</i>	6.06
VS_II0903	Putative dipeptidase	6
VS_1461	Cytochrome c oxidase subunit, <i>ccoQ</i>	5.93
VS_2585	Cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor	5.92
VS_0768	Copper-exporting P-type ATPase A, <i>copA</i>	5.87
VS_0175	Cold shock protein, <i>cspA</i>	5.84
VS_1967	Anthranilate synthase beta subunit, <i>trpD</i>	5.81
VS_2927	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain, <i>pyrB</i>	5.72
VS_II0545	Putative glycine betaine transporter, <i>betT</i>	5.71
VS_2382	D-methionine transport ATP-binding protein, <i>metN</i>	5.7
VS_2241	Succinyl-CoA synthetase beta chain, <i>sucC</i>	5.7
VS_II0516	Copper efflux membrane component, <i>cusA</i>	5.69
VS_2918	Superoxide dismutase, <i>sodA</i>	5.69
VS_2242	Dihydropolyllysine-residue succinyltransferase	5.66

See Supporting Information Table S1 for extensive list of differentially represented transcripts. Genes characterized in the present study are in boldface.

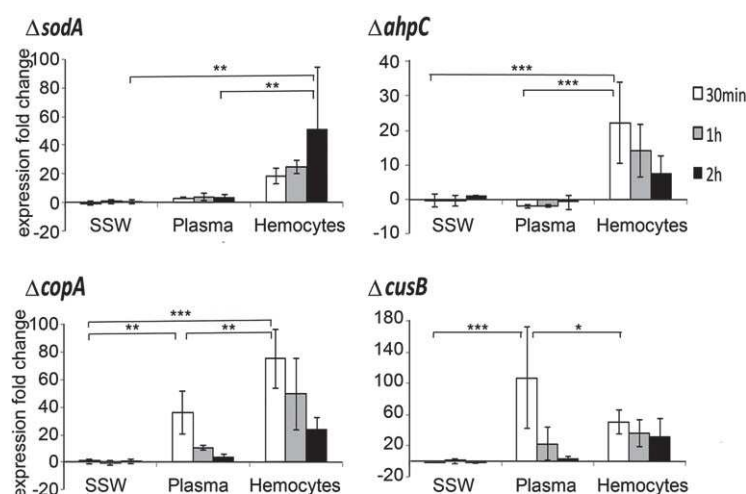


Fig. 2. Time-course of LGP32 antioxidant and copper efflux gene expression monitored by qRT-PCR. *Vibrio* gene expression was analysed for every time point in three independent experiments. Conditions included vibrios in SSW (control), vibrios in oyster plasma (opsonization) and intracellular vibrios in oyster hemocytes. Three incubation times were tested (30 min, 1 h, 2 h). Relative expression was calculated by normalization using three constitutively expressed genes VS_2913, VS_0852 and VS_II1055. Results were standardized relative to the control condition (vibrios in SSW). Data are the mean of gene expression in the three independent experiments \pm SEM. Data were analysed by two-way ANOVA and Tukey's post-test for multiple comparison, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

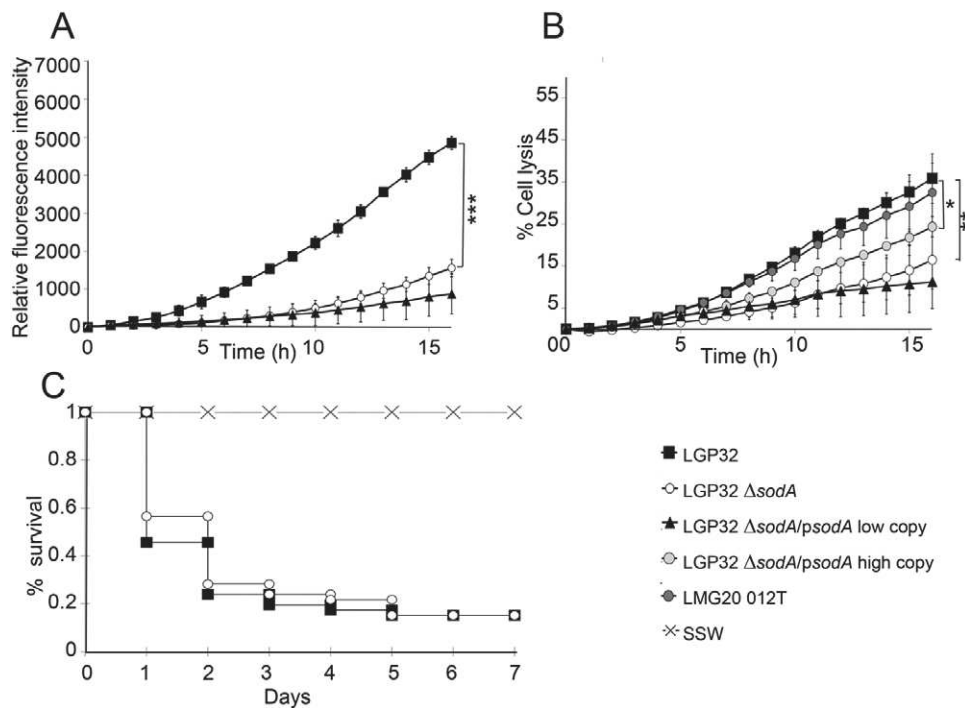


Fig. 3. *sodA* is required for intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes. In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LMG 20012^T (control), wild-type LGP32 or its $\Delta sodA$ isogenic mutants complemented or not with a low or high copy plasmid carrying *sodA*.

A. Phagocytosis-dependent growth of LGP32 was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. *** $P < 0.001$ (RM-ANOVA). B. Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. Values are presented \pm SEM. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ (RM-ANOVA). C. Kaplan–Meier survival curves were generated from oysters injected with 4×10^7 cfu per animal of the wild-type LGP32 or the $\Delta sodA$ isogenic mutant. An injection of sterile seawater (SSW) was used as control. Groups of 45 oysters (15 per seawater tank) were monitored for 7 days after infection. One experiment representative of three independent experiments is shown.

copA is required for copper resistance, intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes

Isogenic mutants lacking *copA* (VS_0768) or *cusAB* (VS_II0515, VS_II0516) were constructed (Supporting Information Fig. S3) to study the role of copper efflux in the intracellular survival and virulence of LGP32. Growth in Zobell medium or plasma and phagocytosis efficiency did not significantly differ from the wild-type LGP32 (Supporting Information Figs S4 and S5). Both deletion mutants were then tested for resistance to copper and zinc (as a control of metal specificity) by zone inhibition assay. $\Delta copA$ showed a major increase in susceptibility to copper compared with the wild-type LGP32, but remained equally susceptible to zinc (Supporting Information Fig. S7). Complementation with a pMRB plasmid carrying *copA* restored resistance to high copper concentrations. No significant difference was observed for the $\Delta cusAB$ mutant in our *in vitro* assays (Supporting Information Figs S7 and S8). In hemocyte co-cultures, the phagocytosis-dependent growth of LGP32 was strongly attenuated in the $\Delta copA$ mutant ($P < 0.001$; Fig. 4A). Moreover, the $\Delta copA$ mutant was two times less cytotoxic

than the wild-type LGP32 ($P < 0.001$; Fig. 4B). Importantly, complementation restored the cytotoxicity in hemocytes to wild-type levels (Fig. 4B). This confirmed the essential role of *copA* in LGP32 resistance to copper, intracellular survival and subsequent cytolysis of host cells.

copA is required for host colonization and virulence in experimental infections

In vivo studies were performed to characterize the role of *copA* in LGP32 pathogenesis. In experimental infections of juvenile oysters, the $\Delta copA$ mutant showed a significantly attenuated virulence. Indeed, mortalities at day 7 dropped from 85% for wild-type LGP32 down to 65% ($P < 0.01$) for the $\Delta copA$ mutant (Fig. 4C). To investigate the behaviour of the $\Delta copA$ mutant *in vivo*, colonization was tested by injecting juvenile oysters with GFP-labelled LGP32 or $\Delta copA$. The $\Delta copA$ mutant showed a significant colonization defect with only 5757 ± 4096 cfu g^{-1} of oyster flesh as opposed to $26\,700 \pm 4\,096$ cfu g^{-1} for LGP32 ($P < 0.05$), as soon as 2 h after injection (Fig. 4D). Importantly, confirming our *in vitro* data (Fig. 1B), LGP32

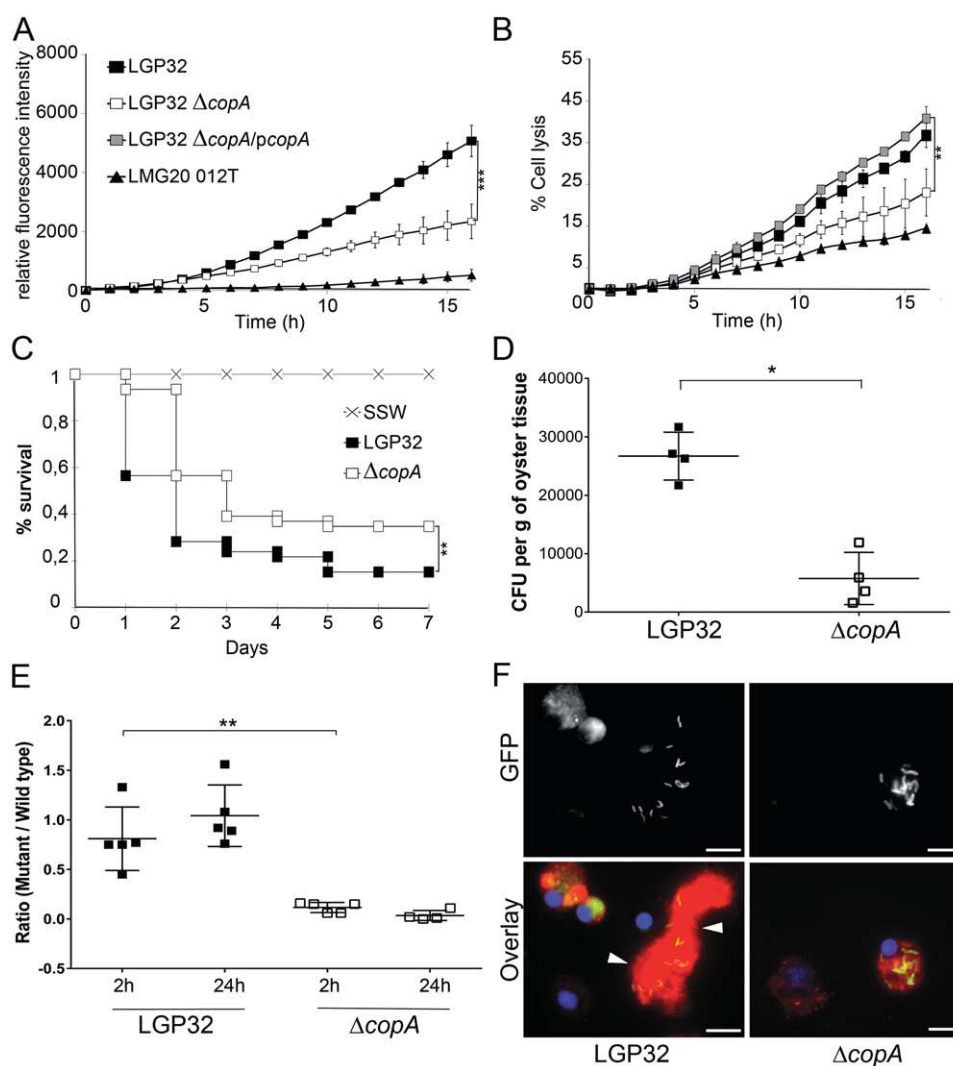


Fig. 4. *copA* is required for intracellular survival, cytotoxicity in phagocytes, host colonization and virulence. Phagocytosis-dependent growth (A), cytotoxicity (B) and virulence (C) of bacteria were monitored. In (C), Kaplan–Meier survival curves were generated from oysters injected with 4×10^7 cfu per animal of the wild-type LGP32 or the $\Delta copA$ isogenic mutant. One experiment representative of three independent experiments is shown. $**P < 0.05$ (log-rank test). Colonization (D) and competitive indexes (E) were tested by injecting juvenile oysters with fluorescent vibrios at 7×10^7 cfu per oyster and counting cfus from total oyster flesh either 2 h or 24 h after injection. Each dot represents one animal. For competitive indexes (E), the ratio between GFP-expressing $\Delta copA$ and mCherry-expressing LGP32 is shown in white boxes while the ratio between GFP-expressing LGP32 and mCherry-expressing LGP32 is shown in black boxes. For photographs of oyster hemolymph containing GFP-labelled vibrios 2 h after injection (F), oyster hemolymph was cytospun on a glass slide and stained with DAPI and TRITC-WGA. Arrowheads indicate LGP32 associated with cell debris.

induced a major cytolysis of oyster hemocytes and the release of extracellular bacteria *in vivo* (Fig. 4F), whereas $\Delta copA$ remained intracellular with most hemocytes showing preserved cell integrity (Fig. 4F). In agreement with the observed $\Delta copA$ colonization defect, $\Delta copA$ was massively and significantly ($P < 0.01$) outcompeted by the wild-type LGP32 in co-infection assays where oysters were injected with identical doses of GFP-expressing LGP32 and mCherry-expressing LGP32 or $\Delta copA$. We indeed measured very low competitive indexes

(CI) = 0.12 ± 0.05 and 0.03 ± 0.05 , 2 h and 24 h after injection respectively (Fig. 4E). Co-injection of GFP- and mCherry-expressing wild-type LGP32 gave CI~1 (0.81 ± 0.31 and 1.04 ± 0.31 at 2 h and 24 h, respectively), confirming the absence of bias due to the fluorescent protein expression plasmids used here (Fig. 4E). Altogether, these data show that copper efflux is essential for LGP32 survival in hemocytes, expression of intracellular cytotoxicity, host colonization and virulence in experimental infections.

Discussion

As an increasing number of pathogenic vibrio species have been shown to adopt intracellular stages (Rosenberg and Falkovitz, 2004; Duperthuy *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; de Souza Santos and Orth, 2014) understanding the mechanisms by which vibrios survive intracellularly has become a priority. Here, we developed a transcriptomic analysis coupled to *in vitro* and *in vivo* functional genomics, through which we identified functions essential for vibrio intracellular survival. Overall, our study provides important insights in several aspects. First, it is to our knowledge the first global characterization of the molecular functions sustaining intracellular life in a vibrio strain whose virulence depends on its intracellular survival in phagocytes. Second, we functionally characterized the antioxidant response and metal homeostasis as two major functions widely conserved among vibrios and essential for vibrio intracellular stages. Third, we identified copper tolerance as a major determinant of vibrio fitness at the host-pathogen interface.

Vibrio tasmaniensis LGP32 was chosen in this study as it has evolved the capacity to survive in oyster hemocytes (Duperthuy *et al.*, 2011). Our present study showed that a phagocytosis step was required for LGP32 to finally induce cytolysis of oyster immune cells. Such an intracellular LGP32-driven cytolysis of hemocytes was dependent on LGP32 entry and survival inside hemocytes, as demonstrated with phagocytosis-inhibiting drugs or mutants impaired in intracellular survival. Since circulating phagocytes were highly damaged in infected oysters, the LGP32-driven cytolysis of oyster hemocytes could cause a dramatic immune suppression of oyster defences promoting pathogenesis.

Oyster hemocytes are immune cells equipped with a complete panel of microbicidal functions (Bachere *et al.*, 2015). In particular, they respond to phagocytosis by a rapid and massive oxidative burst highly toxic to phagocytosed microorganisms (Poirier *et al.*, 2014). Consistently, the antioxidant response was essential to LGP32 survival in the phagosome hostile environment. *sodA* (VS_2918) and *ahpC/ahpF* (VS_2126, VS_2127) were among the genes most highly induced intracellularly. Moreover, MnSOD (*sodA* gene product) was essential for LGP32 intracellular survival and cytotoxicity in oyster phagocytes. By catalysing the conversion of the highly toxic superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) to H_2O_2 and dioxygen (O_2) SODs contribute to tolerance to oxidative stress (Kang *et al.*, 2007) and resistance to acidic pH (Kim *et al.*, 2005) in diverse vibrio species. In *V. vulnificus*, signals inducing MnSOD expression include low iron and acidic pH (Kim *et al.*, 2005), which are signals likely encountered by LGP32 in the phagosome as an active influx of iron and

efflux of cations is observed (Supporting Information Table S1).

We report here the essential role of a MnSOD in the intracellular survival of a vibrio species, whereas in the coral pathogen *V. shiloi*, a FeSOD contributes to survival in coral ectodermal cells (Banin *et al.*, 2003). Interestingly, in *Escherichia coli*, MnSOD is expressed under iron-limiting conditions, when FeSOD is repressed (Niederhoffer *et al.*, 1990). This may explain why MnSOD plays a crucial role in LGP32 intraphagosomal stages, where iron is scarce as indicated by the intracellular activation of iron uptake (Supporting Information Table S1). From our present data and studies on *V. shiloi* (Banin *et al.*, 2003), Fe and MnSODs, which share a common ancestor, are required for intracellular survival of at least two pathogenic vibrio species. As they are highly conserved across vibrios, they could be involved in the intracellular survival of additional vibrio species.

One major result of our work is the identification of the essential role of metal homeostasis and copper efflux in particular in vibrio intracellular life and subsequent cytotoxicity, colonization and virulence in oyster experimental infections. However, in the last decade metal homeostasis has been highlighted to play a role in different bacterial pathogenesis in vertebrates (Becker and Skaar, 2014). Among the different metals involved at the host-pathogen interface, the toxicity of copper appears to be mainly used as a defence mechanism by hosts. Hence, copper efflux is an important mechanism for pathogens to avoid copper toxicity. Indeed, free copper enhances the production of reactive oxygen species (ROS) that create damages to a broad series of macromolecules and largely contribute to copper antimicrobial properties (Hodgkinson and Petris, 2012). In H_2O_2 -rich environments like the phagosome, the redox properties of Cu(I) catalyse the generation of highly toxic hydroxyl radicals (OH^{\cdot}). Consistent with its major protective role against hemocyte intracellular killing, CopA (VS_0768) of LGP32, a member of the P-type ATPase family exporting Cu(I) across the plasma membrane (Hodgkinson and Petris, 2012), was highly transcribed in the phagosome. P-type ATPases homologous to CopA have been described in diverse species of intracellular bacteria like *Salmonella* (CopA; Espariz *et al.*, 2007) and *Mycobacterium* (CtpV) that invade mammalian phagocytes (Rowland and Niederweis, 2012). As in oyster hemocytes, genes encoding copper-exporting P-type ATPase are upregulated by such pathogens when they enter phagosomes of macrophages (Chaturvedi and Henderson, 2014) in which copper concentration increases up to several hundred micromolar (Wagner *et al.*, 2005).

The major role of CopA in LGP32 intracellular survival strongly suggests that phagosomes of oyster hemocytes accumulate copper to control phagocytosed pathogens

and supports recent findings showing that both hosts and pathogens manipulate copper content in infected host niches (Chaturvedi and Henderson, 2014; Chaturvedi *et al.*, 2014). In particular, mammalian phagocytes have been shown to modulate the intraphagosomal concentration of metals, by depriving microorganisms from essential metals like iron or accumulating toxic metals like copper (Hood and Skaar, 2012). Thus, in human macrophages, metal homeostasis is essential for the control of phagocytosed bacteria (Soldati and Neyrolles, 2012). The main effectors of copper influx in phagosomes of macrophages are CTR1 and ATP7A (Hodgkinson and Petris, 2012) whose expression is essential for the copper-mediated bactericidal activity of the phagosome (White *et al.*, 2009). Interestingly, three ATP7A and two CTR1 genes are found in the genome of *Crassostrea gigas* (Genbank accession numbers gbIEKC33905.1, gbIEKC18325.1, gbIEKC28422.1 and gbIEKC31900.1, gbIEKC33878.1). Thus, like mycobacteria replicating inside phagosomes (Neyrolles *et al.*, 2015), LGP32 uses copper efflux to resist the high copper concentrations to which it is exposed after phagocytosis. It has been hypothesized that copper detoxification has been conserved during evolution to provide protection against phagocytosis (Raimunda *et al.*, 2011; German *et al.*, 2013). This hypothesis is supported by the present data, which show that pathogens capable to survive inside phagocytes of invertebrates (here the oyster) use strategies similar to pathogens surviving inside macrophages of vertebrates. This high degree of conservation is consistent with the high conservation of the phagocytotic machinery that intracellular pathogens have to face, from protozoan to metazoan phagocytic cells (Boulais *et al.*, 2010). The major role of copper homeostasis at the host–pathogen interface may well go beyond its role in intracellular survival. Indeed, copper efflux was induced as soon as LGP32 entered oyster plasma and was essential for oyster colonization. This is consistent with the copper-rich composition of marine invertebrate plasma, which is characterized by abundant copper-containing proteins like Zn/Cu SODs in the oyster (Gonzalez *et al.*, 2005; Duperruy *et al.*, 2011) or hemocyanin in crustaceans and cephalopods (Terwilliger and Dumler, 2001) to which squid-colonizing vibrios resist (Kremer *et al.*, 2014). A recent study suggested that *copA* is required for the colonization of the squid light organ by *V. fischeri* (Brooks *et al.*, 2014). We show here for the first time the central role of *copA* in the pathogenic potential of a vibrio.

The gene *copA* is highly conserved among vibrios and to a broader extent among bacteria (Hernandez-Montes *et al.*, 2012). Hence, *copA* has been used to evaluate the impact of copper-rich environments on bacterial communities, suggesting that *copA* is under selection in copper-rich environments (Besaury *et al.*, 2013). In the wild,

copper accumulation often originates from human-related activities and numerous aquatic animals can accumulate copper in their tissues, including oysters (Luo *et al.*, 2014). Therefore, copper abundance in different environmental niches, including invertebrates as well as copper of natural or anthropogenic sources, may represent an important driver for the emergence of copper resistant pathogens. In conclusion, this study demonstrates the essential role of copper efflux and antioxidants in vibrio survival inside host cells and suggests that interactions of vibrios with different copper-rich environmental niches could select important adaptive traits favouring emergence of water-borne pathogens.

Experimental procedures

Animals

Adult diploid *C. gigas* were purchased from the local oyster farm in Le Petit Mas (Mèze, France) and used for RNAseq and qRT-PCR analyses. Adult triploid *C. gigas* were purchased from the local oyster farm at the 'CAT de Maguelone' (Palavas, France) to perform *in vitro* cell biology experiments. For experimental infections, juvenile diploid *C. gigas* oysters were provided by the Ifremer oyster hatcheries of Argenton and Bouin (France).

Bacterial strains and culture conditions

Vibrio isolates were grown in Zobell or on Zobell agar (Saulnier *et al.*, 2000), Luria-Bertani (LB) or LB-agar (LBA) + NaCl 0.5M, at 20°C. *E. coli* strains were grown in LB or on LBA at 37°C. Chloramphenicol (5–25 µg ml⁻¹), thymidine (0.3 mM) and diaminopimelate (0.3 mM) were added as supplements when necessary. Induction of the P_{BAD} promoter was achieved by the addition of 0.2% L-arabinose to the growth medium, and conversely, repression was obtained by the addition of 1% D-glucose.

Plasmid construction and mutagenesis

Mutagenesis was performed by gene replacement, as described in (Lemire *et al.*, 2014). Two independent PCR amplifications of the regions (500 bp) flanking the gene to delete were performed using two primer pairs (1 + 2 and 3 + 4; Supporting Information Table S2). An inside out PCR was performed using the pSW7848T suicide vector DNA (Val *et al.*, 2012) and primer pair pSW-F and pSW-R (Supporting Information Table S2). The recombinant plasmid was then assembled by the Gibson assembly method using the Gibson assembly master mix (New England Biolabs, NEB) according to the manufacturer's instructions. Mutants were screened by PCR using external primer 5 + 6 listed in Supporting Information Table S2. For complementation experiment, the gene of interest was cloned under the control of a constitutive P_{LAC} promoter in a pMRB plasmid (Le Roux *et al.*, 2011). Two independent PCR amplifications of the gene and plasmid were performed using the primers gene-F + R and pMRB-

F + *R* reciprocally. After purification and quantification, 100 ng of the PCR products were mixed with the Gibson assembly Master Mix and incubated for 60 min at 50°C. Samples were diluted 1/3 before *E. coli* transformation. Clones were controlled by digestion with restriction enzyme and sequencing of PCR products obtained using the primers described in Supporting Information Table S2. Strains π 3813 and β 3914 were used as plasmid hosts for cloning and conjugation respectively (Le Roux *et al.*, 2007). Conjugation was carried out as described in Goudenège *et al.*, 2014. Plasmids and strains used and/or constructed in the present study are presented in Supporting Information Table S2.

Preparation of vibrios and oyster hemocytes for in vitro assays

Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 ml syringe with a 23-G needle. After cell counting, freshly collected hemolymph was dispensed in wells to obtain hemocytes monolayers in the desired plate format (see below). In parallel, after growing vibrio strains at 20°C in Zobell medium for 14 h, bacteria were washed in sterile sea water (SSW) by two successive centrifugations (10 min, 1000 *g*, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of 2.10⁹cfu ml⁻¹ as deduced from OD₆₀₀ reads. When needed, bacteria were opsonized for one hour in 0.22 μ m filtered oyster plasma.

In vitro assay for vibrio intracellular survival

Hemocytes (2 × 10⁵ hemocytes per well) were plated in Black 96-wells plate with transparent flat bottom and kept in plasma. *Vibrio* strains carrying high copy pMRB-GFP plasmid (Supporting Information Table S2) were opsonized in oyster plasma. Opsonized vibrio strains were then added to the hemocyte monolayers at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 *g*. After 1 h of phagocytosis, hemocytes were carefully washed three times with SSW to remove any remaining extracellular bacteria. Then, GFP fluorescence was measured every hour over 20 h using a TECAN plate reader (λ_{ex} 480 nm/ λ_{em} 520 nm). In each experiment, each condition was performed in triplicates and the depicted results are the average of three independent experiments. Statistical analysis was performed using RM-ANOVA over the independent experiments.

In vitro cytotoxicity assay

Hemocytes (2 × 10⁵ hemocytes per well) were plated in Black 96-wells plate with transparent flat bottom. After 1 h of adhesion and plasma removal, 10 μ g ml⁻¹ of Sytox Green (Molecular Probes) diluted in 200 μ l SSW was added to each well. Opsonized vibrio strains were then added to the hemocyte monolayers at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 *g*. Sytox Green fluorescence was determined (λ_{ex} 480 nm/ λ_{em} 550 nm) every 30 min over 14 h using a TECAN microplate reader. For controls, washed bacteria were incubated in Sytox Green diluted in

SSW. Maximum cytolysis was determined by incubating hemocytes in Sytox Green in presence of 0.1% Triton X-100. To determine the role of phagocytosis in vibrio-induced cytolysis of hemocytes, hemocytes were incubated with 5 μ g ml⁻¹ of cytochalasin D, an actin polymerization inhibitor, 30 min before adding vibrios. The results are representative of three independent experiments. The RM-ANOVA test was used to estimate the *P*-values of the comparison.

Fluorescence microscopy

Hemocytes were plated onto glass coverslips in a 24-well plate to obtain monolayers of 5 × 10⁵ cells. After adhesion, hemocytes were exposed to GFP-expressing vibrios (washed in SSW) at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 *g*. After 1 h, 3 h and 5 h-incubation time, culture supernatants were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and cytospun on glass slides for 5 min at 1000 *g*. The cell monolayers (coverslips from bottom of the wells), were also fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Glass slides and coverslips were then washed in PBS and stained with 0.25 μ g ml⁻¹ DAPI (Sigma) and 0.5 μ g ml⁻¹ Phalloidin-TRITC (Sigma). Fluorescence imaging was performed using a Zeiss Axioimager fluorescence microscope and a Zeiss 63× Plan-Apo 1.4 oil objective equipped with a Zeiss MRC black and white camera for image acquisition.

Vibrio transcriptomic analysis by RNAseq

LGP32 was grown at 20°C in Zobell medium for 10 h and washed twice in SSW by centrifugations (10 min, 1000 *g*, 20°C). Bacteria were then resuspended in SSW at OD₆₀₀ of 0.5 (1.10⁹ cfu ml⁻¹ equivalent). Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 ml syringe with a 23-G needle. Freshly collected hemolymph was dispensed in a 6-well plate to obtain monolayers of 6 × 10⁶ hemocytes per well. One hour after plating, vibrios were added at a multiplicity of infection of 100:1, and plates were centrifuged for 5 min at 400 *g* for binding synchronization. After 1 h of co-incubation, wells were washed extensively three times with SSW to remove extracellular bacteria and 500 μ l Trizol reagent (Invitrogen) was added to every well for total RNA extraction. The efficiency of vibrios internalization in hemocytes was verified by microscopy showing that about 40% of hemocytes internalized about 50–70 bacteria, with rare bacteria remaining extracellular. As a control, washed bacteria were incubated in triplicates in SSW for 1 h and resuspended in Trizol after centrifugation. RNA from three independent experiments of LGP32 phagocytosis by hemocytes was extracted using the Trizol reagent protocol (Life Technologies). RNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) and RNA quality was monitored by agarose gel electrophoresis and a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). The bioanalyser analysis showed that bacterial RNAs represented approximately 10% of the total RNA in the intrahemocyte samples. Accordingly, control samples were prepared by mixing total RNA extracted from LGP32 incubated in SSW with *C. gigas* hemocyte RNA with a ratio of 1:9.

For each sample, 7 μ g of starting material was treated with DNaseI (4 U) (Ambion's DNA-free™) following the manufac-

urer's instructions. Samples were then enriched in bacterial RNA using the MICROBEnrich™ Kit (Ambion) and bacterial rRNA were then removed by the MICROBExpress™ Kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. Because the MICROBEnrich™ Kit is based on oligonucleotides that are designed to capture rRNAs from mammal species, it is not fully efficient to remove invertebrate rRNAs. Accordingly, we performed a further depletion step using a 5'-phosphate-dependent exonuclease (Terminator, Epicentre), that degrades processed transcripts, following instructions from the manufacturer. For cDNA sequencing, for each sample, a directional cDNA library was constructed and sequenced on an illumina HiSeq 1000, in paired-end reads of 2×100 bp. Three samples were multiplexed per lane giving $\sim 60 \times 10^6$ reads per sample. Out of 50–60 M reads obtained from the RNA-seq, 1.2 M reads from the SSW samples and 2.3 M reads from the intrahemocyte samples were successfully mapped onto the genome of LGP32.

Sequencing data analysis

Transcriptomic high throughput sequencing data were analysed using a bioinformatic pipeline implemented in the Microscope platform (Vallenet *et al.*, 2013). The current pipeline is a 'Master' shell script that launches the various parts of the analysis (i.e. a collection of Shell/Perl/R scripts) and controls for all tasks having been completed without errors. In a first step, the RNA-Seq data quality was assessed by including option like reads trimming or merging/split paired-end reads. In a second step, reads were mapped onto the *V. tasmaniensis* LGP32 genome (genome ID: 13995, assembly GCA_000091465.1, NCBI) using the SSAHA2 package (Ning *et al.*, 2001) that combines the SSAHA searching algorithm (sequence information is encoded in a perfect hash function) aiming at identifying regions of high similarity, and the cross-match sequence alignment programme (Ewing *et al.*, 1998), which aligns these regions using a banded Smith-Waterman-Gotoh algorithm (Smith and Waterman, 1981). An alignment score equal to at least half of the read is required for a hit to be retained. To lower false positives discovery rate, the SAMtools (v.0.1.8; Li *et al.*, 2009) are then used to extract reliable alignments from SAM formatted files. The number of reads matching each genomic object harboured by the reference genome is subsequently computed with the Bioconductor-Genomic-Features package (Carlson *et al.*, 2011). In case of reads matching several genomic objects, the count number is weighted in order to keep the same total number of reads. Finally, the Bioconductor-DESeq package (Anders and Huber, 2010) with default parameters is used to analyse raw counts data and test for differential expression between conditions. Out of the paired-end reads, only mapping results of the first sequencing run reads were used for the DESeq analysis.

qRT-PCR analyses

Experiments were performed as for 'Vibrio transcriptomic analysis by RNAseq'. Conditions tested were: 6×10^8 vibrios per well in SSW (control), vibrios in oyster plasma and vibrios opsonized in plasma and incubated on hemocyte monolayers (6×10^6 hemocytes per well) kept in SSW. Vibrios were incu-

bated 30 min, 1 h and 2 h before wells were centrifuged and the incubated stopped by adding 500 μ l Trizol per well. Total RNA was extracted from Trizol using the DirectZol RNA Miniprep kit (R2051) according to manufacturer's instructions (ZymoResearch) and then treated by DNaseI to remove contaminating genomic DNA, using the DNA-free kit (Ambion) before purification by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantification of total RNA was done with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo, Fisher Scientific) and quality was monitored using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). Real-time qPCR was performed either at the Imagif platform (Gif sur Yvette) on an ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System using a Fast SG qPCR Master Mix (Roboklon), or at the MGX platform in Montpellier using a the Light-Cycler 480 System (Roche), using the primers listed in Supporting Information Table S3. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (Pfaffl, 2001), with three genes, encoding 6PKF (VS_2913), MGS (VS_II1055) and CcmC (VS_0852) being used for normalization. These were chosen because their expression was found to be constant across conditions in the RNAseq, as well as by qRT-PCR.

Copper and zinc sensitivity

Paper discs (6 mm) were loaded with CuSO_4 by soaking them over-night into a 50 mM CuSO_4 solution or 50 mM ZnSO_4 solution. Cells from a stationary phase LGP32 wild-type and LGP32 isogenic mutant cultures at $\text{DO} = 1$ were washed twice with SSW before being spread onto agar plates containing 15 g L^{-1} bactopeptone and 0.5M NaCl. Using a sterile tweezer, copper and zinc impregnated disks were placed on the bacterial lawn before incubation at 20°C. After 5 day incubation, the diameter of the inhibition zone around the disk was measured.

Experimental infections of oysters

Experimental infections were performed at 20°C, as previously described (Duperthuy *et al.*, 2010). Groups of 45 oysters were injected with the different strains of LGP32 (4×10^7 cfu per spat). An equal volume of SSW was injected to control animals. Colony-forming units of bacteria were determined by counting on Zobell agar plates. For each condition, oysters were placed for 24 h in three separate tanks in 6 l of seawater (15 animals per aquarium). Mortalities were followed during 7 days. The non-parametric Kaplan–Meier test was used to estimate log-rank values for comparing conditions. All experimental infections were performed according to the Ifremer animal care guidelines and policy.

In vivo colonization and damages to host cells

After overnight growth in LB NaCl 0.5M containing 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, vibrio strains carrying high copy pMRB-GFP were washed twice with sterile sea water (SSW) by centrifugation for 15 min at 1500 g. Then, groups of 20 oysters were injected with wild-type or ΔcopA LGP32 (7×10^7 cfu per oysters). Two hours after injection, hemocytes were collected from the adductor muscle of five oysters and fixed

with 2% paraformaldehyde for 15 min and finally cytospun for 5 min at 1000 *g*. Samples were stained with 0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DAPI (Sigma) and 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ WGA-TRITC (Sigma). Fluorescence imaging was performed as described above. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann–Whitney test for comparing both conditions. Similarly, 2 h after injection, five additional oysters injected with each strain were weighed and homogenized by passage through a Dounce apparatus. Serial dilutions of the homogenized material in SSW were spread onto LB NaCl 0.5M agar plates containing 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, in duplicate. Colonies were counted after 2 days of growth at 20°C and results were expressed in number of colony forming units per gram of oyster.

In vivo competitive index

After overnight growth in LB NaCl 0.5M containing 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, wild-type or ΔcopA LGP32 carrying high copy pMRB-GFP and wild-type LGP32 high copy pMRB-mCherry were washed twice in SSW by centrifugation for 15 min at 1500 *g*. Then, groups of 40 oysters were injected with a 1:1 ratio of each strain (7×10^7 cfu per oysters). Two conditions were tested: GFP-wild-type/mCherry-wild-type (control) as well as GFP- ΔcopA /mCherry-wild-type. Five oysters of each condition were homogenized and plated on agar plates as for the colonization assay. Red colonies (wild-type) and green colonies (mutant) were counted and results were expressed as the ratio of mutant CFUs over wild-type CFUs. Statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons test for comparing conditions.

Acknowledgements

This study received financial support from the ANR (Vibriogen project, ANR-11-BSV7-0023). We thank Dr Stéphane Cruveiller and Dr Claudine Médigue for RNAseq supervision as well as Dr Julien de Lorgeril and Phillipe Clair for precious advice for qRT-PCR analyses. We thank Bruno Petton and Max Nourry from the Ifremer for providing standardized oyster spat for experimental infections. We thank Marc Leroy for technical assistance. We are indebted to the Montpellier RIO Imaging platform of the University of Montpellier. This work has benefited from the facilities and expertise of the high through put sequencing and the qPCR platforms of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif-www.imagif.cnrs.fr).

References

Anders, S., and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**: R106.
 Bachere, E., Rosa, R.D., Schmitt, P., Poirier, A.C., Merou, N., Charriere, G.M., and Destoumieux-Garzon, D. (2015) The new insights into the oyster antimicrobial defense: cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol* **46**: 50–64.
 Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J., and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* **46**: 418–422.

Becker, K.W., and Skaar, E.P. (2014) Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 1235–1249.
 Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, R., Ouddane, B., and Quillet, L. (2013) Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Mar Pollut Bull* **67**: 16–25.
 Boulais, J., Trost, M., Landry, C.R., Dieckmann, R., Levy, E.D., Soldati, T., et al. (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* **6**: 423.
 Brooks, J.F., 2nd, Gyllborg, M.C., Cronin, D.C., Quillin, S.J., Mallama, C.A., Foxall, R., et al. (2014) Global discovery of colonization determinants in the squid symbiont *Vibrio fischeri*. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 17284–17289.
 Carlson, M., Pages, H., Aboyoun, P., Falcon, S., Morgan, M., Sarkar, D., and Lawrence, M. (2011). In *Genomic Features: Tools for Making and Manipulating Transcript Centric Annotations*. Maintainer, B.P. (ed.). pp. 1–66.
 Chaturvedi, K.S., and Henderson, J.P. (2014) Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 3.
 Chaturvedi, K.S., Hung, C.S., Giblin, D.E., Urushidani, S., Austin, A.M., Dinauer, M.C., and Henderson, J.P. (2014) *Cupric yersiniabactin* is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem Biol* **9**: 551–561.
 Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., et al. (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* **12**: 951–963.
 Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., et al. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2993–2998.
 Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E., Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2007) Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* **153**: 2989–2997.
 Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175–185.
 Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**: 355–366.
 German, N., Doyscher, D., and Rensing, C. (2013) Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* **8**: 1257–1264.
 Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.C., Gueguen, Y., and Bachere, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1089–1097.
 Hernandez-Montes, G., Arguello, J.M., and Valderrama, B. (2012) Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiol* **12**: 249.
 Hodgkinson, V., and Petris, M.J. (2012) Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* **287**: 13549–13555.

- Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**: 525–537.
- Kang, I.H., Kim, J.S., and Lee, J.K. (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 1399–1402.
- Kim, J.S., Sung, M.H., Kho, D.H., and Lee, J.K. (2005) Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* **187**: 5984–5995.
- Kremer, N., Schwartzman, J., Augustin, R., Zhou, L., Ruby, E.G., Hourdez, S., and McFall-Ngai, M.J. (2014) The dual nature of haemocyanin in the establishment and persistence of the squid-vibrio symbiosis. *Proc Biol Sci* **281**: 20140504.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777–784.
- Le Roux, F., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2011) Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Res* **39**: 1004–1013.
- Lemire, A., Goudenege, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., and Le Roux, F. (2014) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* **9**: 1523–1531.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., and Huang, M. (2014) Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol* **38**: 318–329.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **5**: 234–243.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., and Niederweis, M. (2015) Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* **264**: 249–263.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* **172**: 1930–1938.
- Ning, Z., Cox, A.J., and Mullikin, J.C. (2001) SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res* **11**: 1725–1729.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P., et al. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem* **289**: 24821–24831.
- Raimunda, D., Gonzalez-Guerrero, M., Leeber, B.W., 3rd, and Arguello, J.M. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals* **24**: 467–475.
- Ritchie, J.M., Rui, H., Zhou, X., Iida, T., Kodoma, T., Ito, S., et al. (2012) Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS Pathog* **8**: e1002593.
- Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* **58**: 143–159.
- Rowland, J.L., and Niederweis, M. (2012) Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis (Edinb)* **92**: 202–210.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., and Vonau, V. (2000) Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Organ* **40**: 109–115.
- Smith, T.F., and Waterman, M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**: 195–197.
- Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s). *Traffic* **13**: 1042–1052.
- de Souza Santos, M., and Orth, K. (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *MBio* **5**: e01506–e01514.
- Terwilliger, N., and Dumler, K. (2001) Ontogeny of decapod crustacean hemocyanin: effects of temperature and nutrition. *J Exp Biol* **204**: 1013–1020.
- Thompson, F.L., Thompson, C.C., and Swings, J. (2003) *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst Appl Microbiol* **26**: 65–69.
- Val, M.E., Skovgaard, O., Ducos-Galand, M., Bland, M.J., and Mazel, D. (2012) Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet* **8**: e1002472.
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., et al. (2013) MicroScope – an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* **41**: D636–D647.
- Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charriere, G.M., Le Roux, F., Goudenege, D., Gourbal, B., et al. (2015) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* **17**: 1152–1165.
- Vidal-Dupiol, J., Ladriere, O., Destoumieux-Garzon, D., Sautiere, P.E., Meistertzheim, A.L., Tambutte, E., et al. (2011) Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *J Biol Chem* **286**: 22688–22698.
- Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., 3rd, Honer Zu Bentrop, K., et al. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* **174**: 1491–1500.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009) A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* **284**: 33949–33956.

Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., and Orth, K. (2012) Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* **1**: 453–460.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. LGP32-induced hemocyte cytolysis and release of bacteria.

Fig. S2. qRT-PCR validation of RNAseq data.

Fig. S3. PCR validation of gene deletions.

Fig. S4. Growth of LGP32 mutants in liquid growth medium.

Fig. S5. Phagocytosis of LGP32 mutants by oyster hemocytes.

Fig. S6. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B, C) of the Δ *ahpC* mutant and Δ *ahpC* Δ *tsa* double mutant.

Fig. S7. Increased susceptibility to copper of Δ *copA* but not Δ *cusAB* mutant.

Fig. S8. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B) of the Δ *cusAB* mutant.

Table S1. Differential expression of LGP32 transcripts from RNAseq data.

Table S2. Strains, plasmids and oligonucleotides.

Table S3. Oligonucleotides for qRT-PCR.

Supplemental figures

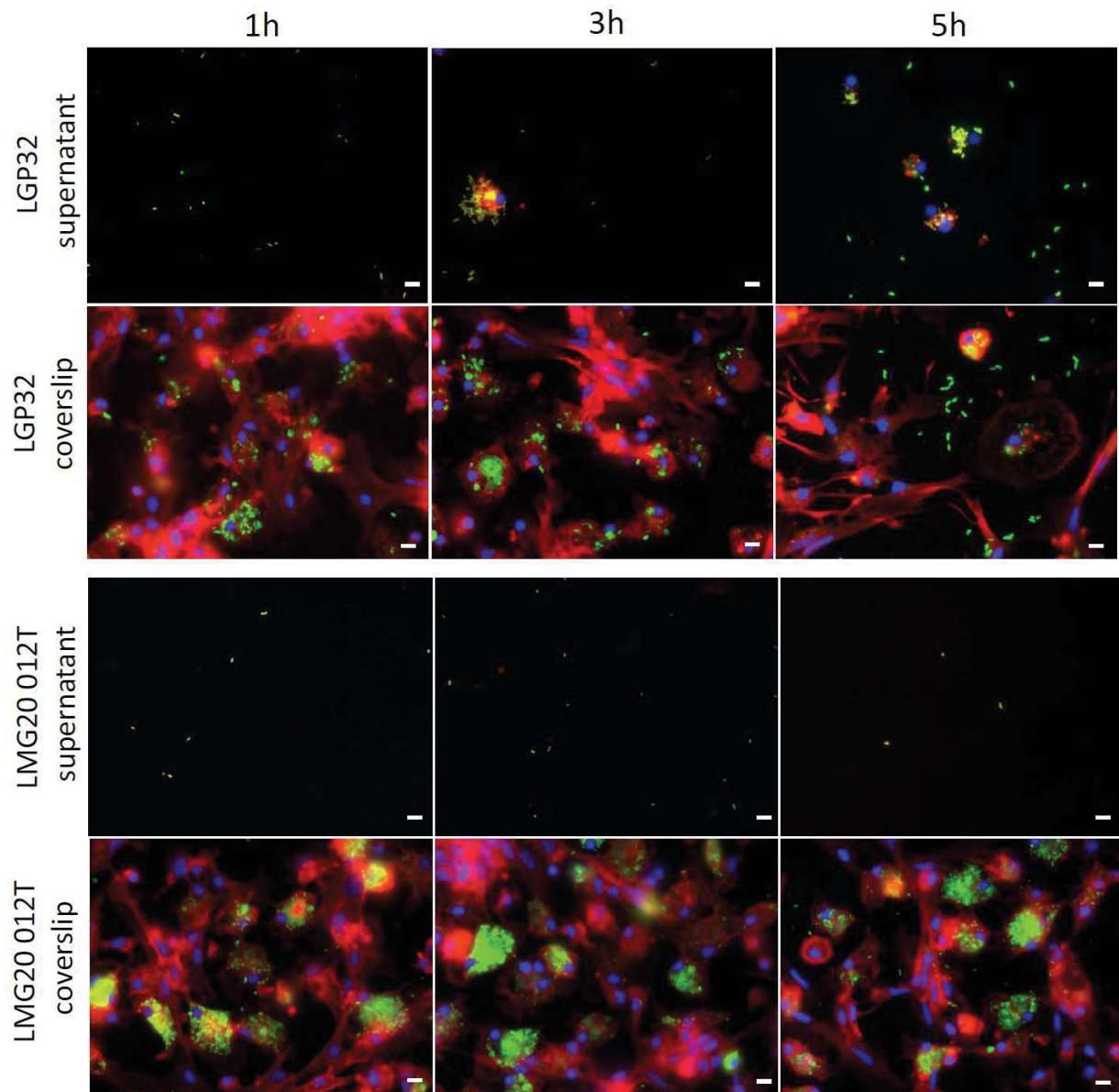


Figure S1 | LGP32-induced hemocyte cytolysis and release bacteria

Monolayers of hemocytes were observed 1h, 3h and 5h after phagocytosis of GFP-expressing LGP32 or LMG20012T at a MOI of 50:1. Both strains were rapidly phagocytosed with the majority of GFP expressing bacteria observed inside hemocytes. After 5h, major hemocyte damages as well as loss of cell adhesion were observed upon exposure to LGP32 only, floating hemocytes associated with GFP-LGP32 were observed in the supernatant. This correlated with the release of extracellular vibrios, as observed on both the coverslip and the culture supernatant. Nuclei were stained with DAPI and actin cytoskeleton with TRITC-phalloidin. Scale bar: 5 μ m.

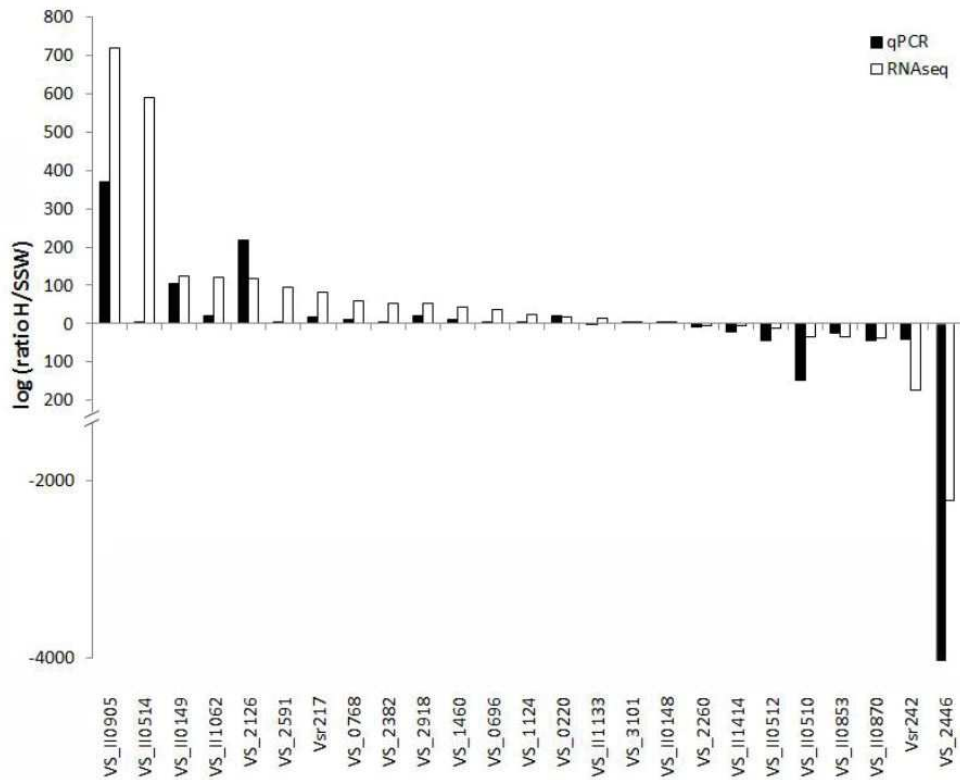


Fig S2. qPCR validation of RNAseq data

For each gene (x axis), the gene expression in the intracellular condition (hemocyte) relative to the extracellular condition (sterile sea water, SSW) is represented as a *black* and a *white* bar for qPCR and RNAseq data, respectively (y axis). H stands for hemocyte.

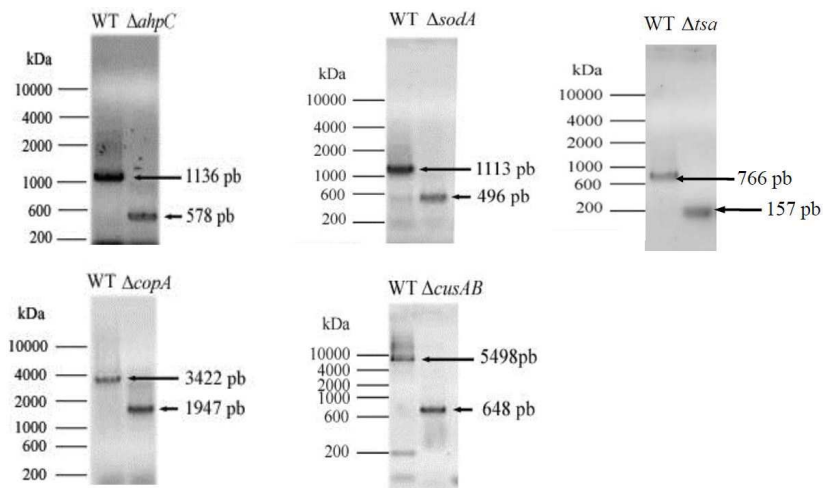


Fig S3. PCR validation of gene deletions

External primers were used to amplify the deleted genes in a wild-type (WT) and mutant background. In order to construct the double mutant *ahpC: tsa*, the *tsa* gene was deleted in a Δ *ahpC* background. The size of the expected amplicons, which is consistent with the observed size on agarose gel is indicated on the right. Primers used were VS_2126F1 and VS_2126R1 for *ahpC*, VS_2918F and VS_2918R for *sodA*, VS_0768F and VS_0768R for *copA*, VS_II0515F and VS_II0516R for *cusAB*, as well as VS_0593F1 and VS_0593R1 for *tsa* (see table S2).

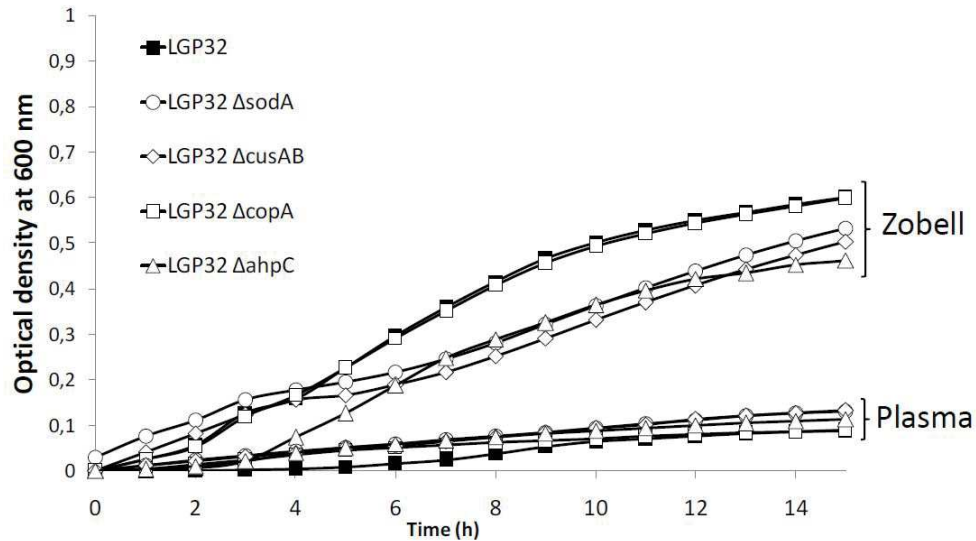


Fig S4. Growth of LGP32 mutants in liquid growth medium

LGP32 wild-type (black boxes) and isogenic mutants ($\Delta copA$, white boxes; $\Delta cusAB$, white diamonds; $\Delta sodA$, white circles; $\Delta ahpC$, white triangles) were grown for 17h in Zobell medium at 20°C. Absorbance was monitored at 600 nm in microplates containing 300 μ l of cultures. LGP32 isogenic mutants did not show any major growth defect.

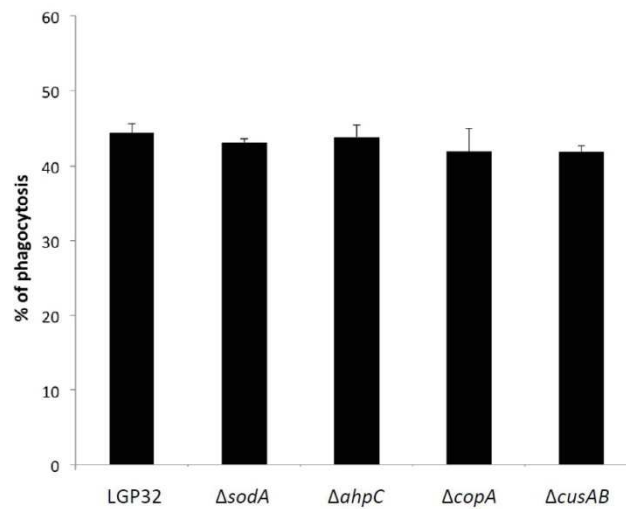


Fig S5. Phagocytosis of LGP32 mutants by oyster hemocytes

Phagocytosis efficiency of each vibrio strain by hemocytes was quantified by cytometry analysis. Living vibrio strains were FITC-labeled before incubation with oyster hemocytes at a MOI of 50:1 for 1 hour. After washing extracellular bacteria, cells were withdrawn using trypsin-EDTA and fixed with 4% PFA. Percentage of hemocytes containing FITC-labeled bacteria was determined by cytometry analysis. There was no significant difference between vibrio strains.

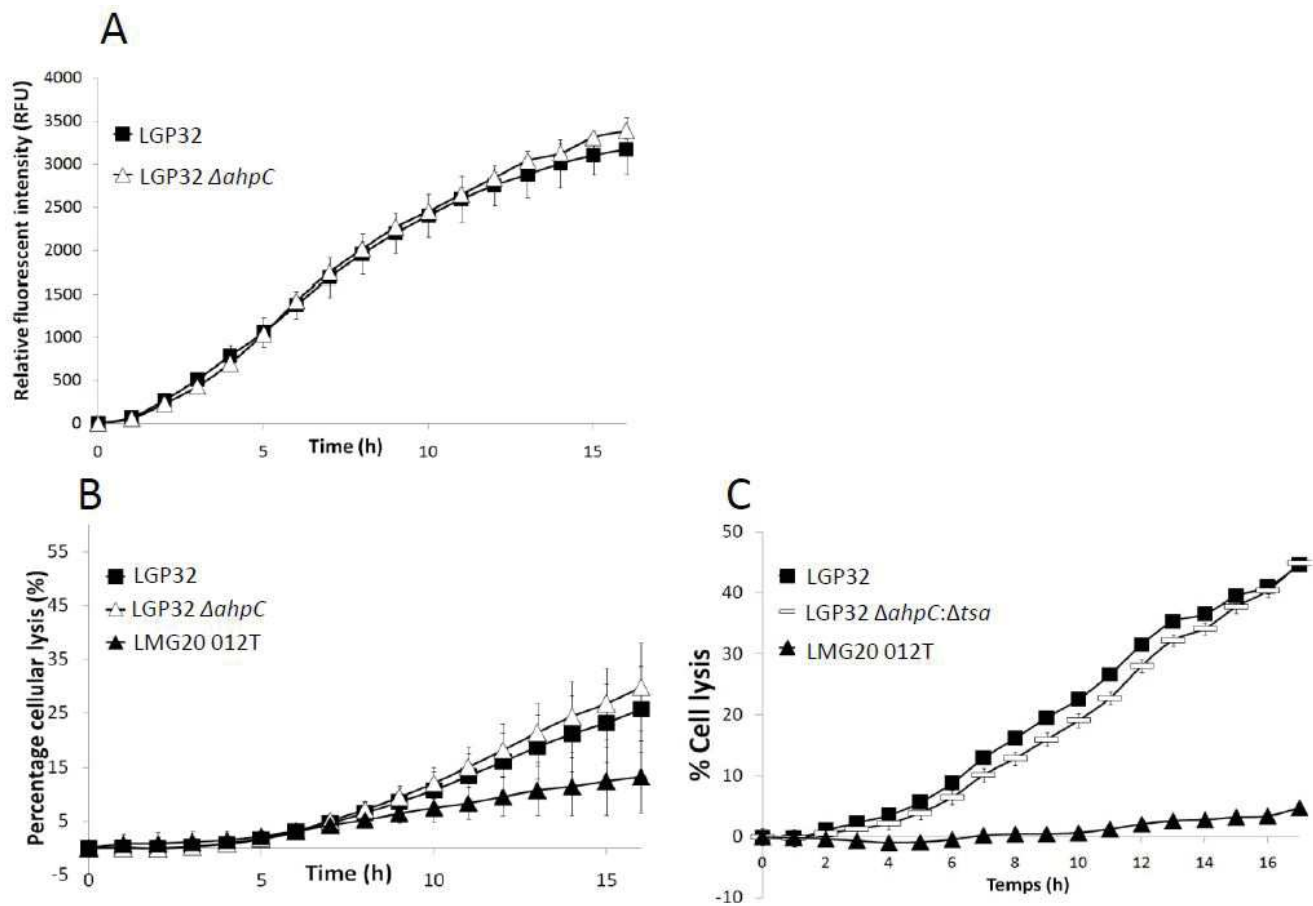


Fig S6. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B,C) of the Δ ahpC mutant and Δ ahpC: Δ tsa double mutant

Hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LMG20 012T (negative control), wild-type LGP32 or its Δ ahpC mutants and Δ ahpC: Δ tsa double mutant. (A) Bacterial growth in hemocyte co-culture was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria (not significant, RM-ANOVA). (B) Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. Values are presented \pm SD. Both the Δ ahpC mutant and Δ ahpC: Δ tsa double mutant mutants showed phenotypes similar to the wild-type LGP32 (not significant, RM-ANOVA).

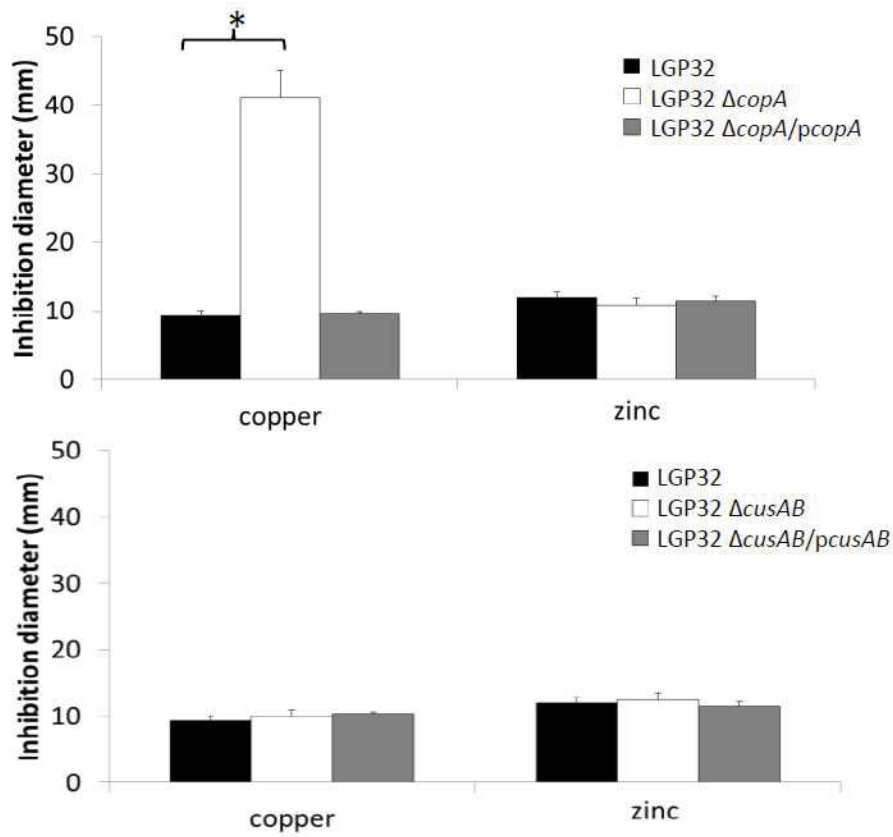


Fig S7. Increased susceptibility to copper of $\Delta copA$ but not $\Delta cusAB$ mutant

Overnight cultures of LGP32 wild-type and isogenic mutants and complemented strains were washed 2 times in sterile sea water and adjusted to $A_{600\text{ nm}} = 1$. 500 μl of cultures were spread over EPS NaCl 0.5M Petri dishes. Filter paper disks (6mm) soaked in 50mM sulfate copper or 50mM sulfate zinc were placed onto Petri dishes. Zone inhibition diameters were measured after 5 days. Only the $\Delta copA$ mutant showed a significant increase in sensitivity to copper (Kruskal Wallis test). Each graph represents the mean of three independent experiments \pm SD (error bars).

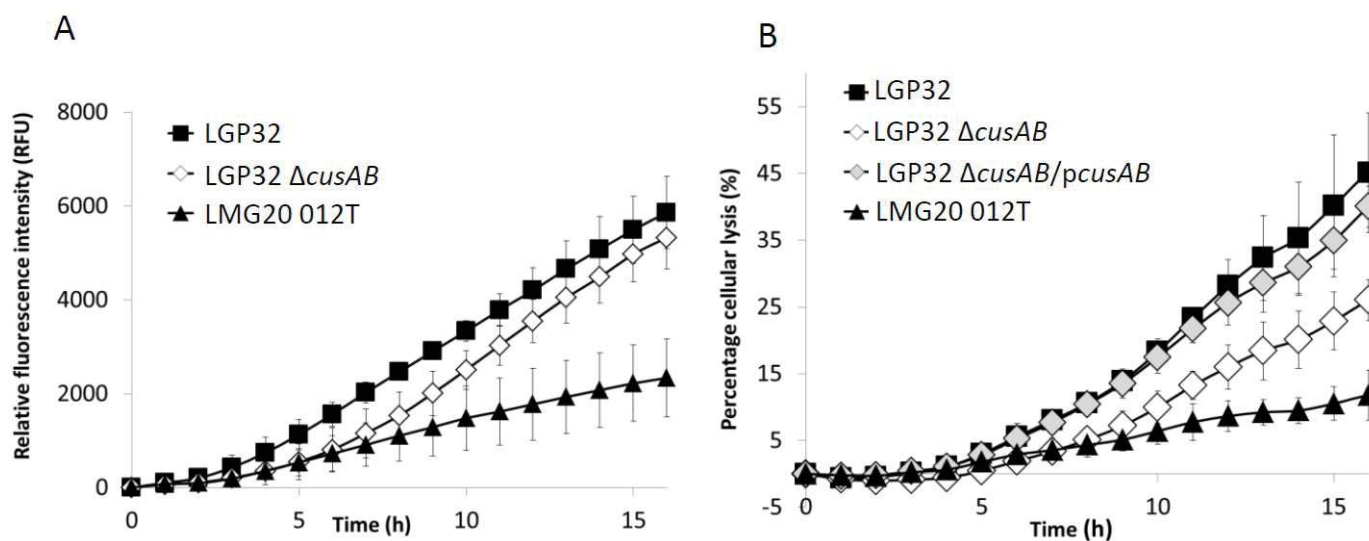


Fig S8. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B) of the $\Delta cusAB$ mutant

In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LMG20 012T (negative control), wild-type LGP32 or its $\Delta cusAB$ isogenic mutants complemented or not with a high copy plasmid carrying *cusAB* (A) Bacterial growth in hemocyte co-culture was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. The $\Delta cusAB$ mutant tends to grow slower, nevertheless is not statistically significant (RM-ANOVA). (B) Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. Values are presented \pm SD. The $\Delta cusAB$ mutant is less cytotoxic than the wild-type LGP32, and the complementation of *cusAB* restored wild-type cytotoxicity. However, the phenotypes were not strong enough to be statistically significant (RM-ANOVA).

Table S1. Differential expression of LGP32 transcripts from RNAseq reads data

Indicated in bold are genes which are affected more than 50 fold.

* annotations refer to an ongoing reannotation effort of *V. tasmaniensis* LGP32 genome, which is not yet released in public databases.

** this list of sRNAs correspond to putative sRNAs identified in Toffano-Nioche et al (2012).

Label	Name	Product	Pathways/functions	log2 fold change	Adjusted p-value (FDR)
Protein synthesis					
VS_0005	-	ribosomal protein S12	Protein synthesis	5.6	2.47E-24
VS_0006	-	Ribosomal protein S5	Protein synthesis	5.51	6.98E-26
VS_0032	-	ribosomal protein L18	Protein synthesis	5.36	4.22E-25
VS_0033	-	ribosomal protein S7	Protein synthesis	5.36	2.66E-25
VS_0127	-	50S ribosomal protein L29	Protein synthesis	5.35	2.12E-23
VS_0177	-	Ribosomal protein L30	Protein synthesis	5.28	4.19E-24
VS_0183	-	Ribosomal protein S3	Protein synthesis	5.23	2.30E-24
VS_0184	-	RNA methyltransferase	Protein synthesis	5.16	4.16E-04
VS_0280	-	Ribosomal protein L4	Protein synthesis	5.11	2.44E-24
VS_0281	-	Elongation factor Ts	Protein synthesis	5.06	1.04E-21
VS_0282	-	ribosomal protein L6	Protein synthesis	5.04	4.17E-23
VS_0361	-	Ribosomal protein L10	Protein synthesis	5.04	1.24E-21
VS_0362	-	ribosomal protein S17	Protein synthesis	5.02	2.04E-22
VS_0370	-	50S ribosomal protein L16	Protein synthesis	5.02	1.19E-23
VS_0429	-	Ribosomal protein S18	Protein synthesis	5.01	1.06E-18
VS_0430	-	Ribosomal protein L23	Protein synthesis	5	4.79E-24
VS_0440	-	ribosomal protein L34	Protein synthesis	4.95	8.24E-11
VS_0517	rpmI	50S ribosomal protein L35	Protein synthesis	4.95	7.80E-16
VS_0533	-	ribosomal protein L25	Protein synthesis	4.95	3.65E-20
VS_0536	-	Ribosomal protein L2	Protein synthesis	4.91	9.41E-24
VS_0560	-	ribosomal protein L1	Protein synthesis	4.91	1.10E-21
VS_0598	-	Ribosomal protein L22	Protein synthesis	4.9	2.35E-23
VS_0616	-	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	Protein synthesis	4.89	3.25E-22
VS_0642	-	50S ribosomal protein L3	Protein synthesis	4.88	2.82E-23
VS_0691	rpIT	50S ribosomal subunit protein L20	Protein synthesis	4.87	4.87E-20
VS_0718	-	ribosomal protein L17	Protein synthesis	4.81	2.56E-21
VS_0724	-	ribosomal protein S8	Protein synthesis	4.76	6.58E-20
VS_0751	-	30S ribosomal protein S10	Protein synthesis	4.75	3.33E-21
VS_0752	-	Ribosomal protein L15	Protein synthesis	4.7	9.73E-21
VS_0753	-	Ribosomal protein S19	Protein synthesis	4.67	2.92E-21
VS_0769	-	ribosomal protein S6	Protein synthesis	4.65	7.02E-18
VS_0869	-	ribosomal protein L5	Protein synthesis	4.63	5.06E-19
VS_0928	-	ribosomal protein S14	Protein synthesis	4.57	6.83E-19
VS_0967	-	ribosomal protein L11	Protein synthesis	4.56	6.92E-19
VS_1009	-	Ribosomal protein S16	Protein synthesis	4.53	1.40E-18
VS_1016	-	Glycyl-tRNA synthetase beta chain	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	4.42	6.64E-13
VS_1020	-	ribosomal protein S4	Protein synthesis	4.4	1.57E-19
VS_1077	-	16S rRNA processing protein RimM	Protein synthesis	4.37	3.52E-18
VS_1104	-	Similar to ribosomal protein S15	Protein synthesis	4.36	8.35E-15
VS_1172	-	tRNA-dihydrouridine synthase B	Protein synthesis	4.27	7.31E-10
VS_1228	-	ribosomal protein S2	Protein synthesis	4.26	4.06E-17
VS_1229	-	ribosomal protein L9	Protein synthesis	4.22	6.08E-17
VS_1230	-	Hypothetical tRNA/rRNA methyltransferase	Protein synthesis	4.2	9.90E-09
VS_1231	-	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase	Protein synthesis	4.19	1.97E-05
VS_1411	-	Ribosomal protein S11	Protein synthesis	4.16	6.47E-17
VS_1424	-	ribosomal protein L13	Protein synthesis	4.12	4.99E-16
VS_1428	-	50S ribosomal protein L21	Protein synthesis	4.11	3.20E-15
VS_1765	-	50S ribosomal protein L14	Protein synthesis	4.11	1.32E-16
VS_1766	-	elongation factor Tu	Protein synthesis	4.11	5.51E-12
VS_1809	-	ribosomal protein S9	Protein synthesis	4.09	4.67E-16
VS_1861	-	30S ribosomal protein S20	Protein synthesis	4	3.67E-08
VS_1961	-	50S ribosomal protein L24	Protein synthesis	4	6.39E-15
VS_1963	rpmJ	50S ribosomal subunit protein L36	Protein synthesis	3.99	9.28E-09
VS_2014	-	50S ribosomal protein L32	Protein synthesis	3.89	5.24E-07
VS_2043	-	ribosomal protein L19	Protein synthesis	3.84	9.68E-12
VS_2219	-	peptide chain release factor 3	Protein synthesis	3.83	2.93E-06
VS_2230	-	ribosomal protein L11 methyltransferase	Protein synthesis	3.82	5.70E-03
VS_2259	infC	Translation initiation factor IF-3	Protein synthesis	3.78	6.51E-13
VS_2350	-	ribosomal protein S13	Protein synthesis	3.78	3.73E-14
VS_2352	-	ribosomal protein L31	Protein synthesis	3.71	9.71E-09
VS_2353	-	Isoleucyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.55	2.34E-11
VS_2368	pheT	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Protein synthesis	3.55	9.04E-11
VS_2454	-	Release factor glutamine methyltransferase	Protein synthesis	3.48	9.73E-04
VS_2467	-	Ribonuclease P protein component	Protein synthesis	3.43	1.05E-04
VS_2476	-	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	3.43	1.23E-06
VS_2479	-	Ribosomal protein L28	Protein synthesis	3.4	4.72E-08
VS_2482	-	Threonyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.33	4.72E-10
VS_2484	-	Ribosomal protein L33	Protein synthesis	3.2	2.42E-07
VS_2491	-	50S ribosomal protein L27	Protein synthesis	3.13	6.74E-07

VS_2497	pheS	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	Protein synthesis	3.09	7.01E-06
VS_2555	-	CysteinyI-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.08	2.11E-06
VS_2556	-	elongation factor EF-G	Protein synthesis	3.08	1.39E-09
VS_2557	-	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase N	Protein synthesis	3.05	2.35E-03
VS_2558	-	Ribosome recycling factor	Protein synthesis	3.02	3.24E-04
VS_2603	infB	translation initiation factor 2 (IF-2 GTPase)	Protein synthesis	3	1.77E-09
VS_2806	-	AsparaginyI-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.97	3.46E-07
VS_2808	-	methionyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.96	3.47E-05
VS_2809	-	Glutamyl-tRNA reductase	Protein synthesis	2.95	1.15E-04
VS_2810	-	tryptophanyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.9	6.51E-06
VS_2810.1	-	Putative tRNA-i(6)A37 methylthiotransferase	tRNA modification	2.86	2.83E-05
VS_2812	-	Aspartyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.77	1.68E-06
VS_2813	rsmF	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	Protein synthesis	2.76	2.18E-02
VS_2814	rnt	Ribonuclease T (RNase T)	RNA metabolism	2.71	1.39E-02
VS_2815	-	Seryl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.68	2.47E-05
VS_2816	-	tyrosyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.64	2.22E-04
VS_2817	-	Ribonuclease E	Protein synthesis	2.63	3.47E-07
VS_2818	rimP	Ribosome maturation factor RimP	Protein synthesis	2.51	4.20E-04
VS_2819	-	GlutaminyI-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.5	4.43E-06
VS_2820	-	23S rRNA m(2)G2445 methyltransferase	Protein synthesis	2.48	1.06E-03
VS_2821	-	Leucyl-tRNA synthetase	Protein biosynthesis	2.43	5.93E-06
VS_2822	-	tRNA pseudouridine synthase D	Protein synthesis	2.39	2.57E-03
VS_2823	-	Glutamyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.37	4.68E-03
VS_2824	-	Ribonuclease PH	Protein synthesis	2.36	2.77E-02
VS_2825	rsmI	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	Protein synthesis	2.36	2.28E-02
VS_2826	-	Putative ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	Protein synthesis	2.35	8.50E-03
VS_2828	rnd	Ribonuclease D	Protein synthesis	2.28	2.70E-02
VS_2829	-	ArginyI-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.24	6.47E-04
VS_2830	-	SsrA-binding protein	Protein synthesis	2.22	4.38E-02
VS_2831	-	putative ribosomal protein L7/L12	Protein synthesis	2.21	1.43E-05
VS_2832	-	Lysyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.17	1.04E-03
VS_2833	-	Peptide chain release factor 1	Protein synthesis	2.16	1.77E-02
VS_2836	-	prolyI-tRNA synthetase	protein synthesis	2.08	1.04E-03
VS_2837	queA	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase QueA	Protein synthesis	2.07	4.78E-02
VS_2866	-	Dimethyladenosine transferase; Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	Protein synthesis	2.05	9.80E-04
VS_2897	-	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	Protein synthesis	2.03	8.31E-03
VS_2919	-	Putative ATP-dependent RNA helicase	Protein synthesis	-2.02	3.85E-02
VS_2946	-	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	Protein synthesis	-2.06	9.21E-03
VS_2947	-	23S rRNA methylase	rRNA modification	-2.25	6.32E-03
VS_2964	rnpB	RNase P, RNA component precursor RnpB	Protein synthesis	-2.27	5.60E-04
VS_2965	-	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	Protein synthesis	-2.35	4.15E-03
VS_2967	-	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase	Protein synthesis	-2.36	3.62E-02
VS_2968	-	hypothetical translation factor	Protein synthesis	-2.39	5.35E-03
VS_2972	-	tmRNA	Protein synthesis	-2.52	5.90E-06
VS_3000	-	Leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	Protein synthesis	-3.34	2.03E-04
VS_II1207	rnf	ribosome modulation factor	Protein synthesis	-3.59	2.73E-06
VS_m0441	-	Similar to transcriptional regulator, MarR family	Protein synthesis	-3.93	1.68E-04
VS_m0641	-	Ribosomal protein S6 modification protein	Protein synthesis	-4.83	1.68E-07

Carbon compound utilization and transport

VS_2591	malC	Maltodextrin transport system permease protein MalC	Glycogen, starch and sucrose metabolism	6.58	2.92E-13
VS_1313	tctC	Putative tricarboxylate transport TctC	Carbon compound transport	6.12	1.58E-30
VS_2585	-	cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.92	2.93E-20
VS_II0162	-	Maltose-binding periplasmic protein	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.6	1.39E-05
VS_2593	-	Neopullulanase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.58	1.73E-12
VS_1311	tctA	Putative tricarboxylate transport membrane protein TctA	Carbon compound transport	5.55	1.70E-18
VS_II0158	-	Putative maltoporin	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.38	3.33E-25
VS_1312	tctB	Putative tricarboxylate transport TctB	Carbon compound transport	5.3	4.34E-20
VS_II1298	-	cyclomaltodextrinase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.23	6.27E-14
VS_II0184	-	Maltodextrin phosphorylase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.76	8.60E-20
VS_2590	malE	Maltose/maltodextrin-binding protein	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.68	5.01E-11
VS_II0159	-	Maltose operon periplasmic protein precursor	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.41	4.79E-13
VS_II0145	dctQ	2,3-diketo-L-gulonate TRAPdicarboxylate transporter, DctQ subunit	Ascorbate and aldarate metabolism	4.35	1.52E-02
VS_II0222	malG	Maltoooligosaccharide ABC transproter, permease subunit MalG	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.21	5.22E-13
VS_II0185	-	4-alpha-glucanotransferase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.93	3.38E-14
VS_II0220	malE	ABC transporter: Substrate-binding protein precursor	Glycogen, starch and sucrose	3.93	1.24E-14

VS_I10143	dctP	MalE; Maltooligosaccharides uptake	metabolism		
VS_I10186	-	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transporter , DctP subunit 1;4-alpha-glucan branching enzyme	Ascorbate and aldarate metabolism	3.89	5.62E-04
VS_I10219	malK	ABC transporter: ATP-binding protein subunit Malk; Maltooligosaccharides uptake	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.69	1.30E-10
VS_I10774	-	Putative secreted triacylglycerol lipase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.59	2.22E-10
VS_I10167	-	Putative Alpha-amylase	Fatty acid metabolism	2.99	4.58E-08
VS_I10168	pulA	Secreted pullulanase PulA	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.95	2.69E-02
VS_I11287	-	Putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.81	1.63E-02
VS_I10221	malF	Maltooligosaccharide transporter subunit MalF	Carbon compound utilization	2.81	1.02E-04
VS_I10161	-	Glycogen debranching enzyme	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.79	5.99E-07
VS_2292	-	Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.67	6.94E-03
VS_I11501	-	Putative 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Carbon compound utilization	2.53	6.03E-05
VS_1083	-	Glycogen synthase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.53	3.15E-02
VS_2910	-	Putative 5-carboxymethyl-2-hydroxyruconate isomerase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.46	4.98E-05
VS_I10266	glcB	Malate synthase G	Carbon compound utilization	2.46	5.57E-03
VS_2291	-	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase Enzyme I	Carbon compound utilization	2.38	1.19E-03
VS_I10183	-	HTH-type transcriptional regulator malT (ATP-dependent transcriptional activator malT)	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.1	8.06E-04
VS_0597	-	Putative acetoin utilization protein	Carbon compound utilization	2.1	8.06E-04
VS_I10364	-	Putative phosphomannomutase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.03	1.10E-02
VS_0394	glmS	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.03	1.10E-02
VS_0958	adhE	Alcohol dehydrogenase/acetaldehyde dehydrogenase	Carbon compound utilization	-2.11	7.13E-03
VS_2377	-	Trehalose-6-phosphate hydrolase	GDP-mannose biosynthesis	-2.22	4.52E-03
VS_1178	-	Putative sucrose phosphate synthase	Carbon compound utilization	-2.41	1.42E-03
VS_I10546	-	Chitinase	Carbon compound utilization	-2.51	8.10E-03
VS_2260	-	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.53	4.62E-03
VS_I10048	dpaL	Diaminopropionate ammonia-lyase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.58	1.79E-03
VS_2186	-	putative PTS permease for N-acetylglucosamine and glucose	Carbon compound utilization	-2.58	3.48E-03
VS_I11414	-	Chitinase	PTS transport	-2.64	3.30E-04
VS_I11279	-	ADP-glucose pyrophosphorylase	Carbon compound utilization	-2.67	1.41E-02
VS_I10496	asd	Putative aldose sugar dehydrogenase	Carbon compound utilization	-2.69	8.18E-03
VS_I10605	hrsA	Fused 2-O-a-mannosyl-D-glycerate specific PTS enzymes: IIA component/IIB component/IIC component	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.69	4.16E-02
VS_I10314	-	PTS system, IIB component	Carbon compound utilization	-3.1	1.96E-03
VS_I10147	garK	Glycerate kinase	Carbon compound utilization	-3.15	3.06E-03
VS_2378	-	PTS system trehalose-specific EIIBC component	Ascorbate and aldarate metabolism	-3.25	2.25E-04
			Glycogen, starch and sucrose metabolism	-3.36	1.10E-03
			metabolism	-4.17	1.88E-05

Amino acid metabolism and transport

VS_1282	metE	Putative methylcobalamin:homocysteine methyltransferase	Methionine	6.73	9.71E-26
VS_1145	-	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	6.55	4.73E-23
VS_0992	oppC	Oligopeptide transport system permease protein oppC	Transport: peptides	6.28	2.11E-11
VS_1967	trpD	Anthranilate synthase beta subunit	Tryptophan synthesis	5.81	7.87E-06
VS_2382	metN	D-methionine transport ATP-binding protein metN	Transport: AA	5.7	4.68E-09
VS_0077	dppC	Dipeptide transport system permease protein dppC	Transport: peptides	5.55	3.12E-12
VS_2860	-	Arginine N-succinyltransferase, beta chain	Arginine and proline metabolism	5.5	3.68E-16
VS_2640	-	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	AA metabolism	5.47	4.11E-17
VS_0075	-	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	Transport: peptides	5.26	2.80E-23
VS_0991	-	Oligopeptide transport system permease protein oppB	Transport: peptides	5.11	6.53E-12
VS_0378	-	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	5	9.37E-20
VS_0076	-	Dipeptide transport system permease protein dppB	Transport: peptides	5	1.79E-15
VS_1968	trpG	anthranilate phosphoribosyltransferase	Tryptophan synthesis	4.97	2.53E-08
VS_0993	oppD	Oligopeptide transport ATP-binding protein oppD	Transport: peptides	4.95	3.97E-15
VS_0379	-	3-isopropylmalate dehydrogenase	AA metabolism	4.9	2.23E-16
VS_1966	trpE	Anthranilate synthase alpha subunit	Tryptophan synthesis	4.85	7.92E-08
VS_2859	-	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	Arginine and proline metabolism	4.7	3.33E-15
VS_0009	-	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein patH precursor	Transport: AA	4.55	1.06E-13
VS_0243	-	Lysine 2,3-aminomutase	AA metabolism	4.44	7.38E-03
VS_0461	-	Carbamoyl-phosphate synthase, small subunit	Arginine and proline metabolism; Nitrogen metabolism; Pyrimidine	4.44	6.26E-12

VS_0377	-	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	metabolism Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	4.42	1.56E-13
VS_0061	ilvC	Ketol-acid reductoisomerase	Isoleucine, valine	4.39	5.40E-16
VS_2872	aroK	Shikimate kinase	chorismate	4.36	4.91E-09
VS_2384	metQ	D-methionine-binding lipoprotein metQ precursor	Transport: AA	4.34	4.91E-13
VS_1144	metR	HTH-type transcriptional regulator metR	AA metabolism	4.29	2.27E-09
VS_0990	-	Periplasmic oligopeptide-binding protein	Transport: peptides	4.21	5.36E-16
VS_2264	-	Asparagine synthetase B, glutamine-hydrolyzing	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ;Arginine and proline metabolism	4.19	4.86E-11
VS_0994	oppF	Oligopeptide transport ATP-binding protein oppF	Transport: peptides	4.17	7.93E-14
VS_0548	tyrA	Chorismate mutase/prephenate dehydrogenase	Tyrosine synthesis	4.11	2.00E-04
VS_0462	-	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	Arginine and proline metabolism; Nitrogen metabolism	4.1	5.19E-16
VS_m1293	-	Glycine ribowitch	AA metabolism	4.06	1.16E-05
VS_0955	-	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	AA metabolism	4	1.18E-08
VS_2289	-	Cysteine synthase A	Cysteine and methionine metabolism	3.97	4.86E-15
VS_2415	-	Gamma-glutamyl phosphate reductase	Arginine and proline metabolism	3.96	1.40E-07
VS_2383	metI	Probable D-methionine transport system permease protein metI	Transport: AA	3.91	2.47E-05
VS_2861	argD	Bifunctional acetylornithine aminotransferase and succinyl-diaminopimelate aminotransferase	AA metabolism	3.89	1.90E-13
VS_0315	-	Methionine synthase	Cysteine and methionine metabolism;One carbon pool by folate	3.87	4.61E-13
VS_0008	patM	Probable amino-acid ABC transporter permease protein patM	Transport: AA	3.78	1.79E-04
VS_1216	hutH	Histidine ammonia-lyase	Histidine degradation	3.72	6.89E-09
VS_3147	-	Threonine dehydratase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.61	4.76E-10
VS_2893	-	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase II	AA metabolism	3.55	2.89E-12
VS_II0818	-	serine hydroxymethyltransferase	AA metabolism	3.55	1.77E-10
VS_0484	-	Homoserine kinase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.5	2.46E-08
VS_II0387	aroG	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive	Aromatic amino acid metabolism	3.45	4.09E-07
VS_0380	-	2-isopropylmalate synthase	AA metabolism	3.42	2.63E-10
VS_1217	-	Urocanate hydratase	Histidine degradation	3.39	4.00E-07
VS_0485	-	Threonine synthase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.36	1.04E-08
VS_m1292	-	Glycine ribowitch	AA metabolism	3.35	1.88E-03
VS_2048	-	Alanine dehydrogenase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3.28	1.18E-10
VS_2894	-	cystathionine gamma-synthase	Cysteine and methionine metabolism;Sulfur metabolism	3.26	2.62E-09
VS_0121	-	Glutamine synthetase	AA metabolism	3.25	2.32E-11
VS_1969	trpCF	Tryptophan biosynthesis protein trpCF	Tryptophan synthesis	3.23	1.47E-05
VS_2416	-	Glutamate 5-kinase (Gamma-glutamyl kinase)	Arginine and proline metabolism	3.22	1.93E-04
VS_II0820	-	Glycine dehydrogenase (Glycine cleavage system P-protein)	Glycine, serine and threonine metabolism	3.17	2.38E-09
VS_1970	trpB	Tryptophan synthase beta chain	Tryptophan synthesis	3.16	4.15E-04
VS_3146	-	Dihydroxy-acid dehydratase	Pantothenate and CoA biosynthesis; Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.11	9.91E-08
VS_0285	-	Alanine racemase	AA metabolism	3.1	3.67E-04
VS_2301	purE	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	Lysine synthesis via DAP	3.08	4.34E-04
VS_2024	hisC	Histidinol-phosphate aminotransferase	Histidine biosynthesis	3.07	1.49E-03
VS_2373	-	Serine hydroxymethyltransferase 1	Glycine/Folate metabolism	3.07	1.24E-06
VS_0318	-	Serine--pyruvate aminotransferase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.05	1.30E-04
VS_0483	-	Homoserine dehydrogenase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.03	5.04E-07
VS_1057	-	Histidine transport system permease protein hisM	Transport: AA	2.93	2.08E-03
VS_2583	-	Alanyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.92	1.14E-06
VS_0474	-	Glutamate synthase [NADPH] large chain	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ; Arginine and proline metabolism; D-Glutamine and D-glutamate metabolism	2.9	1.54E-08
VS_m0317	-	Lysine riboswitch	Glycine, serine and threonine metabolism;Cysteine and methionine metabolism	2.83	1.60E-04
VS_2023	hisB	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB	Histidine biosynthesis	2.75	7.61E-04
VS_0473	-	Glutamate synthase [NADPH] small chain	AA metabolism	2.55	3.79E-05
VS_II0638	-	Threonine aldolase	Glycine, serine and threonine metabolism	2.54	2.72E-02
VS_1804	-	L-serine dehydratase 1	Glycine, serine and threonine metabolism	2.52	2.47E-02
VS_1055	-	Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein precursor	Transport: AA	2.51	2.57E-06
VS_3143	-	Acetolactate synthase isozyme II large subunit	Valine, leucine and isoleucine	2.5	9.36E-06

VS_0892	-	Chorismate synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatephosphorylase)	biosynthesis AA metabolism; Cofactor, small molecule carrier biosynthesis	2.5	3.02E-04
VS_2333	-	Nitrogen regulatory protein P-II	Regulates glutamin synthetase	2.47	1.82E-02
VS_2926	argF	Ornithine carbamoyltransferase	Arginine metabolism	2.47	2.09E-03
VS_1056	hisQ	Histidine transport system permease protein hisQ	Transport: AA	2.46	7.55E-04
VS_2022	hisH	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	Histidine biosynthesis	2.45	1.93E-02
VS_0316	-	Lysine-sensitive aspartokinase III	Glycine, serine and threonine metabolism;Cysteine and methionine metabolism	2.43	4.24E-04
VS_1819	-	Aspartate aminotransferase	Cysteine and methionine metabolism	2.4	2.87E-03
VS_II0816	-	glycine cleavage system T protein	Glycine degradation	2.39	7.08E-05
VS_1677	metA	Homoserine O-succinyltransferase	Methionine biosynthesis	2.37	2.99E-03
VS_1793	tyrR	Transcriptional regulatory protein tyrR	AA metabolism	2.3	1.14E-02
VS_3145	-	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.27	1.99E-03
VS_2871	aroB	3-dehydroquinate synthase	Aromatic AA biosynthesis	2.24	7.26E-04
VS_2021	hisA	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	Histidine biosynthesis	2.22	5.13E-03
VS_0015	-	Valine-pyruvate aminotransferase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.19	7.39E-03
VS_2738	-	Arginine deiminase	Arginine and proline metabolism	2.18	4.96E-05
VS_1262	-	Tryptophanase (L-tryptophan indole-lyase)	Tryptophan metabolism	2.16	8.26E-04
VS_II0819	-	glycine cleavage system H protein	AA metabolism	2.14	5.14E-04
VS_1971	trpA	Tryptophan synthase alpha chain	Tryptophan synthesis	2.13	4.69E-02
VS_2569	-	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	Propanoate metabolism	2.12	2.25E-04
VS_2025	hisD	Histidinol dehydrogenase	Histidine biosynthesis	2.11	3.82E-03
VS_2570	-	oxaloacetate decarboxylase gamma chain	Pyruvate metabolism	2.04	6.27E-03
VS_II0066	-	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	Glycine, serine and threonine metabolism	-2.01	4.37E-02
VS_II0442	-	Threonine aldolase	Glycine, serine and threonine metabolism	-2.05	8.71E-03
VS_1403	-	Amino acid ABC transporter	Transport: AA	-2.17	3.19E-03
VS_II1030	-	Serine-threonine protein kinase	AA metabolism	-2.31	2.62E-02
VS_II1525	-	Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding portion	Transport: AA	-2.46	5.44E-03
VS_2169	-	Cysteine synthase	Amino acid metabolism	-2.84	9.35E-03
VS_0416	-	Glutamine synthetase adenylyltransferase	AA metabolism	-2.94	3.91E-04
VS_0558	-	amino-acid abc transporter binding protein	Transport: AA	-3.04	5.80E-04
VS_II1518	-	Maleylacetoacetate isomerase	Tyrosine degradation	-3.6	3.65E-03
VS_II1334	-	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	Tryptophan metabolism; Propanoate metabolism	-3.73	1.83E-02
VS_II1520	-	Putative homogentisate 1,2-dioxygenase	Tyrosine degradation	-3.86	4.56E-03
VS_II1521	hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Tyrosine degradation	-3.93	5.44E-03
VS_2138	-	Glutamate synthetase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ;Nitrogen metabolism	-5.21	4.25E-07
VS_1047	prkA	Putative PrkA family serine protein kinase	AA metabolism	-5.94	1.83E-08
VS_II1508	phhB	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase	tetrahydrobiopterin synthesis	-6.36	5.12E-07
VS_1944	-	Glycine cleavage system regulatory protein	AA metabolism	-6.46	2.69E-09
VS_1744	-	Bkd operon transcriptional regulator	Branched chain AA biosynthesis	-6.57	2.18E-06
VS_II1509	phhA	Phenylalanine 4-monooxygenase	Phenylalanine degradation	-7.2	1.01E-08
VS_1743	-	Putative pyridoxal-phosphate-dependent cystathionine synthase	Methionine biosynthesis	-8.52	5.46E-14

Transport (others)

VS_II0391	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	5.37	1.19E-04
VS_II0392	-	ABC transporter: transmembrane protein	Transport: other	5.22	1.12E-04
VS_II0440	-	ABC transporter	Transport: other	4.7	2.28E-06
VS_II0441	-	Putative sulfate transporter	Transport: other	4.61	3.83E-06
VS_0242	-	Hypothetical ABC transporter ATP-binding protein	Transport: other	4.49	1.38E-16
VS_II0723	-	ABC-type transport system	Transport: other	4.49	4.72E-10
VS_0074	-	Na+-dependent transporter	Transport: other	4.37	5.76E-16
VS_0089	-	Putative Sodium/glutamate symporter	Transport: other	4.1	1.90E-08
VS_0369	-	Putative Sodium/sulfate symporter	Transport: other	4.09	1.64E-09
VS_0530	-	sodium-dependent transporter	Transport: other	3.89	3.45E-10
VS_0588	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	3.68	5.40E-11
VS_0633	-	Sodium/alanine symporter	Transport: other	3.52	8.09E-08
VS_0650	-	ABC transporter: two domain ATP-binding protein	Polyamine-transporting ATPase	3.27	1.22E-03
VS_0665	-	Inner membrane sodium/carboxylate symporter	Transport: other	3.09	1.13E-04
VS_0875	-	Putative nucleoside permease NupX:	Transport: other	2.98	1.56E-07
VS_0887	-	Putative Na/Pi transporter	Phosphate transporter	2.82	1.10E-03
VS_0888	-	ABC transporter: transmembrane protein	Transport: other	2.76	2.62E-02
VS_0919	-	Permease family protein	Transport: other	2.75	4.80E-03
VS_1015	-	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	2.55	7.27E-05
VS_1034	-	Permease of the major facilitator superfamily	Transport: other	2.45	1.02E-03
VS_1179	-	ABC-type proline/glycine betaine transport system, ATPase component	Transport: other	2.31	2.35E-04
VS_1496	-	Na+/H+-dicarboxylate symporter	Transport: other	2.12	3.95E-02
VS_1499	madN	Putative acetate efflux pump, MadN	Transport: other	-2.03	2.23E-02
VS_1523	-	peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding	Transport: other	-2.04	3.03E-02

VS_1524	-	protein			
VS_1525	kefC	ABC transporter: two domain ATP-binding protein	Transport: other	-2.18	9.92E-03
		Glutathione-regulated potassium-efflux system	Transport: other	-2.19	7.01E-03
VS_1847	-	protein kefC (K+)/H(+)-antiporter)			
		Putative Mg(2+) transport ATPase inner membrane	Transport: other	-2.29	5.22E-03
VS_1980	-	protein			
VS_1986	apaG	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	-2.37	2.51E-02
		Putative ApaG protein associated with Co2+ and Mg2+	Transport: other	-2.41	4.95E-03
VS_1987	-	efflux			
VS_1988	-	Transporter	Transport: other	-2.45	2.69E-02
VS_2277	phoU	Putative multidrug efflux pump	Transport: other	-2.49	1.36E-02
VS_2365	-	Phosphate transport system regulatory protein PhoU	Transport: other	-2.5	8.54E-04
		Putative glutathione-regulated potassium-efflux	Transport: K+	-2.55	2.23E-03
		system ancillary protein KefG; quinone reductase			
VS_2421	-	Small-conductance mechanosensitive channel	Transport: other	-2.6	1.40E-02
VS_2464	-	Na(+)-driven multidrug efflux pump	Transport: other	-2.63	1.88E-02
VS_2506	-	Nucleoside permease	Transport: other	-2.67	3.03E-02
VS_2586	-	Molybdate-binding periplasmic protein	Molybdate transport	-2.72	3.97E-03
VS_2658	-	Membrane-fusion protein	Transport: other	-2.74	4.02E-03
VS_2787	-	ABC transporter: ATP binding protein	Transport: other	-2.78	1.35E-03
VS_I0175	mtrF	efflux pump component MtrF	Transport: other	-2.83	8.11E-04
VS_I0188	-	ABC transporter, permease protein	Transport: other	-2.89	6.73E-03
VS_I0247	-	Putative ABC transporter component: ATP binding	Transport: other	-2.97	7.65E-03
		protein; putative polyamine transport system			
VS_I0390	-	Cation/multidrug efflux pump	Transport: other	-3.01	7.21E-04
VS_I0509	ktrB	KtrB	Transport: K+	-3.08	1.02E-03
VS_I0510	-	Permeases of the major facilitator superfamily	Transport: other	-3.08	1.54E-03
VS_I0511	-	ABC transporter: transmembrane protein (IM)	Transport: other	-3.11	4.20E-04
VS_I0578	-	ABC transporter, transmembrane protein- ATP-binding	Transport: other	-3.15	9.14E-04
		protein (IM, ABC)			
VS_I0676	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	-3.16	8.17E-03
VS_I0858	-	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	-3.21	1.64E-04
VS_I0860	hlyD	Putative secretion protein HlyD	Transport: other	-3.31	5.92E-04
VS_I0861	-	ABC transporter (IM-ABC)	Transport: other	-3.33	4.90E-04
VS_I0862	ktrA	KtrA	Transport: K+	-3.49	1.41E-04
VS_I0932	-	Transmembrane water channel Aquaporin Z	Transport: other	-3.58	1.30E-04
VS_I0935	-	ABC transporter: Outer membrane protein (OMP)	Transport: other	-3.89	4.49E-05
VS_I1050	-	Putative sodium/hydrogen exchanger family protein	Transport: other	-4.06	1.06E-04
VS_I1114	-	ABC transporter: substrate-binding protein precursor	Transport: other	-4.21	1.50E-05
		(BP)			
VS_I1143	-	ABC transporter: Membrane fusion protein (MFP)	Transport: other	-4.57	1.59E-05
VS_I1268	-	ABC-type multidrug transport system, ATPase and	Transport: other	-4.58	4.02E-06
		permease component			
VS_I1284	-	ABC transporter: Membrane fusion protein	Transport: other	-4.59	1.70E-05
VS_I1285	-	ABC transporter: Transmembrane and ATP-binding	Transport: other	-5.03	2.15E-06
		protein			
VS_I1286	-	ABC transporter: Transmembrane and ATP-binding	Transport: other	-5.57	1.43E-06
		protein			
VS_I1377	-	Na+/H+ antiporter NhaD and related arsenite	Transport: other	-5.68	2.26E-08
		permeases			
VS_I1428	-	Permease of the drug metabolite transporter (DMT)	Transport: other	-6.08	6.18E-07
		superfamily			

Energy production and respiration

VS_2589	cymA	cytoplasmic membrane-associated tetrahaem c-type	Energy production/respiration	6.33	1.05E-25
		cytochrome			
VS_1461	ccoQ	cytochrome c oxidase, subunit CcoQ	Energy production/respiration	5.93	3.46E-16
VS_1462	ccoP	cytochrome c oxidase, subunit CcoP	Energy production/respiration	5.51	1.50E-24
VS_1460	ccoO	cytochrome c oxidase, subunit CcoO	Energy production/respiration	5.38	2.35E-23
VS_3155	-	ATP synthase delta chain	Na+-transporting two-sector ATPase	5.17	2.82E-23
VS_0696	nqrD	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit	Energy production and respiration	5.16	1.34E-18
		D			
VS_3151	-	ATP synthase epsilon chain	Na+-transporting two-sector ATPase	5.12	9.47E-22
VS_3152	-	ATP synthase beta chain	Na+-transporting two-sector ATPase	5.06	4.66E-24
VS_3153	-	ATP synthase gamma chain	Na+-transporting two-sector ATPase	5.06	4.79E-24
VS_3156	-	ATP synthase B chain	Na+-transporting two-sector ATPase	5	1.22E-22
VS_0695	nqrC	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit	Energy production and respiration	4.98	1.31E-17
		C			
VS_3154	-	ATP synthase alpha chain	Na+-transporting two-sector ATPase	4.97	2.98E-23
VS_0697	nqrE	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit	Energy production and respiration	4.89	1.09E-19
		E			
VS_1459	-	Cytochrome c oxidase polypeptide I homolog	Energy production/respiration	4.77	3.48E-20
VS_0698	nqrF	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit	Energy production and respiration	4.68	1.65E-18
		F			
VS_3158	-	ATP synthase a chain (ATPase protein 6)	Na+-transporting two-sector ATPase	4.57	2.25E-18
VS_0433	petC	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	Energy production/respiration	4.38	1.93E-12
VS_0694	nqrB	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit	Energy production and respiration	4.36	4.06E-17
		B			
VS_3157	-	ATP synthase C chain	Na+-transporting two-sector ATPase	4.24	6.37E-14
VS_0432	petB	Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome B	Energy production/respiration	4	3.21E-12
VS_1110	-	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	Energy production/respiration	3.52	1.69E-06
VS_1185	cydD	Transport ATP-binding protein CydD	Cysteine/Gsh transporter involved in	3.38	5.80E-05

VS_0431	petA	Ubiquinol-cytochrome c reductase,iron-sulfur subunit	cytochrome c assembly	3.32	1.74E-08
VS_0098	-	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis	Energy production/respiration	3.29	6.06E-05
		methyltransferase ubiE			
VS_0112	-	Cytochrome c4	Energy production/respiration	3.28	3.31E-06
VS_3159	-	ATP synthase subunit I	Na ⁺ -transporting two-sector ATPase	3.27	5.43E-09
VS_0693	nqrA	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A	Energy production and respiration	2.88	3.93E-08
VS_1212	-	Putative D-lactate dehydrogenase (cytochrome)	Energy production/respiration	2.7	4.55E-05
VS_0067	-	Cytochrome c5	Energy production/respiration	2.64	8.30E-04
VS_1109	-	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	Energy production/respiration	2.62	6.87E-05
VS_2256	-	Flavodoxin	Energy production/respiration	2.29	4.26E-03
VS_1184	cydC	Transport ATP-binding protein CydC	Cysteine/Gsh transporter involved in cytochrome c assembly	2.12	3.09E-03
VS_3067	fre	Flavin reductase	Energy production/respiration	2.08	1.86E-02
VS_II0150	ldhA	D-lactate dehydrogenase	Pyruvate metabolism	2.02	8.65E-03
VS_1483	-	Formate dehydrogenase gamma subunit	Energy production/respiration	-2.08	5.30E-03
VS_0939	-	putative nitroreductase	Energy production/respiration	-2.28	3.43E-02
VS_1485	-	Formate dehydrogenase alpha chain	Energy production/respiration	-2.37	3.44E-03
VS_2275	-	Putative nitrogen regulatory protein P-II family protein	Nitrogen metabolism	-2.38	1.91E-02
VS_II1028	-	Putative nitrite reductase NADPH	Energy production/respiration	-2.46	8.50E-03
VS_II1153	fdxA	Ferredoxin	Electron transport	-2.49	1.12E-02
VS_1091	torR	TorCAD operon transcriptional regulatory protein torR	TMAO respiration	-2.5	3.03E-03
VS_1484	-	Formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Energy production/respiration	-2.52	1.43E-03
VS_1926	-	Cytochrome C biogenesis protein	Energy production/respiration	-2.55	4.52E-02
VS_II0599	napD	Periplasmic nitrate reductase chaperone NapD	Nitrate respiration	-2.65	1.36E-03
VS_II0455	-	Putative pyruvate formate-lyase activating enzyme (formate C-acetyltransferase)		-2.67	7.98E-04
VS_1931	nrfB	Formate-dependent nitrite reductase	Anaerobic respiration	-2.76	1.11E-02
VS_2003	torA	Putative trimethylamine-N-oxide reductase	TMAO respiration	-3.23	3.36E-04
VS_II0894	-	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	Energy production/respiration	-3.28	5.88E-04
VS_1933	nrfA	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 NrfA	Anaerobic respiration	-3.3	1.12E-06
VS_II0896	-	Putative cytochrome c, class I	Energy production/respiration	-3.36	3.09E-04
VS_1397	-	Putative acylphosphatase	Energy production/respiration	-3.53	1.43E-04
VS_2004	torC	Cytochrome c-type protein TorC	TMAO respiration	-3.56	1.28E-04
VS_1611	glpQ	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase precursor	Glycerol degradation	-3.74	5.91E-04
VS_II0895	-	Cbb3-type cytochrome oxidase, cytochrome c subunit	Energy production/respiration	-3.99	9.74E-05
VS_2005	torE	trimethylamine N-oxide reductase TorE	TMAO respiration	-4.28	4.81E-05
VS_1932	nrfC	cytochrome c-type subunit of nitrite reductase NrfB	Anaerobic respiration	-4.4	9.20E-07
VS_II0371	-	putative cytochrome c oxidase assembly protein	Energy production/respiration	-4.76	3.18E-06
VS_II0365	-	Cytochrome c oxidase, subunit II	Energy production/respiration	-5	2.35E-06
VS_II0366	-	Cytochrome c oxidase, subunit I	Energy production/respiration	-5.76	1.60E-07
VS_II0367	-	putative cytochrome c oxidase assembly transmembrane protein	Energy production/respiration	-5.91	1.35E-07
VS_II0368	-	cytochrome c oxidase, subunit III	Energy production/respiration	-6.06	1.41E-07
VS_2672	-	putative cytochrome c oxidase, subunit I	Energy production/respiration	-6.51	4.99E-09

Stress response

VS_2126	ahpC	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 22	Oxydative stress	6.9	2.24E-30
VS_2127	ahpF	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	Oxydative stress	6.84	4.36E-19
VS_0175	cspA	Cold shock protein CspA	Stress response	5.84	1.29E-21
VS_II0545	betT	Putative glycine betaine transporter	Osmotic stress	5.71	2.11E-05
VS_2918	sodA	Superoxide dismutase	Oxydative stress	5.69	9.90E-19
VS_2880	-	peroxiredoxin family protein/glutaredoxin	Oxydative stress	4.56	1.94E-14
VS_2090	dsbA	Thiol:disulfide interchange protein dsbA precursor	Oxydative stress	4.51	1.28E-04
VS_2803	-	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases 1	Stress/Chaperone	4.02	1.18E-07
VS_II0902	-	Putative glycine betaine transporter	Osmotic stress	3.86	1.36E-14
VS_0604	-	Inositol monophosphate phosphatase	Stress response	3.81	5.17E-08
VS_0593	-	Putative peroxyredoxin	Oxydative stress	3.79	9.43E-14
VS_1836	-	Glutaredoxin	Oxydative stress	3.6	5.59E-10
VS_2425	-	Putative pressure-regulated ORF-like protein	Stress response	3.57	6.09E-03
VS_II0495	-	cold shock DNA-binding domain protein	Stress response	3.41	1.85E-09
VS_1180	-	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein proW	Osmotic stress	3.2	6.85E-05
VS_1044	sohB	SohB protein, peptidase U7 family	Stress/Chaperone	2.84	3.36E-02
VS_2602	surE	Broad specificity 5'(3')-nucleotidase and polyphosphatase SurE	Stress response	2.79	4.53E-04
VS_0435	sspB	Stringent starvation protein SspB	Stress response	2.49	5.99E-05
VS_1181	-	Glycine betaine-binding periplasmic protein	Osmotic stress	2.42	1.85E-03
VS_3140	-	Thiol:disulfide interchange protein dsbA precursor	Oxydative stress	2.4	7.29E-05
VS_II0148	-	Catalase	Oxydative stress	2.19	6.28E-05
VS_0907	cpvA	Bacteriocin production protein	Toxin production	2.18	9.90E-03
VS_II1328	frmC	S-formylglutathione hydrolase	Glutathione	2.14	1.22E-03
VS_3083	-	Peroxyredoxin	Oxydative stress	2.14	2.19E-02
VS_0374	djlA	DnaJ-like inner membrane protein DjIA	Chaperone/Stress response	2.03	3.24E-02
VS_1992	-	Psp operon transcriptional activator	Stress response	-2.1	1.63E-02
VS_1989	pspC	Phage shock protein C	Stress response	-2.14	1.45E-02
VS_II1336	-	Sigma-54 dependent transcriptional regulator	Stress response	-2.15	1.92E-02
VS_1990	pspB	phage shock protein B	Stress response	-2.22	1.21E-02
VS_1165	-	Putative heat shock protein HslJ	Stress/Chaperone	-2.24	4.09E-03
VS_0238	-	putative Co-chaperonin GroES	Stress response:chaperone	-2.35	3.00E-04

VS_2901	hslV	ATP-dependent protease hslV	Stress response	-2.36	1.56E-03
VS_1991	pspA	phage shock protein A	Stress response	-2.38	3.18E-03
VS_0039	-	Acrylyl-CoA reductase	Stress response	-2.4	3.84E-03
VS_1934	-	Similar to phage shock protein E	Stress response	-2.46	6.41E-03
VS_2757	-	RNA polymerase sigma-54 factor	Stress response	-2.53	1.86E-03
VS_m2637	-	6S	Stress response	-2.56	1.59E-04
VS_0014	ibpA	Small heat shock protein ibpA (16 kDa heat shock protein A)	Chaperone and stress	-2.65	1.00E-03
VS_II0087	-	Putative addiction module	Toxin/antitoxin system	-2.73	2.00E-02
VS_1074	-	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA	Stress response	-2.76	1.64E-03
VS_1073	-	ATP-dependent Clp protease adaptor protein clpS	Stress response	-2.93	1.03E-03
VS_II0381	-	HigB toxin protein	Toxin/antitoxin system	-2.98	5.65E-03
VS_0562	-	Chaperone ClpB protein	Chaperone/stress response	-3.05	1.30E-04
VS_1468	-	Universal stress protein E	Stress response	-3.09	1.23E-04
VS_II0382	-	HigA antitoxin protein	Toxin/antitoxin system	-3.22	1.18E-03
VS_II0764	-	Putative cochaperone with DnaJ-domain	Chaperone and stress	-3.27	3.68E-04
VS_II0086	-	Putative antitoxin of toxin-antitoxin stability system	Toxin/antitoxin system	-3.33	2.39E-03
VS_0207	-	Putative rhodanese-related sulfurtransferase	Stress response	-3.34	6.23E-05
VS_1519	-	Putative anti-sigma regulatory factor	Stress response	-3.57	1.59E-02
VS_II0877	-	Putative magnesium chelatase MoxR	Porphyrin and chlorophyll metabolism	-3.58	2.23E-03
VS_0090	-	Universal stress protein A	Stress response	-4.15	2.74E-06
VIBSP1_misc_RNA_129	VrrA	VrrA sRNA	Stress response	-4.17	3.90E-06
VS_1445	-	Plasmid stabilization element ParD antitoxin	Toxin/antitoxin system	-4.31	1.22E-05
VS_0092	uspB	Universal stress protein B	Stress response	-4.45	1.33E-05
VS_1444	-	Plasmid stabilization element ParE toxin	Toxin/antitoxin system	-5.05	2.23E-05
VS_II0853	-	RpoS-like sigma factor (rpoQ?)	Stress response	-5.12	5.21E-07
VS_1618	-	universal stress protein A	Stress response	-5.17	6.22E-08

Metal homeostasis

VS_II0514	cusC	Copper efflux system outer membrane protein CusC	copper	9.2	8.03E-27
VS_II0517	cusF	Periplasmic copper binding protein CusF	copper	8.15	1.39E-18
VS_II0515	cusB	Copper efflux system, membrane fusion protein CusB	copper	6.76	2.47E-24
VS_0768	copA	Copper-exporting P-type ATPase A CopA	copper	5.87	3.30E-22
VS_II0516	cusA	Copper efflux system protein, membrane componentCusA	copper	5.69	6.98E-26
VS_1902	sufB	Protein SufB involved in FE-S cluster assembly	iron	4.69	1.56E-08
VS_1124	viuD	ABC transporter: Transmembrane protein; Iron-siderophore uptake, Vibriobactin	iron	4.6	2.79E-03
VS_II1126	-	ABC transporter: substrate-binding protein; vibrioferrin uptake	iron	4.42	4.58E-08
VS_II1127	-	Vibrioferrin receptor	iron	4.41	1.22E-15
VS_1923	-	Putative iron-regulated protein A	iron	4.18	2.04E-17
VS_II0681	-	Putative TonB system transport protein	iron	4.16	1.50E-02
VS_II0284	hutD	hemin ABC transporter, ATP-binding protein HutD	iron	4.12	1.24E-03
VS_m0107	ryhB	RyhB	iron	4.12	3.18E-17
VS_1123	viuP	ABC transporter: Substrate-binding protein precursor (BP); Iron-siderophore uptake (Vibriobactin)	iron	4.03	3.89E-04
VS_1121	viuA	Vibriobactin receptor precursor	iron	3.99	6.64E-13
VS_1122	viuB	Vibriobactin utilization protein	iron	3.91	1.90E-06
VS_II1133	pvsE	Vibrioferrin biosynthesis protein PvsE	iron	3.81	5.22E-05
VS_II1128	-	Receptor for a ferric siderophore of unknown origin	iron	3.64	3.58E-10
VS_II1131	pvsC	Multi-drug efflux pump homolog PvsC	iron	3.56	8.71E-07
VS_II1132	pvsD	Vibrioferrin biosynthesis protein PvsD	iron	3.52	2.06E-07
VS_II1123	-	ABC transporter: ATP-binding protein; Vibrioferrin uptake	iron	3.5	2.33E-02
VS_1904	sufD	Protein SufD involved in FE-S cluster assembly	iron	3.49	1.36E-03
VS_1905	sufS	Cysteine desulfurase	iron	3.37	1.57E-03
VS_0767	copG	Putative copper binding protein CopG	copper	3.21	1.84E-07
VS_II1124	-	ABC transporter: transmembrane protein; Vibrioferrin uptake	iron	3.1	1.59E-02
VS_II0285	-	Hemin transport system permease protein	iron	2.97	2.06E-04
VS_II0751	-	heme receptor	iron	2.92	1.37E-08
VS_II1071	-	ABC transporter, periplasmic susbtrate binding protein; enterobactin uptake	iron	2.74	3.20E-04
VS_2083	zntA	Putative zinc transporting ATPase ZntA	zinc	2.65	1.46E-06
VS_II0412	viuB	Siderophore-interacting protein ViuB	iron	2.64	1.81E-02
VS_0290	zur	Zinc uptake regulation protein Zur	zinc	2.59	2.29E-04
VS_II0286	-	hemin ABC transporter, periplasmic hemin-binding protein HutB	iron	2.54	1.23E-02
VS_II0682	-	Putative TonB protein	iron	2.54	8.25E-03
VS_2502	hemL	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	iron	2.53	3.76E-02
VS_2518	-	iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein	iron	2.44	1.25E-05
VS_1464	-	Putative copper transporting ATPase	copper	2.44	8.70E-03
VS_3101	-	Putative multicopper oxydase CumA-like	copper	2.29	3.08E-02
VS_II1130	pvsB	Vibrioferrin biosynthesis protein PvsB	iron	2.19	3.74E-05
VS_2516	-	Putative Fe(3+)-transporting ATPase	iron	2.06	1.69E-02
VS_II0677	-	Ferrichrome-iron receptor	iron	-2.08	3.00E-02
VS_2850	-	ABC transporter, ATP-binding protein	iron	-2.3	8.20E-03
VS_2237	znuA	High-affinity zinc uptake system protein znuA precursor	zinc	-2.35	3.28E-02

VS_2122	-	hypothetical protein	iron	-2.64	9.90E-03
VS_I10400	-	ABC transporter: Substrate binding protein precursor	iron	-3.1	4.62E-02
VS_I10399	-	ABC-type Fe ³⁺ transport system, periplasmic component	iron	-3.37	6.41E-03
VS_I10600	napF	iron-sulfur cluster-binding protein NapF	iron	-3.4	1.09E-04
VS_0091	ftnA	Ferritin 1	iron	-4.18	1.91E-05
VS_2124	-	Lipoprotein A family protein	iron	-4.77	5.36E-05

Nucleoside and nucleotide metabolism

VS_3121	purK	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	Purine metabolism	6.33	1.05E-07
VS_2927	pyrB	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	5.72	3.57E-11
VS_I10447	-	5'-nucleotidase (Nucleoside 5'-monophosphatephosphohydrolase)	Nicotinate and nicotinamide metabolism;	4.88	1.81E-03
VS_2740	pyrB2	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain	Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	4.61	7.83E-05
VS_2741	pyrI2	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	4.56	5.61E-06
VS_0664	-	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine metabolism	4.47	1.07E-13
VS_2034	-	Adenylosuccinate lyase	Purine metabolism	3.83	2.55E-08
VS_3074	-	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase	Purine metabolism	3.81	4.00E-07
VS_0628	-	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Purine metabolism	3.8	4.78E-11
VS_2228	-	Formyltetrahydrofolate deformylase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3.67	3.11E-08
VS_2053	-	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	Pyrimidine metabolism	3.52	5.75E-06
VS_2951	purH	Bifunctional purine biosynthesis protein purH	Purine metabolism	3.47	2.47E-06
VS_1422	pyrD	Dihydroorotate dehydrogenase	Pyrimidine metabolism	3.46	7.82E-05
VS_1717	-	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	Purine metabolism	3.4	3.50E-02
VS_2928	pyrI	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	3.31	2.02E-04
VS_2952	-	Phosphoribosylamine--glycine ligase	Purine metabolism	3.29	8.86E-07
VS_I10639	-	ADP-ribose diphosphatase	Nucleoside and nucleotide metabolism	3.28	3.42E-02
VS_0748	-	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	Purine and pyrimidine metabolism	3.27	1.69E-09
VS_0629	-	GMP synthase	Purine metabolism	3.25	4.26E-08
VS_3120	-	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	Purine metabolism	3.19	1.14E-03
VS_0908	-	Amidophosphoribosyltransferase	Purine metabolism	3.14	2.12E-05
VS_0615	-	Nucleoside diphosphate kinase	Pyrimidine metabolism	3.1	4.98E-05
VS_0159	-	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	Purine metabolism	3.07	2.02E-08
VS_2030	gsk	inosine guanosine kinase	Purine metabolism	2.98	4.76E-02
VS_2268	-	Adenylate kinase	Purine metabolism	2.94	2.43E-03
VS_2318	purM	Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase	Purine metabolism	2.88	5.35E-06
VS_I10463	tktA	Transketolase	Pentose phosphate pathway	2.82	1.75E-06
VS_I11110	guaC	GMP reductase GuaC	Purine metabolism	2.73	3.26E-03
VS_2351	pyrH	Uridylate kinase	Pyrimidine metabolism	2.65	1.67E-03
VS_1205	-	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	Purine metabolism	2.31	2.23E-02
VS_2463	deoC	deoxyribose-phosphate aldolase	Nucleoside and nucleotide metabolism	-2.02	5.87E-03
VS_2082	-	uridine phosphorylase	Pyrimidine metabolism	-2.15	1.40E-02
VS_2085	-	Putative inosine monophosphate dehydrogenase	Purine metabolism	-3	7.62E-04
VS_2196	-	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase-like protein	Purine metabolism	-3.01	4.23E-04
VS_2195	-	Putative deoxyribonucleoside 5'-monophosphatase	Purine metabolism	-4.4	3.26E-06

Cofactor and small molecule carrier biogenesis

VS_2531	-	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	Folate biosynthesis	3.98	1.90E-03
VS_2039	bioF	8-amino-7-oxononanoate synthase	Biotin	3.5	4.09E-04
VS_1702	-	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole	Porphyryn and chlorophyll metabolism	3.24	1.19E-02
VS_0150	-	Carboxylesterase bioH (Biotin synthesis protein bioH)	Biotin	3.05	5.70E-03
VS_m2768	-	TPP riboswitch	Cofactor/small molecule carrier biogenesis	3	6.22E-08
VS_2267	-	Ferrochelatase (Protoheme ferro-lyase)	Porphyryn and chlorophyll metabolism	2.98	9.92E-05
VS_2532	-	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.94	3.72E-02
VS_0181	-	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein coaBC	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.86	8.71E-03
VS_0900	-	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	Cofactor, small molecule carrier biosynthesis biosynthesis	2.83	1.69E-03
VS_0889	folD	Bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase and 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	One carbon pool by folate	2.77	7.13E-03
VS_3081	ggt	Gamma-glutamyltranspeptidase	Glutathione metabolism	2.77	1.85E-03
VS_0648	-	Probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2.76	2.63E-02
VS_2040	bioB	Biotin synthase	Biotin	2.72	3.38E-03
VS_I10108	fpr	NADPH-flavin oxidoreductase	FAD, FMN biosynthesis	2.67	2.98E-02
VS_m2999	-	Cobalamin riboswitch	Cofactor/small molecule/carrier	2.64	3.02E-03
VS_3003	-	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase, class I	Nicotinate and nicotinamide	2.38	4.65E-03

VS_3069	-	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	metabolism		
VS_2533	-	Pantoate--beta-alanine ligase	Ubiquinone and menaquinone	2.35	4.21E-04
VS_IIIm1091	-	TPP riboswitch	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.29	1.10E-02
VS_2615	-	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase	Thiamine	2.28	1.73E-04
VS_2648	epd	D-erythrose-4-phosphate dehydrogenase	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.21	1.12E-02
VS_II1263	ribB	3;4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis I	2.2	2.84E-03
VS_0371	-	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	Riboflavin	2.06	8.32E-04
			Cofactor, small molecule carrier	2.01	1.55E-03
			biosynthesis biosynthesis		
VS_1924	ribA	GTP cyclohydrolase-2	Cofactor, small molecule carrier	-2.27	1.06E-02
			biosynthesis biosynthesis		
VS_2405	ipsA	(2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase	isopreneoid biosynthesis	-2.72	2.42E-03
VS_II0722	-	Cobyrinic acid synthase		-2.83	1.25E-03
VS_II0567	-	putative cobalamin synthesis protein	Cofactor/small molecule carrier	-3.23	2.79E-04
			biogenesis		
VS_II1519	-	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (catechol pathway)	Phenylalanine degradation	-3.69	3.80E-03
VS_II0276	-	Hypothetical protein	Nicotinate and nicotinamide	-3.9	2.37E-05
			metabolism		
VS_II1526	-	Putative GTP cyclohydrolase II	Riboflavin biosynthesis	-4.63	2.79E-06
VS_II0373	cyoE	Protoheme IX farnesyltransferase	Heme	-5.39	1.78E-07

DNA replication, recombination and repair

VS_2807	-	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit	Replication, recombination and repair	4.56	4.67E-21
VS_1936	gyrA	DNA gyrase, subunit A	Replication, recombination and repair	3.52	1.82E-11
VS_2954	hupA	DNA-binding protein HU-alpha	Replication, recombination and repair	3.51	5.09E-04
VS_2962	-	DNA-directed RNA polymerase beta' chain	Replication, recombination and repair	3.49	1.72E-13
VS_2201	hupB	DNA-binding protein HU-beta	Replication, recombination and repair	3.41	2.65E-08
VS_2963	-	DNA-directed RNA polymerase beta chain	Replication, recombination and repair	3.41	1.52E-12
VS_0423	parE	Topoisomerase IV subunit B	Replication, recombination and repair	3.21	2.00E-05
VS_0424	parC	Topoisomerase IV subunit A	Replication, recombination and repair	3.05	6.94E-07
VS_2226	-	Probable ATP-dependent helicase	Replication, recombination and repair	2.85	2.84E-03
VS_2598	-	DNA mismatch repair protein mutS	Replication, recombination and repair	2.76	1.54E-03
VS_0716	-	DNA polymerase III, delta subunit	Replication, recombination and repair	2.67	1.34E-03
VS_3077	recQ	RecQ	Replication, recombination and repair	2.62	7.93E-03
VS_0013	-	DNA gyrase subunit B	Replication, recombination and repair	2.53	7.36E-06
VS_0012	recF	DNA replication and repair protein recF	Replication, recombination and repair	2.47	5.11E-04
VS_2526	-	Helicase	Replication, recombination and repair	2.36	3.47E-02
VS_0108	-	DNA polymerase I	Replication, recombination and repair	2.35	5.02E-04
VS_2456	radA	Predicted ATP-dependent serine protease	Replication, recombination and repair	2.33	4.05E-02
VS_0284	-	Replicative DNA helicase	Replication, recombination and repair	2.31	1.11E-02
VS_2596	recA	Protein recA (Recombinase A)	Replication, recombination and repair	2.19	7.87E-04
VS_0323	-	Single-strand binding protein (SSB) (Helix-destabilizing protein)	Replication, recombination and repair	2.16	3.22E-02
VS_0160	-	DNA-directed RNA polymerase omega chain	Replication, recombination and repair	2.02	8.71E-03
VS_2680	-	Putative Holliday junction resolvase	Replication, recombination and repair	-2.07	2.00E-02
VS_0350	rapA	RNA polymerase associated protein rapA	Replication, recombination and repair	-2.12	3.30E-03
VS_1957	polB	DNA polymerase II	Replication, recombination and repair	-2.18	4.39E-02
VS_2056	-	Integration host factor beta-subunit (IHF-beta)	Replication, recombination and repair	-2.8	9.70E-04
VS_II1431	-	Putative 3-methyladenine DNA glycosylase/8-oxoguanine DNA glycosylase	DNA replication, recombination, repair	-2.98	5.99E-04
VS_0459	-	NTP pyrophosphohydrolase	Replication, recombination and repair	-3.43	4.34E-04
VS_1518	-	ATP-dependent DNA ligase	Replication, recombination and repair	-3.47	2.28E-02
VS_II1161	-	DNA polymerase III, alpha subunit	Replication, recombination and repair	-4.25	6.46E-06
VS_1721	-	Integration host factor, alpha subunit	Replication, recombination and repair	-5.1	3.53E-07

Signalisation

VS_0410	-	Probable two-component system sensor kinase	Signalisation	3.88	6.25E-03
VS_0540	-	sensor histidine kinase	Signalisation	2.8	6.81E-04
VS_0873	-	putative sensory box/GGDEF family protein	Signalisation	2.63	3.40E-02
VS_0910	-	GGDEF family protein	Signalisation	2.52	2.66E-03
VS_0964	-	sensory box histidine kinase/response regulator	Signalisation	2.48	3.26E-03
VS_1155	-	Putative signal transduction protein (SH3 domain)	Signalisation	2.38	2.23E-03
VS_1307	-	predicted signal-transduction protein	Signalisation	2.36	8.54E-03
VS_1315	-	Signal transduction histidine kinase	Signalisation	2.3	3.68E-02
VS_1316	-	signal transduction histidine kinase	Signalisation	-2.19	7.64E-03
VS_1390	-	Response regulator	Signalisation	-2.26	4.86E-02
VS_1911	-	putative GGDEF family protein	Signalisation	-2.34	1.14E-02
VS_2042	-	DNA-binding response regulator	Signalisation	-2.41	1.48E-02
VS_2938	-	GGDEF family protein	Signalisation	-2.72	8.45E-04
VS_2940	-	sensory box histidine kinase/response regulator	Signalisation	-2.85	4.27E-03
VS_2949	-	Hypothetical response regulatory protein	Signalisation	-2.99	1.14E-03
VS_3042	-	hypothetical regulatory components of sensory transduction	Signalisation	-3	4.24E-04
VS_3043	-	Putative two-component response regulator	Signalisation	-3.24	4.35E-04
VS_II0009	-	GGDEF family protein	Signalisation	-3.27	2.49E-05
VS_II0271	-	GGDEF family protein	Signalisation	-3.75	6.01E-06
VS_II0303	-	Hypothetical protein containg GGDEF domain	Signalisation	-3.87	6.48E-05
VS_II0348	-	Putative two-component regulatory system; Multi-sensor hybrid histidine kinase	Signalisation	-4.05	1.16E-05
VS_II0675	-	Response regulator	Signalisation	-4.07	2.11E-05
VS_II0727	-	Putative two-component sensor	Signalisation	-4.09	6.87E-05

VS_II0761	-	Putative two-component regulatory system: response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HD-GYP domain	Signalisation	-4.14	7.06E-06
VS_II0864	-	putative sensor protein	Signalisation	-4.74	1.96E-06
VS_II0891	-	Putative diguanylate cyclase, GGDEF family protein	Signalisation	-4.86	2.06E-07
VS_II1181	-	response regulator	Signalisation	-5.32	1.10E-07
VS_II1409	-	Putative histidine kinase	Signalisation	-5.64	6.68E-08
VS_II1524	-	GGDEF family protein	Signalisation	-6.51	2.70E-08

LPS and capsule biogenesis

VS_2588	-	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	LPS and capsule biogenesis	4.86	6.10E-16
VS_0220	wzy	Putative O-antigen polymerase Wzy	LPS and capsule biogenesis	4.21	2.74E-06
VS_0225	wbbj	Galactoside O-acetyltransferase Wbbj	LPS and capsule biogenesis	4.08	1.49E-03
VS_0232	-	Putative UDP-glucose 4-epimerase	LPS and capsule biogenesis	3.97	4.09E-08
VS_0218	kdsB	Putative 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	LPS and capsule biogenesis	3.63	6.86E-07
VS_0233	-	Putative undecaprenyl-phosphate galactose phosphotransferase	LPS and capsule biogenesis	3.4	5.33E-04
VS_0230	-	Putative dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (rfbD)	LPS and capsule biogenesis	3.36	2.73E-06
VS_0221	-	Putative glycosyltransferase	LPS and capsule biogenesis	3.35	7.85E-05
VS_0213	-	Putative outer membrane protein involved in capsular polysaccharide export (wza)	LPS and capsule biogenesis	3.33	1.01E-04
VS_2061	-	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	LPS and capsule biogenesis	3.3	3.13E-03
VS_0216	kdsA	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate synthase KdsA	LPS and capsule biogenesis	3.19	1.96E-05
VS_0219	-	Putative D-arabinose 5-phosphate isomerase	LPS and capsule biogenesis	2.93	6.09E-06
VS_0229	-	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase	LPS and capsule biogenesis	2.75	1.14E-05
VS_2340	lpxA	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase	Lipopolysaccharide biosynthesis	2.71	3.83E-03
VS_0217	-	Putative 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase (KDO 8-P phosphatase)	LPS and capsule biogenesis	2.6	5.11E-04
VS_0194	-	Putative glycosyl transferase	LPS and capsule biogenesis	2.58	4.72E-02
VS_0215	-	Putative tyrosine-protein kinase (wzc)	LPS and capsule biogenesis	2.52	1.14E-04
VS_2339	-	Lipid-A-disaccharide synthase	Lipopolysaccharide biosynthesis	2.35	2.06E-03
VS_0228	rffH	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	LPS and capsule biogenesis	2.25	1.74E-03
VS_0231	-	Putative dTDP-rhamnosyl transferase	LPS and capsule biogenesis	2.21	3.54E-04
VS_0227	rffG	dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase	LPS and capsule biogenesis	2.15	2.74E-03
VS_1533	-	Putative glycosyl transferase	LPS and capsule biogenesis	-2.02	3.59E-02
VS_2150	-	lipopolysaccharide biosynthesis protein	LPS and capsule biogenesis	-2.16	3.88E-02
VS_1528	-	Putative glycosyltransferase	LPS and capsule biogenesis	-2.26	2.92E-02
VS_1140	-	GtrA-like integral membrane protein	LPS and capsule biogenesis	-4.31	1.91E-05
VS_1522	-	Putative capsular polysaccharide biosynthesis protein	LPS and capsule biogenesis	-4.92	1.96E-06
VS_2432	-	Glycosyltransferase	LPS and capsule biogenesis	-5.02	9.18E-07
VS_1521	-	Periplasmic protein involved in polysaccharide export	LPS and capsule biogenesis	-5.18	5.98E-07

Pilus biogenesis

VS_0327	mshK	MSHA biogenesis protein MshK	Pilus biogenesis	3.83	4.97E-03
VS_0329	mshM	MSHA biogenesis protein MshM	Pilus biogenesis	2.75	2.33E-02
VS_0334	mshB	MSHA pilin protein MshB	Pilus biogenesis	2.08	1.01E-02
VS_0902	-	Putative type IV pilus assembly FimV-related transmembrane protein	Pilus biogenesis	2.03	5.82E-04
VS_0336	mshC	MSHA pilin protein MshC	Pilus biogenesis	-2.49	1.69E-02
VS_2435	tadC	Flp pilus assembly protein TadC	Pilus biogenesis	-6.08	6.31E-09
VS_2437	-	Flp pilus assembly protein	Pilus biogenesis	-6.53	3.14E-09
VS_2438	-	Flp pilus assembly protein	Pilus biogenesis	-6.68	5.06E-09
VS_2436	tadB	Flp pilus assembly protein TadB	Pilus biogenesis	-7.12	7.93E-11
VS_2443	-	Flp pilus assembly protein	Pilus biogenesis	-8.26	7.73E-13
VS_2444	cpaB	Flp pilus assembly protein CpaB	Pilus biogenesis	-8.89	6.57E-13
VS_2445	-	Putative ATPase with chaperone activity, associated with Flp pilus assembly	Pili biogenesis	-10	6.91E-16
VS_2446	cpaA	Putative Flp pilus assembly protein, protease CpaA (Type IV prepilin peptidase)	Pili biogenesis	-11	2.12E-17
VS_2447	-	Putative pilin	Pili biogenesis	-11	2.10E-19

Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle

VS_II0904	-	Aldehyde dehydrogenase	Tryptophan metabolism ; Propanoate metabolism	7.65	4.14E-34
VS_2246	-	Putative succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	6.13	3.85E-26
VS_2244	sdhB	succinate dehydrogenase	Butanoate metabolism	6.06	4.22E-22
VS_2241	sucC	Succinyl-CoA synthetase beta chain	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5.7	1.81E-24
VS_2242	-	Dihydropolyllysine-residue succinyltransferase (component of 2-oxoglutaratedehydrogenase complex)	Tryptophan metabolism	5.66	1.05E-25
VS_2243	-	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	Tryptophan metabolism	5.61	5.89E-27
VS_2240	-	Succinyl-CoA synthetase alpha chain	Propanoate metabolism	5.32	7.65E-22
VS_0131	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	TCA cycle	5.22	1.19E-23
VS_2247	-	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	4.77	2.02E-10
VS_2248	-	Succinate dehydrogenase cytochrome	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	4.64	1.35E-15

VS_II0346	gapC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	4.43	2.61E-13
VS_2249	-	Citrate synthase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4.37	2.06E-15
VS_2937	-	Fumarate hydratase class II	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	3.98	8.68E-13
VS_2881	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis/Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3.51	1.55E-11
VS_II1225	ppsA	Phosphoenolpyruvate synthase/pyruvate phosphate dikinase	Glycolysis	3.32	2.93E-09
VS_0389	-	Acetolactate synthase isozyme III small subunit	Pyruvate metabolism; Butanoate metabolism;	3.25	3.06E-06
VS_0388	-	Acetolactate synthase isozyme III large subunit	Butanoate metabolism	3.23	4.86E-10
VS_1071	-	Isocitrate dehydrogenase	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	3.17	1.05E-09
VS_2540	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	3.07	1.56E-08
VS_2252	pgm	Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.05	2.18E-05
VS_1202	sfcA	Malate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.92	9.97E-05
VS_1407	-	Putative phosphoenolpyruvate synthase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.92	1.40E-02
VS_0358	-	Malate dehydrogenase	TCA cycle, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.53	5.35E-06
VS_II0264	aceA	Isocitrate lyase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.4	3.44E-05
VS_2645	-	Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	2.35	2.00E-05
VS_2522	-	Aconitate hydratase 2 (Citrate hydro-lyase 2)	TCA cycle	2.12	9.53E-05
VS_1037	-	Pyruvate kinase II	Glycolysis / Gluconeogenesis; Carbon fixation in photosynthetic organisms	-2.6	1.10E-03

Virulence

VS_II0905	-	Putative endoribonuclease, translation inhibitor	Virulence	9.49	2.24E-30
VS_II0149	-	Phospholipase	Virulence	6.96	3.03E-11
VS_II1062	inhA/prtV	Putative M6 secreted metalloprotease PrtV/inhA V	Virulence	6.94	1.17E-28
VS_1527	luxN	sensor protein LuxN	Quorum sensing	3.3	1.48E-04
VS_m0154	luxM	Lux M	Quorum sensing	3.02	5.58E-04
VS_2581	-	Putative TPR repeat protein	Virulence	2.81	3.97E-02
VS_II0260	luxT	LuxT regulator	Quorum sensing	2.7	1.12E-05
VS_II0261	csrA	Carbon storage regulator CsrA	Quorum sensing	2.47	9.86E-05
VS_II0283	-	adenosylhomocysteine nucleosidase	Cysteine and methionine metabolism	2.1	1.58E-02
VS_II1425	-	Putative hemolysin-type RTX toxin	Virulence	2	1.77E-04
VS_II0512	luxO	Putative LuxO repressor protein	Quorum sensing	-2.34	4.92E-03
VS_II0855	csrB3	CsrB3	Quorum sensing	-2.36	1.12E-03
VS_II0856	csrB2	CsrB2 sRNA	Quorum sensing	-2.79	5.54E-06
VS_II1066	epsN	general secretion pathway protein N	Type II protein secretion system	-2.92	2.89E-03
VS_0145	csrB1	CsrB1	Virulence	-3	1.01E-08
VS_1240	csrB4	small regulatory RNA CsrB4	Quorum sensing	-3.17	1.39E-07
VS_1267	-	Putative hemolysin-type calcium-binding region	Virulence	-3.43	7.11E-05
VS_1281	-	Putative RTX toxin, VCBS repeat protein	RTX toxin	-3.76	7.66E-05
VS_1394	-	Conserved hypothetical protein (N-terminal part of VS_II0856)	RTX toxin	-3.79	6.52E-06
VS_1842	-	Conserved hypothetical protein, VCBS repeat, possible RTX toxin	RTX toxin	-4.34	1.21E-07
VS_II0905	-	Putative cyclic di-GMP phosphodiesterase response regulator	Signalisation	-4.44	7.70E-06
VS_II1062	vsm	Extracellular zinc metalloprotease	Virulence	-5.77	2.11E-05
VS_m2362	-	Putative biofilm-associated surface protein	Virulence	-6.17	2.66E-10

Envelope biogenesis

VS_2487	secG	Preprotein translocase subunit SecG	Envelope biogenesis	4.47	1.52E-11
VS_2478	-	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Envelope biogenesis	4.25	2.77E-16
VS_0663	mltF	Lytic transglycosylase MltF	Murein	4.24	7.40E-04
VS_0712	rodA	Rod shape-determining protein rodA	Murein	4.21	2.32E-02
VS_2811	secY	SecY, Preprotein translocase subunit SecY	Protein translocation	4.01	1.18E-16
VS_2488	glmM	Phosphoglucomutase	Carbon compound utilization	3.09	4.97E-06
VS_0003	oxaA	Inner membrane protein oxaA	Envelope biogenesis	2.99	1.25E-07
VS_2694	-	Membrane-bound lytic murein transglycosylase C precursor	Envelope biogenesis	2.94	5.51E-03
VS_0666	-	Putative 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase; DapD-like	Murein	2.82	4.83E-04
VS_0689	ppiA	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	Envelope biogenesis	2.67	6.75E-03
VS_2477	nlpI	lipoprotein NlpI	Envelope biogenesis	2.55	7.94E-03
VS_0321	-	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	Murein and LPS	2.37	1.36E-03
VS_II0679	-	Tol R/Q protein	Envelope biogenesis	2.15	3.22E-03
VS_1117	-	Peptidoglycan-associated lipoprotein precursor	Envelope biogenesis	2.14	3.59E-04
VS_0713	-	Penicillin-binding protein 2	Murein	2.02	4.40E-02
VS_0206	secB	Protein export chaperon	Protein translocation	-2.36	1.08E-03
VS_m2162	-	SRP_bact	Envelope biogenesis	-2.58	2.81E-07
VS_II0550	dacA	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	Murein	-2.63	1.65E-03
VS_II1325	mpaA	Murein peptide amidase A	Murein	-2.83	6.37E-03
VS_II1250	-	N-acetylglucosaminyltransferase	Murein	-4.27	7.70E-06
VS_0574	mepA	Penicillin-insensitive murein endopeptidase	Murein	-4.86	6.85E-07

Fatty acid and phospholipid metabolism

VS_2217	pfaC	PfaC, omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase	Fatty acid metabolism	4.06	1.23E-05
---------	------	---	-----------------------	------	----------

VS_II0773	-	long-chain fatty acid transport protein	Fatty acid metabolism	3.4	4.64E-09
VS_0749	ispE	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	Isoprenoid biosynthesis	3.05	4.09E-08
VS_0041	-	3-hydroxybutyryl-CoA epimerase, Fatty acid oxidation complex subunit alpha	Butanoate metabolism	2.71	9.66E-08
VS_1043	-	Putative oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase with NAD(P)-binding domain	Fatty acid metabolism	2.71	2.20E-02
VS_0040	-	3-ketoacyl-CoA thiolase (Fatty oxidation complex beta subunit)	Fatty acid metabolism	2.44	1.79E-06
VS_2743	plsC	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	2.42	3.95E-02
VS_2216	pfaB	PfaB, omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase	Fatty acid metabolism	2.37	3.33E-02
VS_0861	-	Long-chain fatty acid transport protein precursor	Fatty acid metabolism	2.25	1.91E-05
VS_1026	-	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	Fatty acid metabolism	2.17	3.87E-04
VS_2341	fabZ	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein]dehydratase	Fatty acid metabolism	2.1	2.93E-02
VS_0938	fadH	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH]	Fatty acid metabolism	2.07	5.23E-04
VS_0786	-	putative phospholipid biosynthesis acyltransferase	Fatty acid metabolism	-2.19	1.82E-02
VS_3007	-	Diacylglycerol kinase	Glycerophospholipid metabolism	-2.4	7.20E-03
VS_II0760	-	Putative trans-2-enoyl-CoA reductase (NAD(+))	Butanoate metabolism	-2.49	1.63E-02
VS_II1052	-	Fatty acid cis/trans isomerase	Fatty acid metabolism	-2.62	1.75E-03
VS_II0647	-	Putative lipase	Fatty acid metabolism	-2.63	2.33E-02
VS_II1294	-	Putative muconate cycloisomerase	Fatty acid and phospholipid metabolism	-2.77	1.45E-02
VS_II0587	phaC	Polyhydroxyalkanoic acid synthase	Fatty acid metabolism	-3.23	2.70E-04
VS_II0230	-	Putative exported triacylglycerol hydrolase/lipase	Fatty acid metabolism	-3.28	3.01E-02
VS_II0585	atoB	Acetyl-CoA acetyltransferase	Pyruvate metabolism;	-3.92	7.91E-05
VS_II1510	-	Conserved acetyl CoA synthase	Butanoate metabolism	-3.96	3.41E-03
VS_II0584	-	Acetoacetyl-CoA reductase	Butanoate metabolism	-4.94	3.83E-06

Central intermediary metabolism

VS_0300	cysI	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component	Sulfur metabolism	5.39	2.35E-23
VS_2788	cysN	Sulfate adenylate transferase subunit 1	Sulfur metabolism	5.2	3.17E-24
VS_0301	-	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	Sulfur metabolism	4.8	3.94E-16
VS_2789	cysD	sulfate adenylate transferase, subunit 2	Sulfur metabolism	4.53	1.85E-20
VS_2892	-	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	One carbon pool by folate	4.49	3.92E-13
VS_0299	cysJ	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	Sulfur metabolism	4.38	7.71E-17
VS_2639	-	Ribose-5-phosphate isomerase A	Pentose phosphate pathway	4.32	6.60E-05
VS_2654	-	Transketolase 1	Pentose phosphate pathway (non oxydative branch)	3.92	5.11E-12
VS_0924	phoA	Alkaline phosphatase III	Phosphorus metabolism	3.69	1.78E-06
VS_2489	-	dihydropteroate synthase	Folate biosynthesis	3.35	3.98E-02
VS_II0138	-	3-keto-L-gulonate 6-phosphate decarboxylase	Pentose and glucuronate interconversions	3.04	3.45E-02
VS_2786	cysC	Adenylylsulfate kinase	Sulfur metabolism	2.56	3.84E-04
VS_2655	-	S-adenosylmethionine synthetase	SAM biosynthesis	2.11	3.32E-04
VS_1239	speB	Agmatinase (Agmatine ureohydrolase)	Arginine and proline metabolism	-3.32	1.01E-04
VS_1238	speA	Biosynthetic arginine decarboxylase	Putrescine biosynthesis	-3.41	4.45E-06
VS_II0870	-	Putative type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	Phosphorus metabolism	-5.27	4.43E-07

Transcriptional regulation

VS_0322	lrp	Leucine-responsive regulatory protein	Transcriptional regulation	3.84	1.76E-09
VS_II0114	glpR	DNA-binding transcriptional repressor GlpR	Transcriptional regulation	3.8	4.22E-02
VS_2047	-	Hypothetical transcriptional regulator	Transcriptional regulation	2.5	4.88E-02
VS_2141	crp	cAMP-binding protein CRP	Catabolic repression	2.18	3.06E-03
VS_2236	-	Putative regulatory protein	Transcriptional regulation	2.12	2.52E-02
VS_2855	-	predicted transcriptional regulator	Transcriptional regulation	2.07	4.97E-02
VS_II0093	-	AraC-type transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-2.02	2.66E-02
VS_II0101	-	Putative transcriptional regulator, AraC/XylS family	Transcriptional regulation	-2.54	3.71E-03
VS_II0118	-	Transcriptional regulators, LysR family	Transcriptional regulation	-2.71	1.11E-02
VS_II0120	-	Transcriptional regulators, LysR family	Transcriptional regulation	-3.01	3.60E-03
VS_II0817	-	Transcriptional regulator, LysR family	Transcriptional regulation	-3.19	1.90E-02
VS_II1402	-	transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-3.95	1.03E-02
VS_II0110	-	transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-5.33	5.24E-07

Chemotaxis

VS_1157	-	Histidine kinase, HAMP region: Bacterial chemotaxis sensory transducer	Chemotaxis	3.56	1.99E-03
VS_II1312	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.3	4.12E-05
VS_II1300	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.03	8.44E-05
VS_II1084	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.02	3.30E-03
VS_0800	-	Methylase of chemotaxis methyl-accepting protein CheR	Chemotaxis	2.71	1.01E-06
VS_1907	-	methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.34	2.60E-02
VS_1636	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.21	1.95E-02
VS_1396	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.18	8.68E-04
VS_II0216	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.05	3.29E-04
VS_0929	-	Putative Methyl-accepting chemotaxis protein 1	Chemotaxis	-2.06	2.36E-02
VS_II1337	-	Putative methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	-2.8	1.01E-02
VS_II0428	-	chemotactic transducer-related protein	Chemotaxis	-6.24	1.56E-08

Mobile genetic elements

VS_0486	-	Integrase, catalytic region (fragment)	Mobile genetic elements	-2.82	3.51E-02
VS_1387	-	Putative site-specific recombinase, phage integrase family	Mobile genetic element	-3.72	3.18E-05
VS_1389	-	Putative site-specific recombinase, phage integrase family	Mobile genetic element	-4.88	1.18E-06
VS_1455	-	Putative integrase/transposase	Mobile genetic element	-4.03	8.65E-03
VS_1873	-	Transposase (orfB) of insertion sequence ISVisp1 ; IS3 family subgroup IS3	Mobile genetic element	-2.66	5.44E-03
VS_1890	intlA	Site-specific recombinase IntlA	Mobile genetic element	-3.08	6.47E-03
VS_II0090	-	Transposase (orfB) of insertion sequence ISVisp4 ; IS3 family subgroup IS3	Mobile genetic element	-4.71	2.04E-02
VS_II0824	-	Partial transposase (orfB) of insertion sequence ISVisp1 ; IS3 family subgroup IS3	Mobile genetic element	-2.51	1.90E-02
VS_II0825	-	Transposase (orfA) of insertion sequence ISVisp1 ; IS3 family subgroup IS3	Mobile genetic element	-2.37	9.33E-03
VS_II0843	-	Putative phospholipid-binding protein	Fatty acid metabolism	-4.94	9.23E-05
VS_II1507	-	Putative ICEVchMex1 encoded homologue	Mobile genetic element	-3.91	1.17E-03

Protein and peptide degradation

VS_II0903	-	Putative dipeptidase	Protein and peptide degradation	6	1.05E-25
VS_2422	pepD	Aminoacyl-histidine dipeptidase	Protein and peptide degradation	4.08	6.88E-06
VS_1430	-	Putative protease La homolog	Protein and peptide degradation	3.7	9.66E-05
VS_II0899	pip	Prolyl aminopeptidase	Protein and peptide degradation	2.97	1.21E-03
VS_0614	-	Peptidase B	Protein and peptide degradation	2.49	2.08E-04
VS_II0815	-	Putative SI family secreted trypsin-like serine protease	Protein and peptide degradation	-2.11	5.77E-03
VS_0084	opdA	Oligopeptidase A	Protein and peptide degradation	-2.83	5.47E-04
VS_0866	-	Secreted/periplasmic Zn-dependent peptidases, insulinase-like	Protein and peptide degradation	-3	3.36E-04
VS_0879	-	Putative serine protease	Protein and peptide degradation	-6.13	5.48E-10
VS_1972	-	Putative membrane associated protease, stomatin-like	Protein and peptide degradation	-7.07	5.30E-11

Cell division

VS_0443	fstL	Cell division protein FtsL	Cell division	4.05	3.43E-02
VS_1095	mukE	Chromosome partition protein mukE	Cell division	3.7	5.58E-03
VS_1096	mukB	Chromosome partition protein mukB	Cell division	3.04	1.80E-07
VS_0710	-	Putative Penicillin-binding protein	Cell division	2.81	9.06E-05
VS_0343	mreD	Rod shape-determining protein mreD	Cell division	2.78	2.20E-02
VS_0341	mreB	Rod shape-determining protein mreB	Cell division	2.65	3.44E-04

DNA metabolism

VS_2394	xni	Exodeoxyribonuclease IX	DNA metabolism	3.38	4.06E-02
VS_1370	-	Conserved hypothetical protein; putative endonuclease	DNA metabolism	3.34	3.71E-03
VS_1253	-	Putative 3'-5' exonuclease	DNA metabolism	-2.52	1.68E-02
VS_II0784	-	Predicted ATP-dependent endonuclease	DNA metabolism	-4.38	6.24E-06
VS_1802	-	Hypothetical nudix hydrolase	DNA metabolism	-4.76	3.69E-06

Transcription

VS_0153	-	ATP-dependent RNA helicase RhlB	Transcription	3.1	8.31E-07
VS_2409	nusB	N utilization substance protein B homolog	Transcription	2.66	5.41E-03
VS_2483	nusA	Transcription antitermination protein NusA	Transcription	2.35	6.45E-06
VS_3073	-	Putative Transcription accessory protein (possible RNA-binding domain)	Transcription	-2.12	4.89E-03

Motility

VS_0813	-	Polar flagellin B	Motility	2.93	4.36E-06
VS_0819	flaK	Polar flagellar protein FlaK	Motility	2.08	1.83E-03
VS_2293	-	polar flagellin	Motility	2.45	1.16E-05

Unknown functions

VIBSP2_misc_RNA_19	Vsr217	IGR VS_II0219-VS_II0220	sRNA of unknown function	6.37	1.62E-22
VIBSP1_misc_RNA_136	Vsr141	AS to VS_2048	sRNA of unknown function	4.65	2.55E-06
VIBSP1_misc_RNA_170	Vsr177	IGR VS_2739- VS_2740	sRNA of unknown function	4.28	5.58E-04
VIBSP1_misc_RNA_46	vsr47	IGR VS_0628- VS_0629	sRNA of unknown function	4.28	8.21E-06
VIBSP1_misc_RNA_76	Vsr80	IGR VS_1120-VS_1121	sRNA of unknown function	3.48	4.57E-03
VIBSP2_misc_RNA_73	Vsr271	IGR VS_II0901-VS_II0902	sRNA of unknown function	3.47	7.10E-06
VIBSP1_misc_RNA_153	Vsr159	IGR VS_2288- VS_2289	sRNA of unknown function	2.9	1.34E-03
VIBSP1_misc_RNA_160	Vsr167	sRNA Vsr167: IGR VS_2479- VS_2479	sRNA of unknown function	2.49	1.24E-02
VIBSP1_misc_RNA_192	Vsr198	IGR VS_3142- VS_3143	sRNA of unknown function	2.47	1.57E-03
VIBSP1_misc_RNA_5	Vsr5	IGR2 VS_0034- VS_0035	sRNA of unknown function	2.36	2.05E-02
VS_m0034	-	yybP-ykoY	sRNA of unknown function	2.35	2.44E-02
VIBSP1_misc_RNA_8	Vsr9	IGR VS_0112- VS_0113	sRNA of unknown function	2.25	6.15E-03
VIBSP2_misc_RNA_94	Vsr293	IGR1 VS_II1189-VS_II1190	sRNA of unknown function	-2.03	3.06E-03
VIBSP2_misc_RNA_88	Vsr286	Vsr286: IGR VS_II1134-VS_II1135	sRNA of unknown function	-2.11	1.65E-02
VIBSP1_misc_RNA_87	vsr91	IGR VS_1291- VS_1294	sRNA of unknown function	-2.35	4.37E-03
VIBSP1_misc_RNA_137	Vsr142	IGR VS_2078- VS_2079	sRNA of unknown function	-2.36	1.72E-02
VIBSP1_misc_RNA_173	Vsr180	IGR VS_2790- VS_2791	sRNA of unknown function	-2.5	3.23E-02
VIBSP1_misc_RNA_81	vsr85	AS to VS_1168	sRNA of unknown function	-2.52	3.99E-02
VIBSP2_misc_RNA_95	Vsr294	AS to VS_II1190	sRNA of unknown function	-2.54	3.91E-04
VIBSP2_misc_RNA_85	Vsr283	IGR VS_II1100-VS_II1101	sRNA of unknown function	-2.65	3.94E-03
VIBSP2_misc_RNA_5	Vsr203	IGR VS_II0045-VS_II0047	sRNA of unknown function	-2.71	8.50E-03
VIBSP1_misc_RNA_166	Vsr173	IGR VS_t2708- VS_2709	sRNA of unknown function	-2.73	1.97E-02
VIBSP2_misc_RNA_109	Vsr308	IGR VS_II1374-VS_II1375	sRNA of unknown function	-2.76	1.03E-02

VIBSP2_misc_RNA_86	lsrK	lsrK Hfq binding RNA	sRNA of unknown function	-2.82	1.82E-04
VIBSP1_misc_RNA_86	vsr90	IGR2 VS_1261- VS_1262	sRNA of unknown function	-2.87	1.59E-03
VIBSP1_misc_RNA_77	vsr81	IGR UTR VS_t1131-VS1132	sRNA of unknown function	-2.96	9.33E-03
VIBSP2_misc_RNA_112	Vsr311	IGR VS_II1397-VS_II1398	sRNA of unknown function	-2.98	1.04E-04
VIBSP2_misc_RNA_110	Vsr309	AS to VS_II1376	sRNA of unknown function	-2.99	3.24E-02
VIBSP1_misc_RNA_133	Vsr138	IGR VS_1942- VS_1943	sRNA of unknown function	-3.04	7.45E-04
VIBSP1_misc_RNA_152	Vsr158	AS to VS_2288	sRNA of unknown function	-3.08	4.15E-03
VIBSP1_misc_RNA_27	Vsr28	AS to VS_0322	sRNA of unknown function	-3.1	8.50E-03
VIBSP2_misc_RNA_103	Vsr302	AS to VS_II1293	sRNA of unknown function	-3.12	1.48E-02
VIBSP1_misc_RNA_2	Vsr2	IGR VS_0013- VS_0014	sRNA of unknown function	-3.13	2.21E-04
VIBSP1_misc_RNA_141	Vsr146	IGR SRP- VS_2163:	sRNA of unknown function	-3.26	4.98E-03
VIBSP1_misc_RNA_30	Vsr31	IGR VS_0458- VS_0459	sRNA of unknown function	-3.29	1.93E-03
VIBSP2_misc_RNA_100	Vsr299	IGR2 VS_II1279-VS_II1280	sRNA of unknown function	-3.42	1.59E-03
VIBSP2_misc_RNA_61	Vsr259	IGR1 VS_II0725-VS_II0726	sRNA of unknown function	-3.44	4.83E-05
VIBSP2_misc_RNA_114	Vsr313	IGR VS_II1404-VS_II1405	sRNA of unknown function	-3.46	5.58E-05
VIBSP2_misc_RNA_111	Vsr10	IGR VS_II1377-VS_II1378	sRNA of unknown function	-3.47	2.38E-05
VIBSP2_misc_RNA_14	Vsr212	AS to VS_II0162	sRNA of unknown function	-3.6	9.67E-03
VIBSP2_misc_RNA_55	Vsr253	IGR2 VS_II0619-VS_II0620	sRNA of unknown function	-3.66	8.14E-05
VIBSP2_misc_RNA_39	Vsr237	IGR VS_II0466-VS_II0467	sRNA of unknown function	-3.78	4.02E-04
VIBSP2_misc_RNA_4	Vsr202	IGR VS_II0032-VS_II0033	sRNA of unknown function	-3.9	4.57E-03
VIBSP1_misc_RNA_123	Vsr127	IGR1 VS_1720- VS_1721	sRNA of unknown function	-3.91	1.76E-04
VIBSP1_misc_RNA_63	vsr67	IGR VS_0947- VS_t0948	sRNA of unknown function	-4.01	8.17E-04
VIBSP2_misc_RNA_62	Vsr260	IGR VS_II0729-VS_II0730	sRNA of unknown function	-4.03	5.23E-04
VIBSP1_misc_RNA_19	Vsr20	IGR VS_0239- VS_0240	sRNA of unknown function	-4.07	4.18E-05
VIBSP1_misc_RNA_148	Vsr154	IGR2 VS_2279- VS_2280	sRNA of unknown function	-4.22	1.47E-02
VIBSP1_misc_RNA_108	Vsr112	IGR VS_1494- VS_1495	sRNA of unknown function	-4.24	7.71E-04
VIBSP2_misc_RNA_83	Vsr281	IGR VS_II1079-VS_II1080	sRNA of unknown function	-4.31	2.80E-03
VIBSP1_misc_RNA_168	Vsr175	sRNA Vsr175: IGR2 VS_2709-VS_r2711	sRNA of unknown function	-4.38	2.55E-05
VIBSP2_misc_RNA_60	vsr258	sRNA Vsr258 IGR2 VS_II0725-VS_II0726	sRNA of unknown function	-4.62	2.97E-06
VIBSP1_misc_RNA_124	Vsr128	sRNA Vsr128 IGR VS_1726- VS_1727	sRNA of unknown function	-4.72	9.75E-07
VIBSP2_misc_RNA_89	Vsr287	sRNA Vsr287 IGR VS_II1137-VS_II1138	sRNA of unknown function	-4.72	5.80E-04
VIBSP2_misc_RNA_50	Vsr248	IGR2 VS_II0609-VS_II0608	sRNA of unknown function	-5.2	1.14E-04
VIBSP2_misc_RNA_7	Vsr205	AS to VS_II0074	sRNA of unknown function	-5.21	8.20E-07
VIBSP1_misc_RNA_84	vsr88	IGR VS_1241- VS_1242	sRNA of unknown function	-5.37	1.93E-02
VIBSP2_misc_RNA_23	Vsr221	sRNA Vsr221 IGR1 VS_II0224-VS_II0225	sRNA of unknown function	-5.51	6.31E-08
VIBSP1_misc_RNA_167	Vsr174	IGR1 VS_2709- VS_t2711	sRNA of unknown function	-5.52	1.35E-04
VIBSP1_misc_RNA_149	Vsr155	Putative sRNA Vsr155: IGR VS_2283- VS_2284	sRNA of unknown function	-5.97	6.22E-08
VIBSP1_misc_RNA_45	Vsr46	sRNA Vsr46: IGR VS_0574- VS_0575	sRNA of unknown function	-6.4	1.48E-09
VIBSP1_misc_RNA_26	Vsr27	IGR VS_0321- VS_0322	sRNA of unknown function	-6.52	1.68E-08
VIBSP2_misc_RNA_20	Vsr218	AS to VS_II0220- VS_II0221	sRNA of unknown function	-6.83	7.12E-07
VIBSP2_misc_RNA_44	Vsr242	IGR VS_II0566-VS_II0567	sRNA of unknown function	-7.45	6.02E-13
VIBSP1_misc_RNA_157	Vsr164	IGR VS_2428-VS_2429	sRNA of unknown function	-7.96	2.41E-11
VS_1283	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	7.26	1.08E-28
VS_1068	-	hypothetical protein	Unknown function	6.39	3.76E-30
VIBSP1_CDS1223061R	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	5.42	1.13E-09
VS_2858	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	5.14	3.73E-14
VS_1156	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	5.1	5.33E-04
VS_2137	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.84	3.16E-03
VS_2587	-	Putative lipoprotein	Unknown function	4.81	2.84E-08
VS_II0263	-	Hypothetical protein	Unknown function	4.67	7.04E-05
VS_2594	-	hypothetical protein	Unknown function	4.62	2.55E-06
VS_2631	-	hypothetical protein	Unknown function	4.42	1.22E-02
VS_2966	-	hypothetical protein	Unknown function	4.29	4.36E-14
VS_0505	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.26	4.08E-07
VS_1832	-	hypothetical protein	Unknown function	4.21	1.18E-03
VS_0319	-	Hypothetical protein	Unknown function	4.12	2.80E-02
VS_II1421	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.12	2.12E-03
VS_0947	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.08	3.45E-02
VS_II0998	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.04	1.93E-02
VS_II0210	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.02	3.95E-06
VS_0004	-	Hypothetical protein	Unknown function	4	1.98E-03
VS_II1178	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	3.98	2.51E-03
VS_2036	-	hypothetical protein	Unknown function	3.97	4.96E-05
VS_II0279	-	hypothetical protein	Unknown function	3.96	4.28E-03
VS_II1505	-	hypothetical protein	Unknown function	3.95	4.19E-02
VS_1599	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.94	2.92E-02
VS_1463	-	hypothetical protein	Unknown function	3.88	4.51E-03
VS_1102	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.81	7.08E-03
VS_2734	-	hypothetical membrane protein	Unknown function	3.79	1.14E-03
VS_1019	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.76	3.81E-13
VS_0122	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.74	5.75E-08
VS_II0901	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.73	7.00E-14
VS_II0513	-	hypothetical protein	Unknown function	3.72	1.73E-11
VS_0963	-	hypothetical protein	Unknown function	3.67	1.45E-02
VS_1469	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.67	1.90E-04
VS_1921	-	Predicted periplasmic lipoprotein	Unknown function	3.65	2.06E-07
VS_1372	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.63	5.83E-04
VS_2089	-	hypothetical protein	Unknown function	3.6	1.33E-02
VS_1922	-	hypothetical protein	Unknown function	3.59	3.47E-08
VS_1686	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.54	2.33E-02
VS_II1404	-	Putative sulfurtransferase	Sulfur metabolism	3.51	2.39E-04

VS_0176	-	hypothetical protein	Unknown function	3.49	7.89E-03
VS_1340	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.48	1.43E-05
VIBSP1_CDS2590728D	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	3.41	9.49E-03
VS_2629	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.37	3.43E-02
VS_II0160	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.37	6.41E-03
VS_1266	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.36	1.30E-04
VS_1159	-	hypothetical protein	Unknown function	3.35	1.95E-02
VS_II0211	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.28	3.01E-06
VS_II0212	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.28	7.41E-04
VS_III184	-	hypothetical protein	Unknown function	3.28	1.02E-02
VS_2595	-	hypothetical protein	Unknown function	3.21	4.40E-04
VS_2729	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.2	5.10E-06
VS_1031	-	Putative Mg-dependent DNase	Unknown function	3.19	1.35E-02
VIBSP2_CDS1210380D	-	conserved protein of unknown function	Unknown function	3.18	1.90E-03
VS_2730	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.18	1.14E-05
VS_1215	-	Conserved hypothetical protein, putative lipoprotein	Unknown function	3.17	1.88E-02
VS_0690	-	putative lipoprotein	Unknown function	3.13	5.44E-03
VS_1548	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.13	1.92E-02
VS_1393	-	outer membrane protein	Unknown function	3.07	1.33E-04
VS_0212	-	Conserved hypothetical protein; Putative lipoprotein	Unknown function	3.04	2.03E-04
VS_III107	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.03	1.60E-02
VS_0375	-	conserved protein	Unknown function	3.01	6.99E-03
VS_2391	-	TPR-repeat-containing protein	Unknown function	3.01	1.91E-02
VS_2936	-	hypothetical protein	Unknown function	3	7.41E-03
VS_1755	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.97	2.08E-02
VS_III1378	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.95	1.36E-02
VS_2183	-	Hypothetical membrane protein	Unknown function	2.93	2.79E-03
VS_II0014	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.93	5.89E-05
VS_II0016	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.88	1.19E-05
VS_0577	-	Putative peptidase U32	Unknown function	2.85	2.53E-04
VS_1687	-	Hypothetical acetyltransferase	Unknown function	2.82	9.56E-04
VS_1920	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	2.77	4.46E-05
VS_II0726	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.76	2.22E-03
VS_1374	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.75	2.30E-03
VS_II0900	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.75	4.41E-08
VS_1158	-	hypothetical protein	Unknown function	2.73	2.64E-04
VS_2492	-	Putative RNA-binding protein	Unknown function	2.66	3.48E-03
VS_0700	-	hypothetical protein	Unknown function	2.58	1.82E-02
VS_1118	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.53	6.19E-04
VS_0399	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.52	1.64E-05
VS_II0020	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.52	4.94E-03
VS_II0966	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.52	4.30E-02
VS_II0292	-	hypothetical protein	Unknown function	2.51	1.17E-04
VS_0209	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	2.5	1.07E-02
VS_III1376	-	Putative tetratricopeptide repeat containing protein	Unknown function	2.49	6.81E-04
VS_1566	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.45	1.10E-02
VS_2998	-	Outer membrane protein	Unknown function	2.45	3.31E-04
VS_0210	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.43	2.16E-02
VS_0911	-	hypothetical protein	Unknown function	2.42	2.78E-02
VS_2033	-	Hypothetical UPF0274 protein	Unknown function	2.42	1.58E-02
VS_II0135	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.42	3.98E-02
VS_0208	-	Conserved membrane protein of unknown function	Unknown function	2.41	9.44E-06
VS_1154	-	hypothetical protein	Unknown function	2.41	3.42E-06
VS_II0534	-	ABC transporter: ATP binding protein	Unknown function	2.4	1.21E-02
VS_2653	-	hypothetical protein	Unknown function	2.39	4.03E-05
VS_0966	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.37	7.55E-03
VS_3005	-	O-methyltransferase-related protein	Unknown function	2.36	1.13E-05
VS_0191	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.33	5.29E-03
VS_0848	-	hypothetical protein	Unknown function	2.3	4.47E-04
VS_1063	-	hypothetical protein	Unknown function	2.3	1.90E-02
VS_II0027	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.3	4.83E-03
VS_0621	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.28	4.61E-04
VIBSP1_CDS34891D	-	conserved inner membrane peptide of unknown function	Unknown function	2.2	6.45E-03
VS_2361	-	acetyltransferase-related protein	Unknown function	2.18	4.08E-05
VS_0969	-	hypothetical protein	Unknown function	2.17	4.56E-02
VS_1367	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.17	1.50E-02
VS_1092	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.16	1.39E-02
VS_2915	-	putative periplasmic protein	Unknown function	2.16	1.86E-04
VS_3115	-	Putative carbonic anhydrase, family 3	Unknown function	2.14	1.96E-02
VS_1960	-	Conserved protein of unknown function; putative dsDNA mimic	Unknown function	2.1	1.51E-02
VS_II0996	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.1	1.69E-02
VS_III1106	-	hypothetical protein	Unknown function	2.07	2.95E-02
VS_1111	-	hypothetical protein	Unknown function	2.06	3.38E-03
VS_1413	-	Putative membrane protein	Unknown function	-2.01	4.34E-02
VS_1776	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.01	1.53E-02
VS_2328	-	SAM-dependent methyltransferase	Unknown function	-2.01	7.64E-03
VS_II0425	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.01	4.72E-02
VS_II0033	-	Amidase related to nicotinamidase	Unknown function	-2.02	1.10E-02
VS_II0152	-	Ferredoxin--NADP reductase	Unknown function	-2.03	4.14E-02

VS_II1155	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.04	2.52E-02
VS_0687	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.05	2.91E-02
VS_1261	-	Putative conserved membrane GTPase	Unknown function	-2.05	2.41E-02
VS_1399	-	Inner membrane protein	Unknown function	-2.05	2.96E-03
VS_2772	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.08	1.11E-02
VS_1295	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.1	5.57E-03
VS_1486	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.1	2.45E-02
VS_II0310	-	Outer membrane protein	Unknown function	-2.12	9.82E-03
VS_II0281	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.13	2.95E-02
VS_0582	ppx	exopolyphosphatase	Unknown function	-2.16	2.66E-02
VS_1868	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.17	2.98E-02
VS_2314	-	Predicted membrane protein	Unknown function	-2.17	1.63E-02
VS_II1206	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.17	2.53E-02
VS_1482	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.18	1.41E-02
VS_1189	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.2	9.91E-03
VS_0909	lysR	transcriptional regulator, LysR family	Unknown function	-2.22	4.65E-03
VS_0632	-	Predicted membrane protein	Unknown function	-2.27	1.04E-02
VS_2303	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.27	2.27E-02
VS_II0484	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.27	3.62E-02
VS_II0664	-	hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-2.27	4.69E-02
VS_2297	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.28	1.53E-02
VS_2791	-	Uncharacterized membrane-associated protein	Unknown function	-2.28	1.36E-02
VS_II0616	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.28	1.34E-02
VS_II1077	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.29	2.55E-02
VS_1870	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.3	1.92E-02
VS_0723	phoH	Phosphate starvation inducible protein PhoH	Unknown function	-2.31	2.28E-03
VS_1779	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.31	4.02E-03
VS_II1383	-	Transcriptional regulator	Unknown function	-2.31	1.67E-02
VS_2310	-	Predicted redox protein	Unknown function	-2.33	1.31E-02
VS_2679	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.33	8.41E-03
VS_II0663	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.34	4.09E-02
VS_II0928	-	Putative metal-dependent hydrolases	Unknown function	-2.34	4.81E-02
VS_2221	-	hypothetical hydrolase	Unknown function	-2.35	4.62E-03
VS_0385	-	Putative glycosyl transferase	Unknown function	-2.4	6.26E-03
VS_2074	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.4	3.79E-03
VS_0891	-	Putative acetyl transferase	Unknown function	-2.41	3.88E-02
VS_II0250	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.41	2.02E-02
VS_II0313	-	putative transport protein	Unknown function	-2.41	3.58E-03
VS_0917	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.43	4.55E-03
VS_1983	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.44	4.57E-02
VS_2276	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.46	1.36E-02
VS_1762	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.49	1.55E-02
VS_3141	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.53	5.99E-04
VS_II1073	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.55	1.48E-02
VS_1473	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.56	7.82E-03
VS_2723	-	HD-GYP domain protein	Unknown function	-2.56	8.33E-03
VS_II1480	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.56	2.33E-03
VS_2081	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.6	3.80E-04
VS_2852	-	Putative alcohol O-acetyl transferase	Unknown function	-2.61	4.03E-03
VS_II0916	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.61	7.98E-03
VIBSP1_CDS782366R	-	Conserved protein of unknown function; DUF3149 family	Unknown function	-2.63	1.94E-04
VS_1191	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.63	2.23E-02
VS_2161	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.64	3.56E-02
VS_2223	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.64	2.21E-03
VS_II1429	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.64	2.68E-02
VS_II0842	-	Putative transcriptional regulator, AraC/XylS family	Unknown function	-2.65	3.13E-02
VS_II0873	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.65	8.50E-03
VS_0999	-	Hypothetical membrane protein	Unknown function	-2.66	9.08E-04
VS_1855	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.66	2.96E-03
VS_II0112	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.66	3.58E-04
VS_2356	-	Hypothetical UPF0325 protein	Unknown function	-2.67	1.14E-03
VS_II1381	-	hypothetical protein; putative exported protein	Unknown function	-2.68	4.02E-02
VS_0640	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.69	2.32E-03
VS_II0129	-	Conserved outer membrane protein of unknown function, putative calcium binding protein	Unknown function	-2.71	6.68E-03
VS_II0527	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-2.71	1.09E-02
VS_II1423	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.72	9.29E-03
VS_2098	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.73	1.48E-02
VS_2273	-	Putative phosphodiesterase yfcE	Unknown function	-2.74	3.06E-03
VS_II0731	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.74	2.84E-03
VS_1245	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.75	4.99E-03
VS_II1384	-	Putative glucosylceramidase	Unknown function	-2.75	4.73E-03
VS_3082	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.76	6.21E-05
VS_2552	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.77	4.37E-03
VS_1815	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.78	1.14E-04
VS_II1164	-	Aldehyde reductase	Pyruvate metabolism	-2.78	2.84E-04
VS_1820	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.8	2.44E-03
VS_2424	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.82	1.53E-03
VS_0296	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.83	8.13E-04
VS_2165	-	hypothetical lipoprotein-related protein	Unknown function	-2.84	1.34E-03

VS_II0125	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.87	1.76E-02
VS_II1017	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.87	4.24E-03
VS_1800	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.88	9.42E-04
VS_1871	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.88	2.90E-03
VS_II0672	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.88	1.69E-03
VS_2686	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.89	2.07E-03
VS_II0794	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.91	4.08E-04
VS_II0526	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-2.92	5.22E-03
VS_II0549	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	-2.92	8.71E-03
VS_1488	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.93	6.93E-04
VS_2279	-	Hypothetical oxidoreductase ybbO	Unknown function	-2.94	2.65E-03
VS_2465	-	putative Mg-dependent DNase	Unknown function	-2.94	1.36E-02
VS_2709	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.95	1.47E-03
VS_II1101	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.96	3.02E-04
VS_II1498	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.98	2.19E-02
VS_II0888	-	Putative transporter, LysE family	Unknown function	-3	1.96E-02
VS_II1092	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3	7.24E-04
VS_II0454	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.02	2.68E-05
VS_1168	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.06	9.96E-04
VS_1286	-	Conserved hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-3.07	8.30E-03
VS_2163	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.08	5.45E-04
VS_II0730	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.08	1.15E-03
VS_II1432	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.08	1.16E-04
VS_II0508	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-3.1	1.66E-02
VS_II0874	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.11	4.99E-03
VS_1431	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.12	4.06E-04
VS_2931	-	transcriptional regulator, LuxR family	Unknown function	-3.12	5.33E-04
VS_II1134	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-3.13	3.87E-04
VS_II0791	-	similar to conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.14	1.70E-02
VS_0550	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.15	1.50E-03
VS_0923	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.15	1.57E-03
VS_II1074	-	Putative membrane protein	Unknown function	-3.16	4.41E-03
VS_II1205	-	putative transport protein	Unknown function	-3.16	4.23E-04
VS_II1065	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.19	3.09E-04
VS_II0615	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.22	4.41E-02
VS_3028	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.27	5.98E-04
VS_1169	-	hypothetical protein; putative exported protein	Unknown function	-3.31	1.74E-04
VS_II1249	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.31	3.43E-04
VS_1581	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.33	9.23E-04
VS_II1335	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.36	3.21E-04
VS_II0462	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.43	4.20E-04
VS_II0878	-	Putative exported tetratricopeptide repeat protein	Unknown function	-3.46	4.47E-04
VS_II0701	-	putative permease	Unknown function	-3.48	1.09E-04
VS_1495	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.5	3.20E-04
VS_1872	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.5	1.25E-04
VS_II1373	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.5	1.57E-03
VS_2274	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.52	1.94E-04
VS_II1527	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.52	1.11E-05
VS_1042	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.53	1.04E-02
VS_II1172	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.53	4.40E-05
VS_1035	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.54	8.85E-05
VS_1170	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.54	5.90E-05
VS_II1075	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.54	7.84E-04
VS_II0315	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.56	8.16E-03
VS_II0374	-	Putative transcriptional regulator; lambda repressor family	Unknown function	-3.56	6.40E-03
VS_1078	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	-3.59	1.47E-04
VS_II0586	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.66	2.39E-04
VS_2222	-	Outer membrane lipoprotein Slp family	Unknown function	-3.67	2.12E-05
VS_II0872	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.68	2.71E-04
VS_II1076	-	Putative secretion protein	Unknown function	-3.7	1.81E-04
VS_0240	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.71	6.84E-05
VS_2632	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.75	3.59E-05
VS_1388	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.76	8.44E-05
VS_II0299	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.78	7.44E-04
VS_II0458	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.79	1.02E-05
VS_II0859	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.79	1.07E-04
VS_0624	-	Putative metal-dependent hydrolase	Unknown function	-3.87	1.49E-05
VS_1984	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.87	8.72E-05
VS_II1530	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.89	4.17E-05
VS_2131	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.91	3.95E-03
VS_II1422	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.91	3.10E-04
VS_II0273	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.94	1.62E-04
VS_0110	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.99	6.92E-04
VS_II1392	-	Transcriptional regulator	Unknown function	-3.99	2.11E-05
VS_II0936	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.02	1.86E-05
VS_2851	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.06	1.33E-05
VS_II0199	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	-4.06	3.51E-05
VS_II0893	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.06	9.90E-05
VS_II1208	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.06	1.90E-05

VS_1386	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.12	1.94E-05
VS_1526	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.13	1.11E-05
VS_1919	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.13	1.33E-05
VS_II1251	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.17	7.95E-06
VS_II1147	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.19	6.87E-05
VS_2278	-	Putative sugar nucleotide epimerase	Unknown function	-4.23	1.08E-05
VS_II0876	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.24	1.08E-03
VS_II0102	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.28	2.03E-05
VS_II0459	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.28	3.78E-06
VS_0491	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.3	1.39E-05
VS_0719	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.33	3.62E-06
VS_2110	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.33	1.10E-05
VS_0686	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.4	9.10E-03
VS_II1193	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.4	1.39E-05
VS_II0444	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.45	6.01E-06
VS_II1140	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-4.46	2.05E-06
VS_1301	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.47	1.67E-06
VS_II0259	-	Transcriptional regulators, LysR family protein	Unknown function	-4.49	2.80E-06
VS_II0892	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.49	1.22E-05
VS_II1210	-	Putative prolyl 4-hydroxylase alpha subunit homologue	Unknown function	-4.51	2.04E-03
VS_1801	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.54	1.66E-06
VS_II0851	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.56	6.16E-06
VS_1514	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.58	4.49E-06
VS_II0852	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.59	6.46E-06
VS_II0031	-	Predicted membrane-associated, metal-dependent hydrolase	Unknown function	-4.63	1.35E-06
VS_II1079	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.63	5.49E-05
VS_II0349	-	putative orphan protein	Unknown function	-4.66	3.36E-02
VS_1515	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.68	5.25E-06
VS_II0854	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.72	6.76E-07
VS_2209	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-4.74	1.16E-05
VS_2908	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.74	1.84E-06
VS_0965	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.77	6.15E-06
VS_2139	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.85	2.09E-06
VS_2431	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.88	2.87E-06
VS_2448	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.88	8.40E-07
VS_II0370	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.91	1.02E-05
VS_II0582	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.96	5.61E-06
VS_2194	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.97	6.59E-07
VS_II0530	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.97	1.17E-06
VS_II0890	-	Putative transduction protein	Unknown function	-4.97	5.26E-07
VS_1513	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.07	6.91E-08
VS_II0889	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.11	7.27E-07
VS_1143	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.16	7.99E-07
VS_0349	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.2	4.67E-08
VS_1139	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.24	3.59E-07
VS_1134	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.28	4.04E-07
VS_II1162	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.28	2.70E-07
VS_II0879	-	Putative arylsulfatase	Unknown function	-5.35	1.62E-06
VS_II0369	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.37	8.63E-07
VS_1916	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.41	1.36E-07
VS_2433	-	hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-5.43	2.42E-07
VS_II0347	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.43	2.81E-07
VS_0481	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.49	3.15E-07
VS_0662	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.5	1.66E-07
VS_II0866	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.51	1.46E-07
VS_1844	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	-5.53	1.48E-07
VS_0791	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.54	7.51E-09
VS_1520	-	Outer membrane protein	Unknown function	-5.63	1.86E-07
VS_1896	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.64	2.91E-08
VS_1843	-	Outer membrane protein	Unknown function	-5.69	1.42E-07
VS_1973	-	hypothetical membrane protein	Unknown function	-5.69	1.33E-08
VS_II0350	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.7	2.08E-08
VS_1046	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.75	1.73E-07
VS_II0865	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.77	2.65E-08
VS_0575	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.78	4.92E-08
VS_2434	-	TPR-repeat-containing protein	Unknown function	-5.78	1.22E-08
VS_1045	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.82	1.37E-07
VS_2132	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.82	1.59E-07
VS_II0416	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.85	8.43E-08
VS_II0857	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.85	2.22E-07
VS_2724	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.88	1.80E-07
VS_0298	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.91	4.50E-08
VS_0521	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.92	2.28E-08
VS_1166	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.92	1.80E-08
VS_0502	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.98	1.54E-08
VS_II0636	-	putative orphan protein	Unknown function	-6.1	5.04E-04
VS_II0869	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-6.1	2.85E-08
VS_0959	-	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	Unknown function	-6.19	2.62E-09

VS_2108	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.26	2.37E-07
VS_1672	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.32	3.32E-11
VS_2439	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.51	2.22E-10
VS_II1410	-	Hypothetical protein	Unknown function	-6.68	3.74E-09
VS_II0667	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-6.73	2.36E-09
VS_1790	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-6.88	5.36E-13
VS_II1094	-	Hypothetical protein	Unknown function	-7.11	3.39E-07
VS_1418	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.21	1.82E-10
VS_2440	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.26	1.93E-11
VS_2441	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.37	5.82E-11
VS_2442	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.62	5.12E-12

Table S2. Strains, plasmids and oligonucleotides

Description/sequence	Reference
Bacterial strain	
LGP32	<i>V. tasmaniensis</i> (Splendidus clade) (Gay et al., 2004)
LMG20 012 ^T	<i>V. tasmaniensis</i> (Thompson et al., 2003)
$\Delta copA$	LGP32 $\Delta copA$ (VS_0768, cation transport ATPase) This study
$\Delta cusAB$	LGP32 $\Delta cusAB$ (VS_II0515/0516, cation efflux system protein) This study
Δsod	LGP32 Δsod (VS_2918, superoxydedismutase) This study
$\Delta ahpC$	LGP32 $\Delta ahpC$ (VS_2126, alkyl hydroperoxidoreductasesubunit C) This study
$\pi 3813$	<i>E. coli</i> , <i>lacIQ</i> , <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA462</i> (Le Roux et al.2007)
$\beta 3914$	<i>E. coli</i> (F ⁻) RP4-2-Tc::Mu Δ dapA::(erm-pir) [<i>Km^REm^R</i>] <i>zei298:Tn10</i> [Tc ^R] Δ thyA::(erm-pir) [Erm ^r] (Le Roux et al.2007)
$\beta 2163$	<i>E. coli</i> (F ⁻) RP4-2-Tc::MudapA::(erm-pir) [<i>Km^REm^R</i>] (Demarre et al., 2005)
Plasmids	
pSW7848	<i>oriV_{R6KV}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>araC-P_{BAD} ccdB</i> (Le Roux et al.2007)
pMRB-HC <i>gfp</i>	<i>oriV_{R6KV}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotrophdap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdBresistant</i> , [<i>Cm^R</i>], <i>high copy</i> (Le Roux et al.2011)
pMRB-LC <i>gfp</i>	<i>oriV_{R6KV}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [<i>Cm^R</i>], <i>low copy</i> (Le Roux et al.2011)
Oligonucleotides	
Mutagenesis	
$\Delta VS-0768$	
CopA-1	5'-GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCATGTCAAATGCTCTAAAACGACAAATTC-3' This study
CopA-2	5'-GTCGATACCGACGTTTTTACAGCTCGGATTCTGAAAGCAG-3' This study
CopA-3	5'-CTGCTTTCAGAAATCCGAGCTGTA AAAACGTCGGTATCGAC-3' This study
CopA-4	5'-CCCCGGGGCTGCAGGAATTCCTACGAATCATGGTTAACCTCATG-3' This study
$\Delta VS-II0515/0516$	
CusAB-1	5'-GCCCGAATCCCGTCAAGCCAATAACATGG-3' This study
CusAB-2	5'-GTAAGGGCTAATAATCAATACGTGTCTATCCCTTATTGATTGG-3' This study
CusAB-3	5'-CCAATCAATAAGGGAATAGACACGTATTGATTATTAGCCCTTAC-3' This study
CusAB-4	5'-TGCTCTAACTGCTCTGAAGC-3' This study
ΔVS_2918	
SodA-1	5'-GCCCGAATTCCTTGAAGCTGAACAGATGGG-3' This study
SodA-2	5'-GAGTACAGTTCACCACCTTGGCGGTAATCCTCCTTAATTAGAGG-3' This study
SodA-3	5'-CCTCTAATTAAGGAGGATTTACCGCAATGGTGGTGAAGTACTC-3' This study
SodA-4	5'-GCCCGAATTCGCGTTAGATAGGTTGAGGC-3' This study
ΔVS_2126	
AhpC-1	3'-GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGAGTATATGGAGATACGACG-3' This study
AhpC-2	5'-GAGTACAGTTCACCACCTTGGCGGTAATCCTCCTTAATTAGAGG-3' This study
AhpC-3	5'-CCTCTAATTAAGGAGGATTTACCGCAATGGTGGTGAAGTACTC-3' This study
AhpC-4	5'-CCCCGGGGCTGCAGGAATTCGTGCTTGCCTTATCATCTCG-3' This study
pSW-R	5'-GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC-3' This study
pSW-F	5'-GAATTCCTGCAGCCCGGGG-3' This study
Complementation	
Gibson method	
pMRB-F	5'-CTCGAGCTGCAGACGCTCG-3' This study
pMRB-R	5'-GGGCCCTTCCTTTGTTATCCGCTCAC-3' This study
Sod-F	5'-CGCGTCTGCAGCTCGAGTTACGCTTTATTCGCGAGTG This study
Sod-R	5'-GTGAGCGGATAACAAAGGAAGGGCCCATGTCACACTTTTTCTGC-3' This study

CusAB-F	5'-CGCGTCTGCAGCTCGAGTTATTTGTTGTCTCGTTTTGGC-3'	This study
CusAB-R	5'-GTGAGCGGATAACAAAGGAAGGGCCCATGAGTTCAGTAAAAGTAGCAAC-3'	This study
Restriction method		
CopA-F	5'-GGGCCCATGTCAAATGCTCTAAAACGACAAATTC-3'	This study
CopA-R	5'-CTCGAGTTACGAATCATGGTTAACCTCATG-3'	This study
PCR/Sequencing		
VS_0768F	5'-GAATAGCCAAGAGTAAAGTGC-3'	This study
VS_0768R	5'-CGTAACCGTCGATCTCTGC-3'	This study
VS_II0515F	5'-CGGCTAAATCTCAAAAAGACAC-3'	This study
VS_II0516R	5'-AATGGTCCATCTTTCCATCC-3'	This study
VS_2918F	5'-AGTGCGATTCTGCAACACAGC-3'	This study
VS_2918R	5'-AGCAAAGATGCGGAAGTCAC-3'	This study
VS_2126F1	5'-AGATACGCACGCCAATAGAGT-3'	This study
VS_2126R1	5'-CATCCAGGCTAAGGACTAACT-3'	This study

Table S3. Oligonucleotides for qPCR

Primers	Sequence	Description
0886-VSII1062-F1	5'-TCTCATTGATCCGGGTTTG-3'	PrtV/InhA (M6 metalloprotease)
0887-VSII1062-R1	5'-ATTGCATTCTGGTCGGCAGTC-3'	
0890-VS0768-F1	5'-AGACATTGGCGCGGACTTTA-3'	CopA (Cation transport ATPase)
0891-VS0768-R1	5'-ACGCGTCTGAAATGCCAAAT-3'	
0896-Vsr242-F1	5'-ACGAACCGCAAGGAGAAGTG-3'	sRNA (IGR VS_II0566-VS_II0567)
0897-Vsr242-R1	5'-TCAGTACGCCTCACCCCTCGT-3'	
0900-VS0852-F1	5'-ATTGCCGCCTTTATCGGTTT-3'	CcmC (Cytochrome c-type biogenesis protein)
0901-VS0852-R1	5'-CAAGCACCCACATTGGTTT-3'	
0902-VS2913-F1	5'-GCCGTCCTGTGGTGACCTT-3'	6PKF (6-phosphofructokinase)
0903-VS2913-R1	5'-TGCTTCTTGCCTTTCGCAAT-3'	
0912-VS0220-F1	5'-TGGGGTGCCTTACATGAG-3'	O-antigenpolymeraseWzy
0913-VS0220-R1	5'-AAGGCTCTCAAACCTGTCAATGTT-3'	
0914-VS2591-F1	5'-ATTCGGCTTTCGTGACCTT-3'	MalC (Maltose permease)
0915-VS2591-R1	5'-TTTTGCGGTGAAAGGGTCTG-3'	
0916-VS2260-F1	5'-TTCCTGAGTGGCTGGCTTTC-3'	PTS system N-acetyl glucosamine
0917-VS2260-R1	5'-AACACCAGGCCAAACCACAC-3'	
0918-VSII1414-F1	5'-CTTCTACGGCGGTTGGAACA-3'	Chitinase
0919-VSII1414-R1	5'-GCAATTGGATGCCGTTGTCT-3'	
0920-VS2446-F1	5'-TGGGTCGGTCGTATTCTTTTG-3'	CpaA (pilinprepeptidase)
0921-VS2446-R1	5'-TTGTCCCCACCCAAATACA-3'	
0922-VS1460-F1	5'-CGTCTTTCCGCTCTGAAACT-3'	CytC (cytochrome C oxydase)
0923-VS1460-R1	5'-GAACACGGTGCCACTCATCA-3'	
0924-VS0696-F1	5'-CGGTCTGGTTACGGTTTCG-3'	NADH quinone reductase
0925-VS0696-R1	5'-ACCAACCACCGTTGCTCACT-3'	
0926-VS2382-F1	5'-CCGCAAGCTACACATCACGA-3'	MetN (methionine transport)
0927-VS2382-R1	5'-ATGTCGCCAACTGTGCCTTT-3'	
0928-VSII0148-F1	5'-GCGCTTCACCAAATCACCAT-3'	Catalase
0929-VSII0148-R1	5'-CGATCACTTGTGCCGCTTCT-3'	
0930-VS2126-F1	5'-TCTCACAAGCATGGCACGA-3'	AhpC (alkyl hyperoxidoreductase subunit C)
0931-VS2126-R1	5'-CCGATGCCTTCAGCTGTGAT-3'	
0932-VS2918-F1	5'-TTCAGGCTTTGCTGGTTGG-3'	SodA (superoxidedismutase)
0933-VS2918-R1	5'-GCGACGGTTTTGGTAGCTGA-3'	
0934-VS3101-F1	5'-TGAAGTGCACCTCCCACT-3'	CueO (copper oxydase)
0935-VS3101-R1	5'-GGGCGTTTCCATTTCTTT-3'	
0938-VS1124-F1	5'-TTGTCGGTTGTGTGCTTGC-3'	ViuD (ABC transporter; Iron-siderophore uptake, Vibriobactin)
0939-VS1124-R1	5'-GCCGGGATCAAGACATCGTA-3'	
0940-VSII1133-F1	5'-CGCCTTGATGCAACGCTATT-3'	PvsE (Vibrioferri biosynthesis protein)
0941-VSII1133-R1	5'-TCGCAAACTCCATCCAAGG-3'	
0942-VSII0149-F1	5'-CACCGTGCTTCTCTGGTGGT-3'	Phospholipase
0943-VSII0149-R1	5'-TCTGCGGCTTATTGCGGTAG-3'	
0944-VSII0510-F1	5'-TTTATTGAGCCGCATACC-3'	RTX toxin VCBS repeat transporter
0945-VSII0510-R1	5'-ACGCTTCTCCCACTTT-3'	

0946-VSII0512-F1	5'-TCGGGTTCTTGATGGGTCTG-3'	RTX toxin VCBS repat
0947-VSII0512-R1	5'-ATCACACCCTGCTCCACCAC-3'	
0948-VSII0870-F1	5'-TGTGGTATTTGCACCGCGTA-3'	Alkaline phosphatase
0949-VSII0870-R1	5'-TATGGCGTGA CTGGACGTGA-3'	
0950-VSII0905-F1	5'-ATGGAATCGTGAACGCACAA-3'	Endoribonuclease
0951-VSII0905-R1	5'-CAATTGGAATCTGCGCTGTG-3'	
0952-VSII0853-F1	5'-ACCGTTCGCTTACCTGCTCA-3'	RpoQ (RpoS-like sigma factor)
0953-VSII0853-R1	5'-AAAACCGCTTAACGCAACCA-3'	
0954-VSII0659-F1	5'-GGGATTCAAGGGCCTGTTTT-3'	AOX (arsenite oxydase)
0955-VSII0659-R1	5'-GCAGCCCTTATCGACCAGA-3'	
0956-VSII1055-F1	5'-CTTTATGCAACGGGCACGAC-3'	MGS (methylglyoxalsynthase)
0957-VSII1055-R1	5'-GGTCGTGTGGTACGGCATTTA-3'	
0958-VS0882-F1	5'-TGACTCGCTACAACCCAGCA-3'	minD
0959-VS0882-R1	5'-CCTTGTTGACGCGTTCAGT-3'	
0960-Vsr217-F2	5'-GCGTTGACGCATTGTTCAATTT-3'	sRNA (IGR VS_II0219-VS_II0220)
0961-Vsr217-R2	5'-TTTCCCCACATCCAGCTAA-3'	
1025-VSII0515-F2	5'-GTGATCAGTGCTGCCCATTT-3'	CusB(cation efflux system protein)
1026-VSII0515-R2	5'-GCGCAAGGTTGAGTTTTTG-3'	

Section B : Evolution phénotypique parallèle de la cytotoxicité envers les hémocytes chez les vibrios pathogènes de l'huître *C. gigas*.

Une grande diversité de vibrios du clade Splendidus a été associée au syndrome de mortalité massive des huîtres juvéniles de *C. gigas*. Au sein de ce clade, deux populations de vibrios ont plus particulièrement été décrites et sont positivement associées à l'huître dans l'environnement : les *Vibrio tasmaniensis* et les *Vibrio crassostreae* (Lemire et al. 2014). Si plusieurs mécanismes impliqués dans la virulence du pathogène *V. tasmaniensis* LGP32 ont déjà été décrits comme nous venons de le voir dans la première partie de ce chapitre (Binesse et al. 2008, Duperthuy et al. 2011),(Vanhove et al. 2015, Vanhove et al. 2016); les mécanismes de virulence des *V. crassostreae* restent méconnus. On connaît cependant des éléments génétiques impliqués dans la pathogénicité de ces vibrios. En particulier, un gène codant pour une protéine nommée R5-7 dont la structure et la fonction restent inconnues ainsi qu'un plasmide portant potentiellement des facteurs de virulence mais dont le rôle reste à caractériser (Lemire et al. 2014, Bruto et al. 2017).

Dans cette partie de mon travail de thèse, notre objectif était (i) de déterminer si les deux populations pathogènes, *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae*, partageaient des mécanismes communs de virulence ou bien des mécanismes très différents et (ii) si les mécanismes de virulence de ces pathogènes sont caractéristiques d'une population ou spécifiques d'une souche.

Pour ce faire, nous avons comparé *in vitro* les mécanismes de virulence et *in vivo* les processus de pathogénèse de souches représentatives de ces populations : les souches virulentes *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 et comme contrôles leur plus proche voisin phylogénétique non virulents *V. tasmaniensis* LMG20 012T et *V. sp.* J2-8, puis dans un deuxième temps, nous avons élargi notre étude à plusieurs souches de chaque population. Pour ce travail, nous avons combiné plusieurs approches complémentaires de biologie cellulaire, d'histologie et de transcriptomique.

Les résultats obtenus indiquent que **la cytotoxicité envers les cellules immunitaires de l'huître est un élément majeur de la virulence des vibrios du clade Splendidus et que ce trait phénotypique est conféré par des mécanismes spécifiques aux deux populations pathogènes étudiées.** Nos données suggèrent ainsi que **les vibrios des deux populations pathogènes du même clade ont subi une évolution phénotypique parallèle se traduisant par leur capacité de lyser les cellules immunitaires de leur hôte.**

Synthèse des résultats

Dans le but de comparer les mécanismes de virulence entre les populations pathogènes de *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae*, nous avons dans un premier temps mené une étude comparative entre deux souches représentatives de ces populations. Pour cela, le tropisme tissulaire et les dommages causés par les deux types de vibrios ont été étudiés. En outre, afin de caractériser les processus pathogéniques de chaque vibrio, nous avons recherché quelles étaient les fonctions physiologiques affectées chez l'hôte par une approche de transcriptomique comparative.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la virulence des souches *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 ne dépendait pas fortement du fond génétique de l'hôte. Pour cela, nous avons fait une infection expérimentale sur 4 fonds génétiques d'huître différents (trois familles biparentales et une famille multiparentale), selon un protocole d'injection intramusculaire standardisé. Des souches non-virulentes phylogénétiquement proches ont été utilisées comme contrôles. Dans l'ensemble des fonds génétiques testés, les deux souches virulentes ont induit des mortalités significatives, à l'inverse des souches non virulentes. Nous avons gardé la famille biparentale présentant le plus grand contraste entre souches virulentes et non virulentes pour la suite des travaux. Lors de ces expériences préliminaires, nous avons également constaté que les animaux injectés avec les souches virulentes commençaient à mourir dès 12 heures après l'injection.

Afin de caractériser les dommages induits par les vibrios, nous avons réalisé de nouvelles infections expérimentales à l'aide de souches exprimant constitutivement la GFP. Les analyses histologiques ont été réalisées sur des animaux prélevés 8h après injection (soit avant les premières mortalités) à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Elles ont permis de suivre les vibrios injectés et les éventuels dommages tissulaires. Nous avons ainsi pu observer que les pathogènes LGP32 et J2-9, colonisaient le tissu conjonctif (aussi appelé tissu de Leydig) autour de la glande digestive, du rein, de l'intestin et de la gonade. Le muscle adducteur qui concentre un nombre important de vibrios (site d'injection) est le seul organe présentant des dommages 8 h après l'infection par LGP32 et J2-9. A l'inverse des souches virulentes, les souches non virulentes n'ont pas été retrouvées dans le tissu conjonctif. Au contraire, elles paraissent contrôlées par une réaction d'aggrégation d'hémocytes importante au niveau de la cavité péricardique près du site d'injection. Des travaux supplémentaires permettraient de tester l'hypothèse de pièges extracellulaires d'ADN contrôlant les souches non virulentes. Aucun dégât tissulaire n'a été observé pour les souches non virulentes, y compris au niveau du site d'injection. Ces résultats indiquent que **les vibrios virulents causent des dommages tissulaires et envahissent de manière systémique les tissus conjonctifs de l'huître**. Ils semblent également échapper au contrôle par les hémocytes.

Afin de déterminer les fonctions physiologiques affectées par les différents vibrios nous avons réalisé une approche transcriptomique par RNAseq. Pour cela, chacune des souches de vibrio a été injectée dans 30 huîtres préalablement anesthésiées. Les huîtres ont été prélevées 8h après l'injection (soit au moins 4 h avant les premières mortalités) avant d'être broyées par groupe de 30 pour chaque condition. Cette expérience a été répétée trois fois indépendamment. Afin de séparer la réponse aux vibrios de la réponse à l'anesthésie et à l'injection, le transcriptome des huîtres injectées avec des vibrios a été comparé avec celui d'huîtres contrôles anesthésiées et injectées avec de l'eau de mer. Les résultats du RNAseq montrent que 331 gènes sont significativement modulés en réponse aux vibrios dont 129 répondent de la même manière quelque soit la souche indépendamment de sa virulence. Les gènes impliqués dans l'immunité représentent 25.6% ce qui en fait la catégorie fonctionnelle la plus abondante. Parmi ces gènes, la voie Nf-κB est particulièrement surexprimée (TLR, MyD88, NF-κB) ainsi que des cytokines telles que l'IL17, le TNF et les récepteurs correspondants. On retrouve également différents effecteurs de l'immunité comme la Dual Oxidase 2 et des inhibiteurs de l'apoptose. Les peptides antimicrobiens sont surexprimés quelque soit les vibrios injectés. Ainsi, il apparaît clairement que **tous les vibrios activent les voies de reconnaissance du système immunitaire de l'huître**. En plus de ces résultats, l'analyse du transcriptome a également mis en évidence qu'il existe **des réponses spécifiques communes aux souches virulentes mais aussi spécifiques à chaque pathogène**. En effet, 57 gènes impliqués dans l'immunité, le métabolisme, la prolifération cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire sont modulés de la même manière en réponse à LGP32 et J2-9 mais pas en réponse aux non virulents. Parmi les gènes sous exprimés, on trouve la NADPH oxidase 5 et une protéine avec un domaine de lectine de type C. Dans la réponse spécifique à J2-9, 27 gènes sont modulés dont la majorité (33,3 %) font partie de la catégorie immunité et parmi eux les gènes codant pour des protéines contenant des domaines C1q (C1qDC) sont sous exprimés. A l'inverse, la réponse spécifique à LGP32 se caractérise par une réponse au stress et une régulation de l'homéostasie des métaux, et tout particulièrement celle du zinc (Méthalthionéine et transporteur du zinc Znt et ZIP). Bien qu'il y ait une réponse commune aux vibrios, **la virulence semble être une fonction majeure qui discrimine la réponse au vibrio au sein du clade Splendidus**. Ces résultats suggèrent aussi qu'il y a un certain degré de diversité dans les mécanismes de virulence de ces vibrios pathogènes.

Afin de compléter cette analyse globale, nous avons voulu caractériser les mécanismes cellulaires d'interaction avec les hémocytes *in vivo*. Pour ce faire nous avons injecté des vibrios exprimant la GFP dans des huîtres juvéniles puis l'hémolymphe a été prélevée et fixée aux temps 2h, 4h et 8h. Après dépôt sur lames par cytopspin et coloration, les échantillons ont été observés au microscope confocal. Les résultats montrent que J2-9 est majoritairement extracellulaire 2h après

l'injection, puis aux temps 4 et 8 heures, J2-9 est retrouvé à la fois extracellulaire et à l'intérieur des hémocytes. Dans le cas du contrôle J2-8, dès 2 heures le vibrio est retrouvé à l'intérieur des hémocytes et est absent du milieu extracellulaire. A 4 et 8 heures, J2-8 est très peu présent dans l'hémolymphe, il semble être dégradé par les hémocytes. Des analyses complémentaires en microscopie électronique à transmission montrent que J2-9 induit des dommages importants aux hémocytes. Les vibrios sont internalisés dans de larges vacuoles dont l'intégrité de la membrane est parfois compromise. Plusieurs vibrios sont en division laissant supposer une multiplication intracellulaire. A l'inverse, la souche J2-8 présente des altérations de sa morphologie au sein des phagosomes dès 2 heures. Comme observé sur les coupes histologiques, J2-8 est phagocyté par des hémocytes formant des agrégats. Ces résultats révèlent que comme la souche *V. tasmaniensis* LGP32, ***V. crassostreae* J2-9 induit lui aussi des dommages importants au hémocytes.**

L'activité cytotoxique de J2-9 a donc été quantifiée à l'aide du Sytox Green *in vitro* comme réalisé précédemment pour LGP32 dans le chapitre I. Les résultats ont montré que J2-9 lyse les hémocytes massivement et plus rapidement que LGP32 *in vitro*. Toutefois, la cytotoxicité de J2-9 atteint un plateau à 10h. Cependant, contrairement à ce qui avait été observé pour LGP32, la cytotoxicité de J2-9 ne dépend pas de la phagocytose comme le montre l'absence d'effet de la cytochalasine D sur ce trait phénotypique. Afin de mieux caractériser le mode d'action de J2-9 sur les hémocytes, la même expérimentation a été réalisée en empêchant le contact entre les hémocytes et les vibrios à l'aide de transwell, il en résulte une diminution significative du taux de cytotoxicité de J2-9 lorsqu'il est séparé des hémocytes, passant de 37% avec contact à 10,9% sans contact. On peut en conclure que l'activité cytotoxique de J2-9 dépend très largement de son contact avec les hémocytes. De plus, le surnageant de culture sans les bactéries n'induit aucun dommage aux hémocytes suggérant ainsi que le mécanisme de cytotoxicité nécessite le contact avec les hémocytes pour être actif. ***V. crassostreae* J2-9 possède donc une activité cytotoxique vis à vis des hémocytes qui est indépendante de la phagocytose mais dépend du contact avec ceux-ci.**

Dans un deuxième volet de cette étude, nous avons voulu savoir si les mécanismes de cytotoxicité distincts de LGP32 et J2-9 sont propres à la souche ou à la population à laquelle ils appartiennent. Ainsi, l'activité cytotoxique sur les hémocytes de 3 autres *V. crassostreae* et 3 autres *V. tasmaniensis* a été étudiée. Les *V. crassostreae* utilisées sont des souches dont le génome a été séquencé et leur assignation taxonomique a été réalisée par Bruto et al. (2017). Pour les *V. tasmaniensis*, nous avons utilisé trois souches isolées par Lemire et al. (2014) qui ont été ici caractérisées par MLST sur 4 marqueurs, confirmant leur appartenance aux *V. tasmaniensis*. Les résultats de cytotoxicité obtenus ont montré que l'ensemble des *V. crassostreae* testées étaient cytotoxiques indépendamment de la phagocytose alors que toutes les souches de *V. tasmaniensis*

testées étaient cytotoxiques de manière dépendante de la phagocytose. **Ces résultats montrent que les populations de *V. crassostreae* et les *V. tasmaniensis* utilisent deux mécanismes distincts pour lyser les hémocytes. Les mécanismes de cytotoxicité sont donc propres aux populations et non à la souche.**

A l'heure actuelle, seul le gène R5-7 dans le génome de J2-9 et le plasmide pGV1512 ont été clairement identifiés comme jouant un rôle dans la pathogénicité des *V. crassostreae in vivo* (Lemire et al. 2014, Bruto et al. 2017) mais les mécanismes de virulence dans lesquels ils sont impliqués n'ont pas été caractérisés. En collaboration avec Yannick Labreuche, Adèle James et Frédérique Le Roux nous avons donc testé l'implication de R5-7 dans l'activité cytotoxique de J2-9. Ces expériences ont montré de manière intéressante que **le gène codant pour la protéine R5-7 est nécessaire à la cytotoxicité de J2-9 *in vitro*.**

En conclusion, cette étude montre que la cytotoxicité envers les cellules immunitaires est un déterminant majeur de la virulence des vibrios qui est porté par des déterminants moléculaires distincts au sein des populations pathogènes. L'histoire évolutive de ce parallélisme reste inconnu.

Publication 2

Parallel phenotypic evolution towards immune cell lysis in vibrios pathogenic for oysters

Tristan P. Rubio, Eve Toulza, Cristian Chaparro, Julien de Lorgeril, Philippe Haffner, Jérémie Vidal-Dupiol, Bruno Petton, Marta Torres Bejar, Guillaume Mitta, Frédérique Le Roux, Guillaume M. Charrière et Delphine Destoumieux-Garzon.

Parallel phenotypic evolution towards immune cell lysis in vibrios pathogenic for oysters.

Tristan Rubio¹, Eve Toulza¹, Cristian Chaparro¹, Julien de Lorgeril¹, Philippe Haffner¹, Jérémie Vidal-Dupiol¹, Bruno Petton², Marta Torres Bejar³, Guillaume Mitta¹, Frédérique Le Roux^{2,4}, Guillaume Charrière^{1*} and Delphine Destoumieux-Garzón^{1*5}

¹CNRS, Ifremer, UPVD, Université de Montpellier. Interactions Hôtes Pathogènes Environnements (UMR5244), Place Eugène Bataillon. Montpellier F-34090, France.

²Ifremer, Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, ZI de la Pointe du Diable, F-29280 Plouzané, France.

³ University of Granada, Department of Microbiology, Spain.

⁴Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, CNRS. Integrative Biology of Marine Models (UMR 8227), Station Biologique de Roscoff, F-29688, Roscoff cedex, France.

* both authors contributed equally to this work

⁵ to whom correspondence should be sent

Abstract

Diverse assemblages of vibrios have been associated to a devastating polymicrobial disease affecting oysters. Puzzled by the recurrence of two distinct virulent populations of the Splendidus clade during mortality outbreaks, we asked whether mechanisms associated to virulence were conserved between them. Independently of oyster genetic background, virulent strains from the *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* populations induced oyster death, unlike non-virulent close phylogenetic neighbors. Remarkably, virulent strains from both populations were highly cytotoxic to oyster immune cells and to a lesser extent to the tissues they colonized, unlike non-virulent strains which were controlled by hemocytes. Consistently, early oyster transcriptional responses to infection clustered according to strain virulence rather than phylogeny. Noteworthy, a series of antibacterial immune genes were significantly repressed in virulent interactions only. Pathogen-specific responses were also observed revealing diversity in host-pathogen interactions within the Splendidus clade. Consistently, *in vitro* cytotoxicity was phagocytosis-dependent for the *V. tasmaniensis* population, whereas it was phagocytosis-independent but contact-dependent for the *V. crassostreae* population. Non-virulent strains were non-cytotoxic. This example of parallel phenotypic evolution in virulent populations of the Splendidus clade identifies cytotoxicity to immune cells as a major determinant of virulence in oysters, which has emerged twice independently through acquisition of population-specific mechanisms.

Introduction

Vibrios are γ -proteobacteria ubiquitous in marine coastal environments; they can adopt a free-living lifestyle or assemble into specific associations with animals, plants, algae and zooplankton (Takemura et al 2014). A number of species including the well-studied *Vibrio cholera* cause human diseases. Others are associated to disease in both wild and farmed marine animals such as corals, shrimp, mollusks and fish (Le Roux et al 2015, Le Roux et al 2016). The consequences of those vibrio-associated animal diseases can be dramatic from an ecological and economical point of view.

Over the past years, a multifactorial disease causing massive mortalities in juvenile *Crassostrea gigas* has dramatically affected the production of oysters in France. The disease is triggered by an elevated seawater temperature and involves multiple etiologic agents (Pernet et al 2012, Petton et al 2013). Particularly, vibrios have been associated to this recurrent phenomenon together with the OsHV-1 μ var virus. The important role of bacteria in the disease has been shown experimentally (Lemire et al 2014, Petton et al 2015). During disease outbreaks, oysters are colonized by a diverse assemblage of vibrios (Lemire et al 2014, Bruto et al 2017). In particular, strains belonging to two populations of the Splendidus clade, namely *V. crassostreae* and *V. tasmaniensis*, have been repeatedly isolated from oysters during disease outbreaks over the past 15 years and their virulence was shown experimentally. Both populations were found to be positively associated to oyster tissues suggesting they could play an important role in the mortality; their virulence was confirmed in oyster experimental infections (Lemire et al 2014, Bruto et al 2017).

One puzzling question is why different virulent populations of the Splendidus clade are found repeatedly in infected oysters and whether they induce oyster mortalities through conserved mechanisms. To answer this question, a major research effort has to be made in characterizing the mechanisms underlying pathogenesis in vibrios pathogenic for oysters. However, extracting robust data from *in vivo* studies has been hampered until now by heterogeneous genetic backgrounds in oysters, variable physiological states and a lack of standardized experimental procedures with continuously changing environments (poor control on food, temperature, salinity, pollutants) (Le Roux et al 2016). Another major limitation has been the lack of standardized experimental procedures enabling studies of host-pathogen interactions *in vitro*. However, major progress has been made in those different aspects recently (Petton et al 2015, Vanhove et al 2015). Moreover, next-generation sequencing gives now access to oyster (Zhang et al 2012a) and vibrio genomes (Lemire et al 2014, Bruto et al 2017) as well as to global analysis of host and pathogen transcriptional responses. These developments open the way to characterize complex diseases where diverse pathogens interact with the host.

To date, only a very limited number of studies have been conducted to characterize pathogenic processes underlying virulence in vibrios pathogenic for oysters. We previously showed that *V. tasmaniensis* LGP32, which was isolated from juvenile mortality events in 2004 (Gay et al 2004a), was an intracellular pathogen of oyster hemocytes that required phagocytosis to exert cytotoxic effects against those immune cells. Its pathogenicity was lost upon deletion of a major adhesin, the OmpU porin, required for entry into oyster immune cells (Duperthuy et al 2011). Survival inside oyster immune cells was shown to be dependent on resistance to ROS and heavy metals, particularly copper (Vanhove et al 2016). However, it is still unknown whether the phagocytosis-dependent cytotoxicity of LGP32 is a strain-specific mechanism of virulence or the hallmark of the entire *V. tasmaniensis* population. Moreover, the other virulent population *V. crassostreae*, discovered more recently (Lemire et al 2014), remains uncharacterized in terms of pathogenic processes. Thus, characterization of the pathogenic processes in the Splendidus clade has become a priority to better understand the association of this diverse clade to the disease of juveniles in the wild.

We compared here (i) the pathogenic processes of two strains representative of both populations using phylogenetically-related strains as negative controls, and (ii) the transcriptional responses of oysters to each vibrio infection. The virulent/non-virulent phenotype of the four *Vibrio* strains was first confirmed in four different oyster genetic backgrounds. In one chosen family of oysters, we then performed a series of *in vivo* experiments in which we characterized the histopathological damages caused by each strain and the transcriptomic responses of oysters facing those diverse virulent or non-virulent infections. We next characterized the cellular mechanisms underlying cytotoxicity to hemocytes both *in vivo* and *in vitro* and determined that those mechanisms were representative of both the *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* populations. Our results show that both virulent populations *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* have undergone parallel phenotypic evolution towards oyster immune cell lysis through population-specific mechanisms. None of those toxigenic processes were found in non-virulent close phylogenetic neighbors, which instead were controlled by oyster immune cells. Our results strongly suggest that cytotoxicity to immune cells is a major phenotype associated to virulence for oysters that has emerged twice independently in the Splendidus clade.

Results

Virulence of *V. crassostreae* J2-9 and *V. tasmaniensis* LGP32 in *C. gigas* oysters

Two virulent strains of the Splendidus clade, namely *V. tasmaniensis* LGP32 and *V. crassostreae* J2-9, were compared for their virulence mechanisms in oyster experimental infections. Two phylogenetically-related strains referred to as LMG20012T and J2-8, respectively, were used as non-

virulent controls. All strains were injected at 10^7 CFU/animal to a fulsib family of *Crassostrea gigas* oysters. In both J2-9- and LGP32-injected oysters, the first mortalities occurred within one day and reached a plateau after two days. No significant difference was observed in the mortality rate induced by J2-9 and LGP32, with 60% and 57.7% mortalities at day 7 in J2-9- and LGP32-infected oysters, respectively (Log rank test; p -value=0.802, Fig. 1). As expected, no mortalities were recorded in oysters injected with LMG20012T or J2-8 (Fig. 1). The virulent phenotype of J2-9 and LGP32 and non-virulent phenotype of LMG20012T and J2-8 were confirmed in three additional oyster genetic backgrounds, *i.e.* two additional fulsib families and one family issued from mass-rearing (Fig. S1), indicating strain virulence was not dependent on host genetics.

To better understand the pathogenesis of the virulent strains, oysters were analyzed for bacterial load, tissue damages and physiological responses 8 hours after injection, *i.e.* before the first mortality occurred. In three independent experiments, vibrios were monitored by qPCR in oyster tissues using strain-specific primers amplifying single copy genes. Similar charges were observed for both virulent and non-virulent vibrios. Indeed, J2-9, J2-8 and LMG20012T were present at one genome copy per 50 copies of oyster genome, whereas LGP32 was present at one genome copy per 25 copies of oyster genome (Fig. S1). This indicated that non-virulent vibrios persist in oyster tissues at charges sufficient to cause oyster physiological collapse in virulent vibrios.

Virulent vibrios cause tissue damage and spread into connective tissue

Histological sections immunostained for vibrio detection were observed 8h after infection at the site of injection in oysters infected with virulent vibrios only. Typically, the adductor muscle tissue was disordered all around the injection site where vibrios spread between muscle fibers (Fig. 2A and B). In addition, a massive colonization of the connective tissue by J2-9 and LGP32 was observed around the kidney, the digestive gland, the gonad and under the basal lamina of gut (Fig. 2A and B). Conversely, the non-virulent controls (i) did not cause any detectable tissue damage beyond the lesion due to the needle injection in muscle and (ii) did not spread into oyster tissues. Indeed, LMG20012T could not be detected in muscle sections while J2-8 was contained by hemocytes in the needle path within the adductor muscle (Fig. 2C and D). Both non-virulent strains localized into massive hemocyte aggregates in the pericardic cavity, which were absent from oysters injected with virulent strains. Neither virulent nor non-virulent strains were observed in gills, gut light and digestive gland tubule. Altogether, our histological data suggest that LGP32 and J2-9 escape from hemocyte control and tend to invade the oyster connective tissue whereas the non-virulent phylogenetically-related strains are contained by hemocytes, which prevent further tissue colonization and associated tissue damages.

All vibrios are recognized by the oyster immune system

In an attempt to identify oyster physiological functions responding to infection by vibrios of the Splendidus clade, we characterized the transcriptomes of oysters having received an injection of virulent strains (LGP32 or J2-9), non-virulent strains (LMG20012T or J2-8) or SSW only (mock infected oysters). To increase robustness, experimental infections were repeated three times independently on pools of 30 full sib individuals. To separate the oyster responses to vibrios from the responses to anesthesia and injection, the transcriptomes of vibrio-injected oysters were compared to those of mock infected oysters. RNA sequencing was performed 8h after infection, before any oyster died. From three independent experimental infections, 331 genes were differentially expressed significantly (FDR<0.05) in response to vibrios (table S3). Among them, 75 genes (23%) were also differentially expressed significantly in response to anesthesia/injection (comparison of mock-infected and naïve oysters, table S4). Thus, part of the transcriptomic response to vibrios may have been hidden by the experimental procedure. RNAseq data were validated by qPCR on 19 genes and 6 conditions (correlation $R^2=0.92$, Linear regression test; p -value<0.001) (Fig S2). Out of the 331 genes differentially expressed in response to vibrios, 129 responded similarly to all vibrios, independently of their virulence status or phylogenetic relatedness (Fig. 3B). A substantial proportion (25.6%) were genes involved in immunity (e.g. non-self recognition, immune signaling pathways, oxidative response), which was the most abundant functional category (Fig 3C, table S3). We observed an overrepresentation of transcripts from a TLR/MydD88/NF κ B signaling pathway (CGI_10005194, CGI_10012722, CGI_10012725, CGI_10016949) and from diverse cytokines including IL17, TNF and their cognate receptors (CGI_10025754, CGI_10021486, CGI_10028807, CGI_10010206, CGI_10012786). In terms of effectors, Dual Oxidase 2 (CGI_10028411) and dual oxidase maturation factor 1 (CGI_10023211) as well as inhibitors of apoptosis (CGI_10000338, CGI_10024671) displayed higher numbers of transcripts (table S3). Separate analysis was performed for expression of antimicrobial peptide genes, which are not annotated in the oyster genome. All AMPs responded similarly to virulent and non-virulent strains (Fig S3). Particularly *Cg*-BigDef1 and 2 were strongly induced in vibrio-infected oysters (One-way ANOVA test; p -value $p<0.001$) but not in mock-infected oysters.

Oyster transcriptomic responses cluster according to virulence of vibrio strains

From our RNAseq data, oyster gene expression clustered according to vibrio virulence status rather than vibrio phylogeny. Indeed, oyster transcriptomic responses to J2-9 and LGP32 fell into a cluster different from responses to J2-8 and LMG20012T (Fig. 3A). 57 genes belonging essentially to 4 functional categories (immunity, metabolism, cell proliferation and differentiation and extracellular remodeling) responded similarly to both virulent strains (Fig. 3B-C). Remarkably, virulent strains

repressed significantly a series of immune genes in oysters. This was illustrated by significant repression of NADPH oxidase 5 (CGI_10004930), C-type lectin domain family 4 (CGI_100000016) and DMBT-1 (CGI_10020472) in virulent infections only. Simultaneously, a cAMP-responsive element modulator (CREM) and a serine-threonine kinase ULK2, with potential role in autophagy (Wang and Kundu 2017) were significantly induced in virulent infections.

Pathogen-specific responses were also observed. In agreement with the previously characterized pathogenesis of LGP32 (Duperthuy et al 2011, Vanhove et al 2016), specific responses to LGP32 were characterized by 48 genes falling into the categories stress response, metal homeostasis, metabolism, extracellular matrix remodeling, cell differentiation, cell adhesion and cytoskeleton dynamics. Stress response included two hsp70 genes (CGI_10010646, CGI_10010647) and a lethal(2)essential for life-like gene (CGI_10010171) specifically up-regulated in this condition (table S3). Metal homeostasis (Fig 3C) included zinc transporters (CGI_10007268, CGI_10020521) and metallothioneins (CGI_10021194, CGI_10021196). On the other hand, specific responses to J2-9 (27 genes) essentially fell into the category immunity (Fig. 3B-C). A remarkable repression was observed on several genes encoding C1q domain-containing (C1qDC) proteins (CGI_10000910, CGI_10009274, CGI_10020815) (table S3), a family of complement-related proteins which has been the subject of massive gene expansion and diversification in bivalves (Gerdol et al 2015). Thus, while virulence appeared as a major function discriminating oyster responses to vibrios of the Splendidus clade, some specificity was also observed in the response to individual pathogens, which suggested a certain degree of diversity in host-pathogen interactions within the Splendidus clade. This prompted us to investigate further the interaction of J2-9 with oyster immune cells, the hemocytes, which remained unexplored.

J2-9 causes oyster hemocyte lysis *in vivo*

Observation of histological section immunostained for vibrio detection revealed that J2-9 interaction with hemocytes differed from LGP32. Indeed, consistent with its previously described pathogenesis (Duperthuy et al 2011, Vanhove et al 2016), LGP32 was massively phagocytosed by hemocytes on histological sections, like the non-virulent strains (Fig.4A). In contrast, J2-9 tended to remain extracellular in the hemolymph (Fig.4A-B). To further explore the *in vivo* interactions between hemocytes and J2-9, oyster hemolymphs were examined by confocal microscopy 2h, 4h and 8h after injection of GFP-expressing vibrios. At early time points (2h), J2-9 cells were essentially extracellular and adhered to the hemocyte surface (Fig. 4B). At 4h and 8h, J2-9 cells could also be observed inside hemocytes (Fig. 4B). However, poorly defined hemocyte structures were observed at that time, suggesting loss of cell integrity. In contrast to J2-9, the non-virulent J2-8 was rapidly phagocytosed at 2h being absent from the extracellular milieu. Vacuoles contained high numbers vibrios at 2h, the

shape of which could not be distinguished anymore at 4h suggesting intracellular degradation (Fig. 4B). At 8h, J2-8 cells were barely found in collected hemolymph samples. No apparent hemocyte lysis was observed at any time point in J2-8 samples. To confirm the cytotoxic phenotype of J2-9, the *in vivo* experiment was repeated with J2-9 and J2-8 black strains and hemolymphs were observed by TEM. A massive lysis of hemocytes was observed upon interaction with J2-9 at 8h (Fig. 5). Multiple vibrios were observed inside hemocyte some of which were dividing suggesting active proliferation. Vibrios were present in large and loose vacuoles with disrupted membranes, the rest of the cytoplasmic organelles being highly disorganized. No hemocyte lysis could be observed in mock infected and J2-8 infected oysters. Consistent with our epifluorescence data, phagocytosed J2-8 with sometimes altered morphology were present in phagosomes at 2h (Fig. 5). At 8h, J2-8 was phagocytosed by hemocytes within large aggregates (Fig. 5) also observed on histological sections (Fig. 2). Altogether, our data show that J2-9 is highly cytotoxic to circulating hemocytes in oyster experimental infections.

***V. crassostreae* and *V. tasmaniensis* populations cause hemocyte lysis through different mechanisms**

To quantify the cytotoxicity of J2-9 to hemocytes, we adapted the *in vitro* fluorescent assay earlier developed to monitor LGP32 cytotoxicity (Vanhove et al 2016). In that assay, J2-9 demonstrated a strong cytotoxicity, inducing a rapid and massive uptake of Sytox green by hemocytes which reached a plateau 10h after contact. Comparatively, it took 15h to reach the same fluorescence intensity with LGP32 (Fig. 6A). To determine whether contact between J2-9 and hemocytes was required for cytotoxicity, a transwell experiment was performed. J2-9 induced 37.3 % hemocyte lysis upon contact with hemocytes whereas it only induced 10.9% lysis in the absence of contact (RM-ANOVA p -value<0.01) (Fig. 6B). Consistently, the supernatant of J2-9 cultures alone was unable to induce hemocyte lysis (Fig. S4). This indicates that J2-9-secreted cytotoxic effectors are unable to induce hemocyte lysis in the absence of cellular interactions. Interestingly, the cytotoxicity of J2-9 was found to rely on a mechanism distinct from LGP32, which requires internalization to express its cytotoxic phenotype (Vanhove et al 2016)(Fig. 6C). Indeed, we found here that inhibition of actin polymerization prevented J2-9 phagocytosis by oyster hemocytes (Fig S4) but did not alter its cytotoxicity as evidenced both by epifluorescence microscopy and Sytox green assay (Fig S5, Fig. 6D). Altogether, our data show that unlike LGP32, J2-9 requires hemocyte contact but does not dependent on phagocytosis to induce hemocyte lysis.

To determine whether those cytotoxic phenotypes were representative of the *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* populations, we applied the same assay to 6 additional vibrio strains pathogenic for oysters previously assigned to *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* (3 per population)(Lemire et al

2015). The non-virulent controls LMG20012T and J2-8 were also included. All virulent strains displayed a significant cytotoxic phenotype against oyster hemocytes as opposed to the non-virulent controls (Fig. 6C-D). All virulent strains of the *V. tasmaniensis* population were fully dependent on phagocytosis to express cytotoxicity. Conversely, all virulent strains of the *V. crassostreae* population could still express cytotoxicity upon inhibition of phagocytosis (RM-ANOVA p-value<0.001) (Fig. 6C-D). Altogether, our data indicate that both populations of the Splendidus clade have major lytic effects on oyster immune cells but exert their cytotoxicity through different mechanisms.

Discussion

Results showed that cytotoxicity to oyster immune cells, the hemocytes, is an important phenotype shared by two virulent populations of the *Vibrio* Splendidus clade. Major cytological damages to hemocytes were observed *in vivo* in oysters experimentally infected with either *V. crassostreae* J2-9 (Fig 5) or *V. tasmaniensis* LGP32 (Vanhove et al. 2016), two virulent strains representative of both populations. Hemocyte cytolysis occurred early before oyster death and could not be detected in oysters infected with non-virulent strains. The cytotoxic phenotype of virulent vibrios was recapitulated *in vitro*: it was shown to be a dominant trait in both virulent populations examined. Indeed, a massive lysis of hemocytes was observed for all virulent strains of the *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* populations but not for non-virulent controls (Fig. 6). Cytotoxicity is a trait rather widespread in natural bacterial populations. Indeed, hemolytic activities were evidenced *in vitro* for a number of bacterial pathogens including vibrios pathogenic for humans (for review see Wang et al 2015). But cytotoxicity does not always correlate with virulence *in vivo*, suggesting cytotoxicity plays other ecological functions and can be sometimes be accidental and dispensable in pathogenic processes. In contrast, in *Vibrio* Splendidus, cytotoxicity to hemocytes appears to have evolved as an important trait of pathogenesis in oysters.

Bacterial colonization associated or not to tissue damages has strong transcriptional effects on both hosts and microorganisms. Importantly, as filter feeders, oysters are constantly colonized by commensal and pathogenic bacteria that inhabit their tissues and body fluids, challenging their immune cells (Schmitt et al 2012, Destoumieux-Garzon et al 2014). How the innate immune system can discriminate pathogens from commensals is an open question still poorly resolved across metazoan species. We used here the transcriptional response of oysters to virulent vibrios as opposed to all vibrios as a mirror of vibrio pathogenic processes and oyster immune homeostasis, respectively. From our RNAseq data, all vibrios we recognized by the oyster immune system, independently of their virulence. Indeed, oysters responded to all vibrios by the induction of an

important immune response (25.6% of the significantly modulated genes) (Fig. 3C) characterized by an overrepresentation of transcripts from the three major signaling pathways, namely the IL17, TLR and TNF pathways, the last two belonging to expanded families of immune genes in oysters (Zhang et al 2015). Consistent with a vibrio infection, TLR13 and TLR4, which recognized 23S RNA and LPS respectively, play an important role in bacterial recognition (Oldenburg et al 2012). In addition, genes involved in DUOX-mediated oxidative response, which contributes to the control of microbiota in a series of animal species (Bae et al 2010), were also induced by all vibrios. In shrimp, DUOX are protective against vibrios (Yang et al 2016). Antimicrobial peptides (particularly big-defensins), which are believed to play a role in mollusk immunity (Rosa et al 2011, Oyanedel et al 2016) were also significantly induced. Therefore, although poorly explored functionally in mollusks, those pattern recognition receptors, signaling pathways and antimicrobial effectors which are similarly expressed in response to pathogenic and non-pathogenic infections, could contribute to immune homeostasis in *C. gigas* by keeping the oyster-associated microbiota under control. Unlike in insects (Lee et al 2013), DUOX appeared not to discriminate pathogens from commensals in oysters.

Importantly, oyster transcriptomic responses to infection clustered according to vibrio virulence rather than vibrio taxonomic assignment. This is consistent with the observation of similar cytological damages in oysters infected with virulent vibrios from two distinct populations (Fig. 3). Remarkably, virulent strains repressed significantly immune genes involved in antibacterial defenses. These include (i) NADPH oxidase, which mediates ROS production, (ii) C-type lectins 4, which were reported to have both aggregation and direct antibacterial properties in the oyster *C. gigas* (Jia et al 2015) and to be involved in the regulation of antimicrobial peptide expression in mussels (Zhao et al 2016), and (iii) DMBT-1, an important player in mucosal immunity involved in bacterial recognition and invasion (Rosenstiel et al 2007). Recently, this mucosal fluid protein was shown to suppress virulence in *P. aeruginosa* (Li et al 2017). Thus, important antibacterial functions are specifically repressed by virulent strains. It is likely that this largely contributes to their colonization success. Because the same functions (i.e. ROS production, C-type lectin-mediated antibacterial immunity and mucosal defenses) are targeted by strains belonging to distinct populations of virulent vibrios, they likely play a major role in oyster defense against virulent vibrios.

One important result from this article is that hemocyte lysis is mediated by distinct mechanisms in *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae*. Previous work from our group had shown that cytotoxicity of *V. tasmaniensis* LGP32 is mediated by a phagocytosis-dependent mechanism (Duperthuy et al 2011, Vanhove et al 2015, Vanhove et al 2016). Conversely, expression of cytotoxicity in *V. crassostreae* J2-9 was independent of phagocytosis, required contact with the hemocytes (Fig 6B) and could not be

recapitulated by the exposure of hemocytes to the vibrio secretory products (Fig S4). This indicates that the toxigenic properties of the *V. crassostreae* J2-9 are either dependent on an injection apparatus such as a T6SS, which is present in J2-9 genome, or require extracellular secretion of cytolysins in close contact to oyster hemocytes. Such distinct mechanisms have been evidenced in two clades of *Pseudomonas aeruginosa* that express cytotoxicity through either a type III secretion system or a cooperation between a pore-forming toxin and type IV pili promoting close contact between bacteria and host cells (Basso et al 2017). The effectors responsible for cytotoxicity in both virulent strains of vibrios remain unknown to date. However, the genomes of LGP32 and J2-9 encode potential series of hemolysins and phospholipases that could play a role in the cytotoxic processes observed on oyster hemocytes and would deserve further functional characterization.

Consistent with a diversity of mechanisms leading to cytotoxicity and virulence, pathogen-specific responses were revealed by RNAseq in oysters infected with LGP32 or J2-9. Remarkable responses to LGP32 included stress response (14.6% of the LGP32-specific oyster transcripts) and metal homeostasis (8.3%) (Fig 3C). This is agreement with the *in vitro* transcriptome of LGP32 inside oyster hemocytes previously published in which metal homeostasis played a major role (Vanhove et al 2016). Thus, from both the pathogen and host responses, toxic divalent metals (copper and zinc) appear as major players in the pathogenic interaction between LGP32 and the oyster. The response to J2-9 was characterized by a strong modulation of the immune response, which was the main functional category significantly modulated (33.3% of the J2-9-specific oyster transcripts). Remarkably, most of those immune genes were repressed (Fig 3C), particularly C1qDC proteins. C1qDC from oysters are involved in pathogen recognition and control, acting as opsonins promoting phagocytosis (Jiang et al 2015) or displaying direct antibacterial activity (He et al 2011). Therefore, the delay in J2-9 phagocytosis observed *in vivo*, could be related to repression of C1qDC expression and could impair oyster defenses during early stages of J2-9 pathogenesis.

Last and importantly, we evidenced that mechanisms of cytotoxicity were population-specific. Indeed, all virulent strains of the *V. tasmaniensis* population required phagocytosis to express cytotoxicity whereas all virulent strains of the *V. crassostreae* population could express cytotoxicity without cell entry (Fig. 6 and Fig S5). This shows that independent population-specific mechanisms underlie cytotoxicity to hemocytes in the Splendidus clade (Fig 6). Our results also show that cytotoxicity traits associated to virulence in oyster have emerged in several instances within the Splendidus clade, which otherwise is mainly composed of populations non-pathogenic for oysters (Bruto et al 2017). Repeated evolution of the same phenotype independently in multiple populations is usually considered to be strong evidence of adaptation. This parallel evolution was shown to occur

more often between bacterial populations evolved in the same spatially-structured and multi-resource environments (Bailey et al 2015). In this study, the parallel phenotypic evolution of two vibrio populations to express cytotoxicity to oyster immune cells through independent mechanisms indicates that cytotoxicity is an important determinant of vibrio virulence that has emerged twice independently in the Splendidus clade. We hypothesize that the heterogeneous environment in which vibrios of the Splendidus clade evolve together with the fitness benefit provided by oysters as a host may have favored genetic variation and further selection of phenotypes able to efficiently replicate in oysters.

Figures

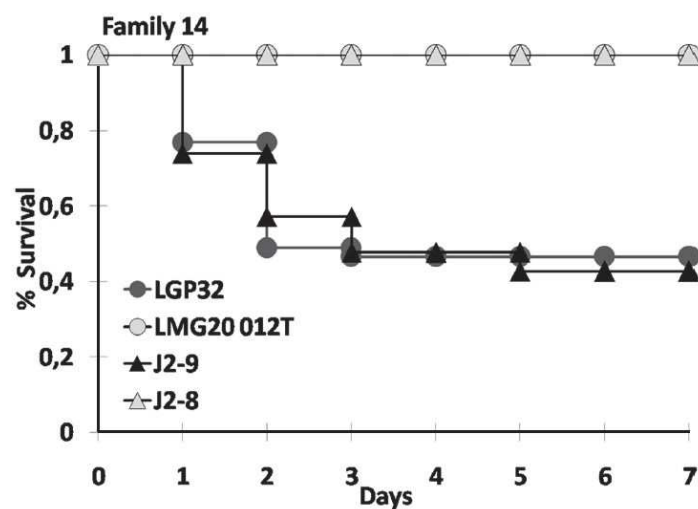


Figure 1 | LGP32 and J2-9 are virulent in oyster experimental infection

Kaplan Meier survival curves were generated from a fulsib family of juvenile oysters (Decipher#14). Oysters were injected with 7.5×10^7 CFU per oyster of the virulent LGP32 and J2-9 on the one hand, and the non-virulent LMG20 012T and J2-8 on the other hand. Mortalities were counted daily in two tanks containing 20 oysters each during 7 days after. Mortalities were observed for oyster injected with J2-9 and LGP32 only. No difference were observed between LGP32 and J2-9 (Log-rank p-value=0.8974).

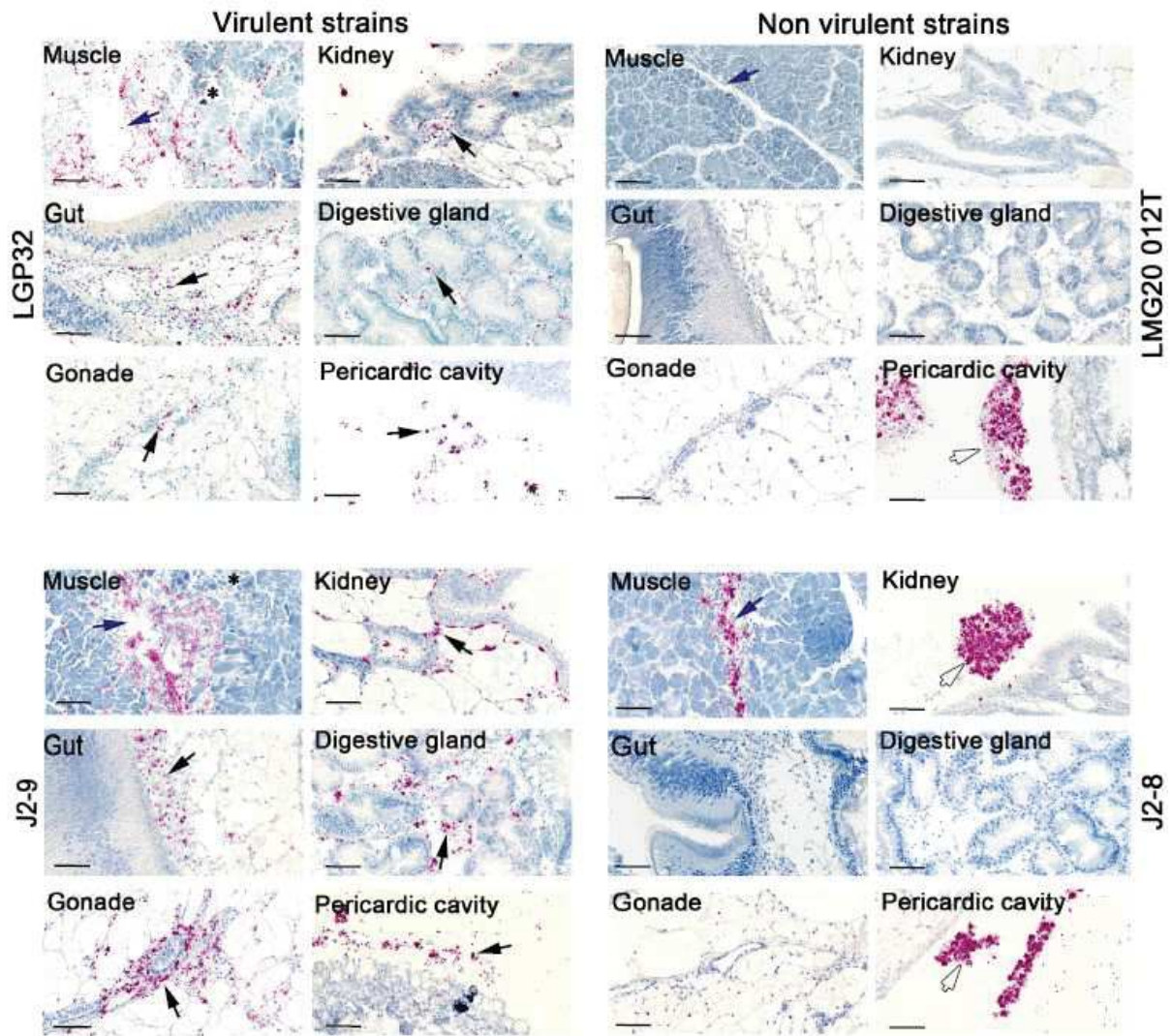


Figure 2 | Virulent strains LGP32 and J2-9 colonize oyster connective tissues and cause damages to the adductor muscle

Juvenile oysters were injected with 7.5×10^7 CFU GFP-expressing LGP32 (A), GFP-expressing J2-9 (B), GFP-expressing LMG20 012T (C) or GFP-expressing J2-8 (D). After 8h, oyster tissues were fixed and stained with hematoxylin. Vibrios were stained with anti-GFP antibodies coupled to alkaline phosphatase (red). Photographs were taken with a nanozoomer scanner. Virulent vibrios J2-9 and LGP32 were found in the pericardic cavity and in the connective tissue surrounding the kidney, the gut, the digestive gland and the gonad (black narrow). Histological damages were observed in the adductor muscle near the injection site, where virulent vibrios were abundant (blue arrow). No histological damages were recorded in oysters infected with non-virulent strains. J2-8 was controlled by hemocyte aggregates in the muscle, the kidney and the pericardic cavity, whereas LMG20 012T was present only in the pericardic cavity, controlled by hemocyte aggregates (white narrow). Scale bare: 20 μ m

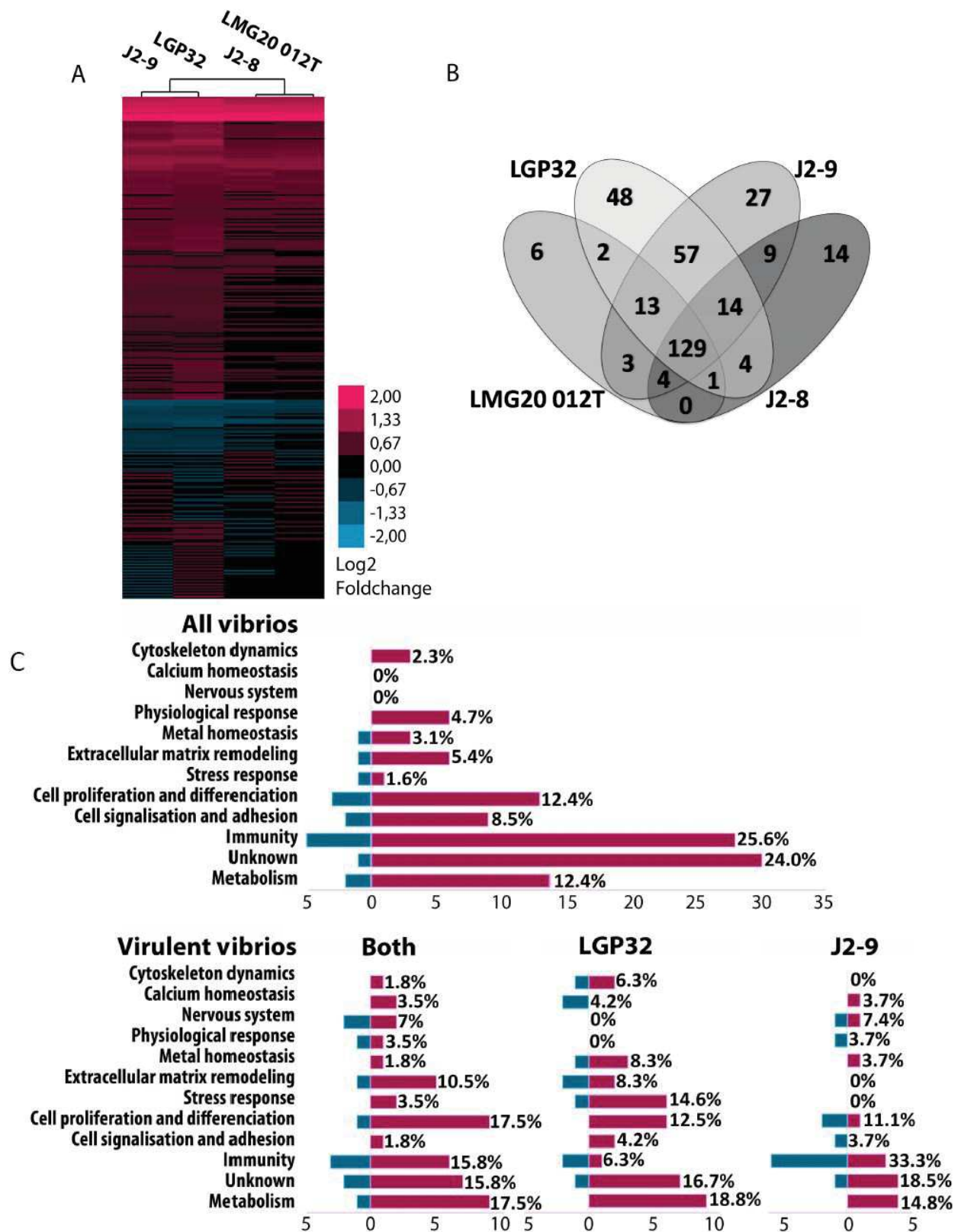


Figure 3 | Vibrio virulence status discriminates oyster transcriptional responses to infection

Transcriptional responses of juvenile oysters (fulsib family Decipher#14) to virulent or non-virulent strains of the Splendidus clade were compared. In three independent experiments, groups of 30 oysters were injected with 7.5×10^7 CFU of LGP32, J2-9, LMG20 012T or sterile sea water (mock-infected oysters). RNAseq was performed on pools of 30 oysters collected 8 h after injection for each experiment and each condition.

Transcriptomes of vibrio-infected oysters were compared to mock-infected oysters. RNAseq results showed a significant modulation of 331 genes (Benjamini-Hochberg procedure, which controls false discovery rate p -value >0.05). (A) Heat map representing the mean of differential expression (Log2 fold change) of genes significantly up- (pink) or down-regulated (blue) in 3 independent experiments (Deseq2: p -value <0.05). Oyster transcriptomes cluster according to vibrio virulence status. (B) Venn diagram showing the number of modulated genes in oysters injected with each vibrio strain. Virulent vibrios LGP32 and J2-9 induce a higher transcriptomic response than non-virulent vibrios. (C) Histograms showing the number of genes whose expression in modulated similarly in response to all vibrios, specifically in response to virulent vibrios (both J2-9 and LGP32), or specifically in responses to strains J2-9 and LGP32. Up-regulated genes are shown in pink and down-regulated genes are shown in blue. Functional categories were determined according to bibliography.

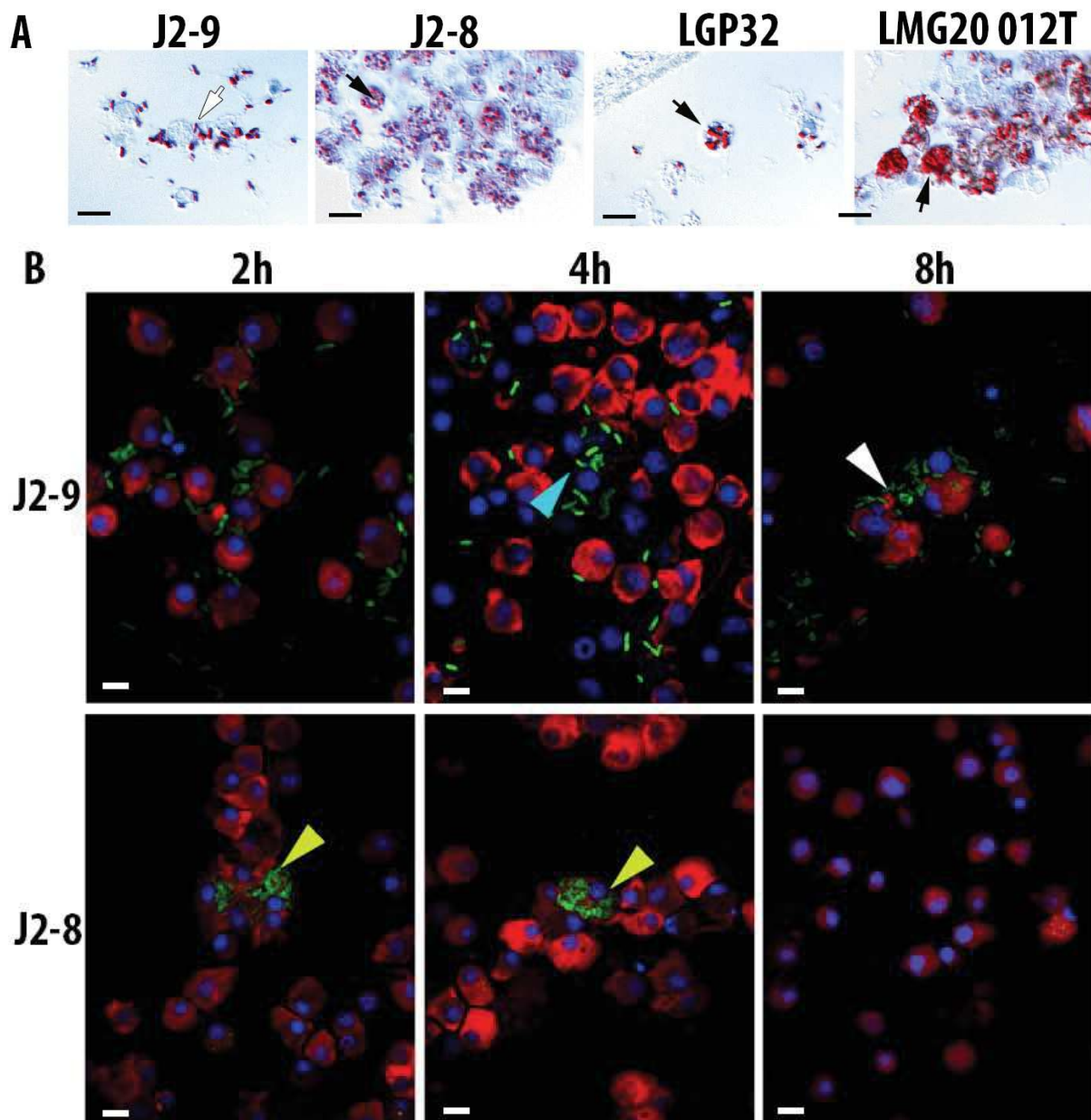


Figure 4 | Persistence of extracellular J2-9 in oyster hemolymph

(A) Juvenile oysters were injected with 7.5×10^7 CFU GFP-expressing LGP32 (A), GFP-expressing J2-9 (B), GFP-expressing LMG20 012T (C) or GFP-expressing J2-8 (D). After 8h, oyster tissues were fixed and stained with hematoxylin. Photographs of hemocytes were taken on histological sections by differential interference contrast (DIC) microscopy. Hemocytes and vibrios appear in blue and purple, respectively. J2-9 stays outside

the hemocytes whereas LGP32 and the non-virulent vibrios are phagocytosed. Hemocyte aggregates are observed with non-virulent vibrios only. Scale bar: 10 μ m (B) Juvenile oysters were injected with 1.5 x 10⁸ CFU GFP-expressing vibrios. For each experimental condition (J2-9 or J2-8 injection), hemolymph was withdrawn from 5 oysters 2 h, 4 h and 8 h after injection. Hemocytes were observed by confocal microscopy on cytospin glass slides after nuclei and actin cytoskeleton were stained with DAPI and phalloidin-TRITC, respectively. J2-9 was observed inside and outside hemocytes while J2-8 was entirely phagocytosed. Unlike J2-8, J2-9 persisted in the hemolymph at 8 h. Scale bar: 5 μ m.

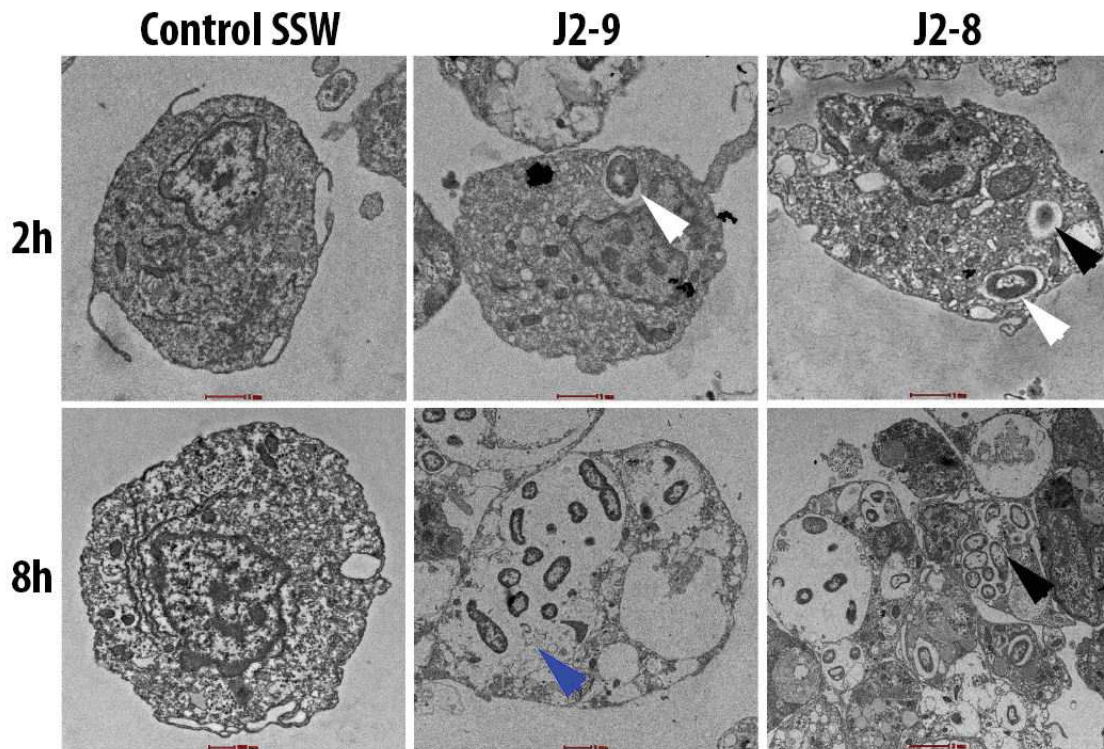


Figure 5 | *V. crassostreae* induces damages to the immune cells *in vivo*

Transmission electron microscopy of hemocytes in interaction with J2-8 or J2-9 *in vivo*. 7 oysters were injected with 1.5 . 10⁸ CFU per oyster of J2-8 or J2-9 or sterile seawater (SSW). TEM was performed for each condition on pools of hemolymph collected from 7 oysters 2h and 8h after injection. Top lane (2 h after injection): most hemocytes are intact. For J2-8-injected samples, bacteria are rarely observed; most hemocytes are devoid of bacteria. Figures of phagocytosis are shown for both strains. White arrows show intact J2-8 and J2-9 cells phagocytosed by hemocytes; a black arrow shows degraded J2-8 inside a phagosome. Bottom lane (8 h): J2-9 cells are observed inside the cytoplasm of highly damaged hemocytes. A blue arrow shows lysis of the phagocytic vacuole membrane in a J2-9-containing vacuole. J2-8 cells are observed inside a hemocyte aggregates (black arrow). Hemocytes from SSW-injected animals are intact.

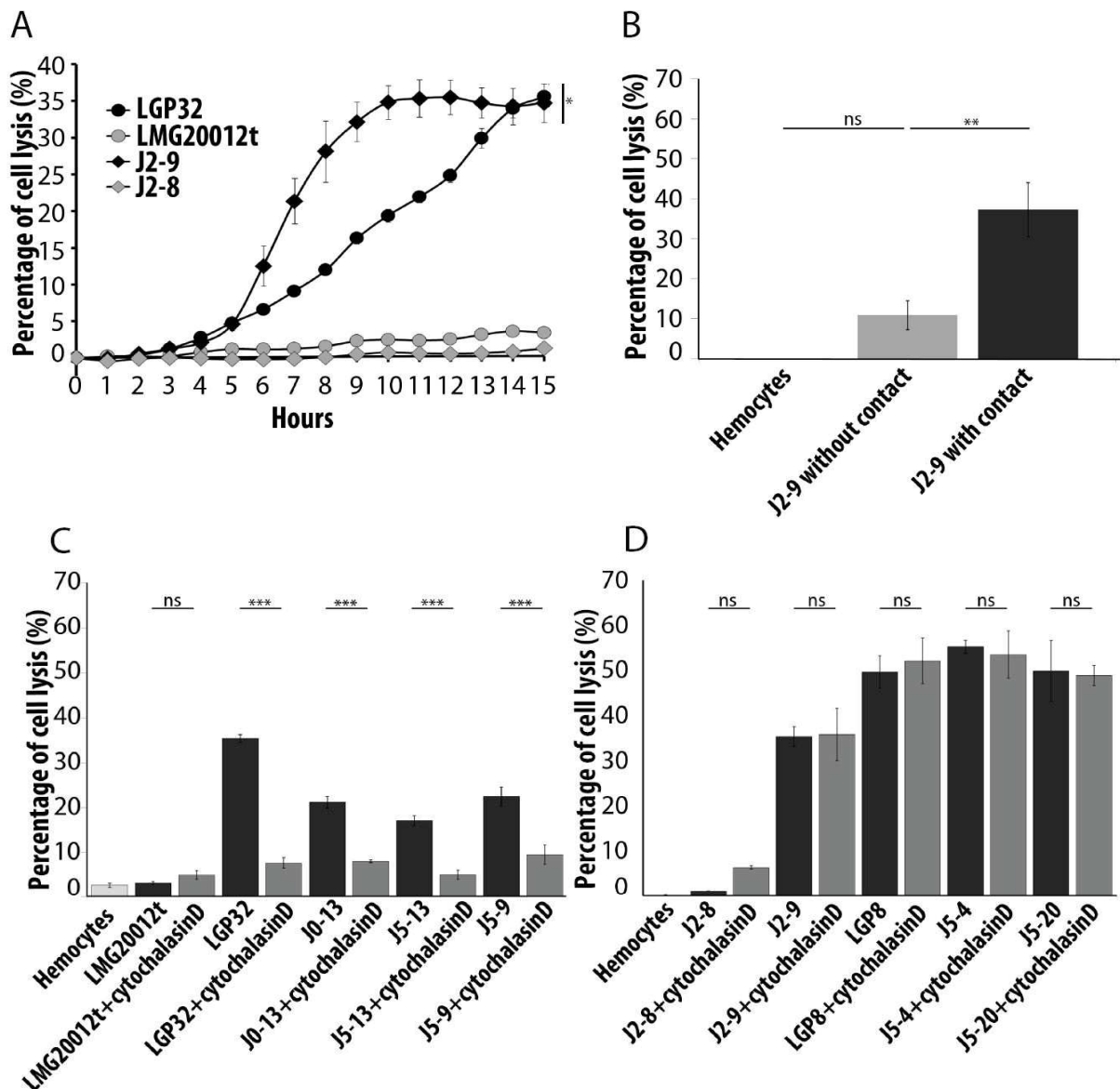


Figure 6 | Population-specific mechanisms of cytotoxicity in *V. crassostreae* and *V. tasmaniensis*

Cytotoxicity of vibrios on monolayer of hemocytes has been followed by measuring the fluorescence of sytox green over 15 h. Cells were infected with bacteria at a MOI of 50:1. (A) Time course of cytotoxicity of J2-9 (black diamond), LGP32 (black circle), J2-8 (grey diamond) and LMG20012t (grey circle). J2-9 cytotoxicity is faster than LGP32 cytotoxicity. Both J2-8 and LMG20012t are non-cytotoxic. The error bars represent the standard deviation of the mean. (RM-ANOVA p -value > 0.05). (B) Maximum of J2-9 cytotoxicity in contact with hemocyte (+, black bars) or in a Transwell plate (without contact, -, grey bars). The contact between hemocytes and vibrios is necessary for cytotoxicity. The error bars represent the standard deviation of the mean. (RM-ANOVA p -value > 0.01). (C-D) Maximum of cytotoxicity of *V. tasmaniensis* (C) or *V. crassostreae* (D) in the presence (grey bars) or absence (black bars) of cytochalasin D used as an inhibitor of phagocytosis. Error bars represent the standard deviation of the mean (RM-ANOVA p -value > 0.001). All virulent strains are cytotoxic. Only the virulent strains of the *V. tasmaniensis* population depend on phagocytosis for cytotoxicity. The maximum of cytotoxicity of *V. crassostreae* is overall stronger than that of *V. tasmaniensis*.

Supplemental figures

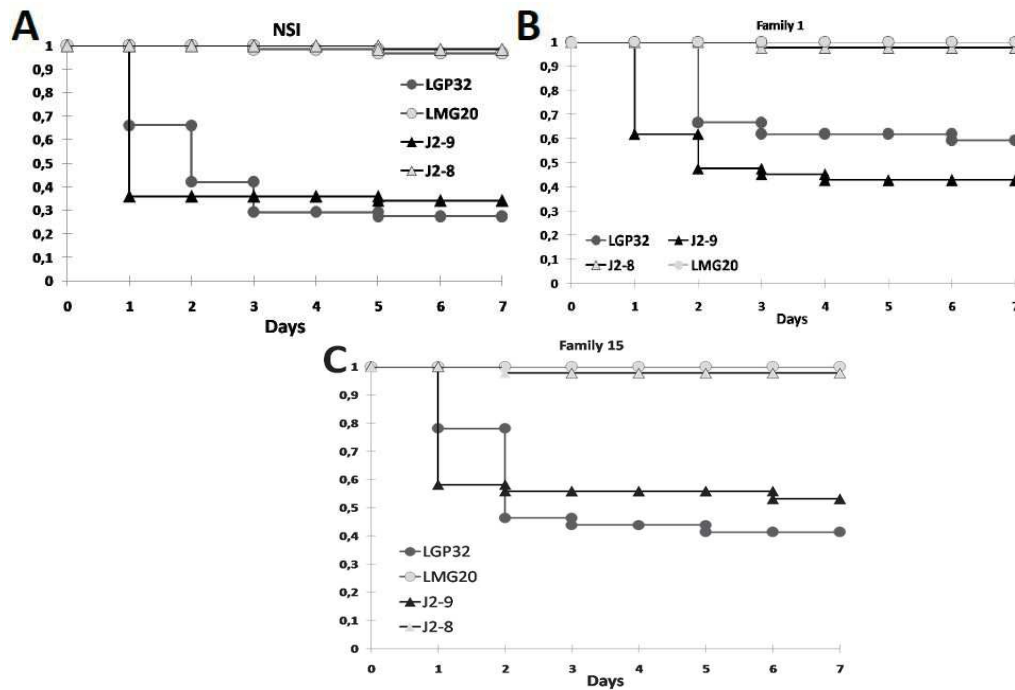


Figure S1 | LGP32 and J2-9 are virulent for oyster with different genetic background

Kaplan Meier survival curves were generated from oysters injected with 7.5×10^7 CFU per oyster of pathogens LGP32 and J2-9 or non pathogen LMG20012T and J2-8. Groups of 20 oysters (2 sea water tanks per condition) were monitored during 7 days after injection. (A) Standardized juvenile oyster produced by ifremer. LGP32 and J2-9 killed 70% of oyster 3 days after injection (Log-rank p-value=0.918). (B) Biparental family of oyster number 1 produced during DECIPHER project. LGP32 killed 40% of oyster 6 days after injection and J2-9 killed 60% of oyster 4 days after injection (Log-rank p-value=0.0125). (C) Biparental family of oyster number 15 produced during DECIPHER project. LGP32 and J2-9 killed 70% of oyster 5 days after injection (Log-rank p-value=0.5875). Non virulent vibrios LMG20012t and J2-8 killed less than 5% of oyster.

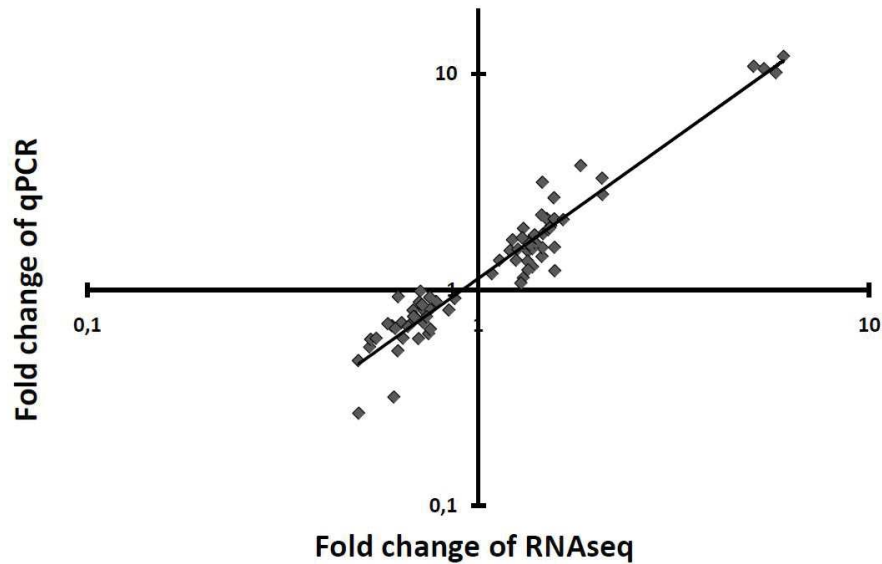


Figure S2 | Validation of the RNAseq quantification data using q-RT-PCR.

Nineteen genes were selected from differentially and non-differentially expressed in each condition of RNAseq. Their relative expression (to ef1, c23 and RP56) quantified by q-RT-PCR on samples used for sequencing were compared with those obtained using the RNAseq approach (normalized expression) ($p < 0.05$). Fold changes of RNAseq are validated by qPCR ($R^2 = 0.926$, $p < 0.001$ test linear regression).

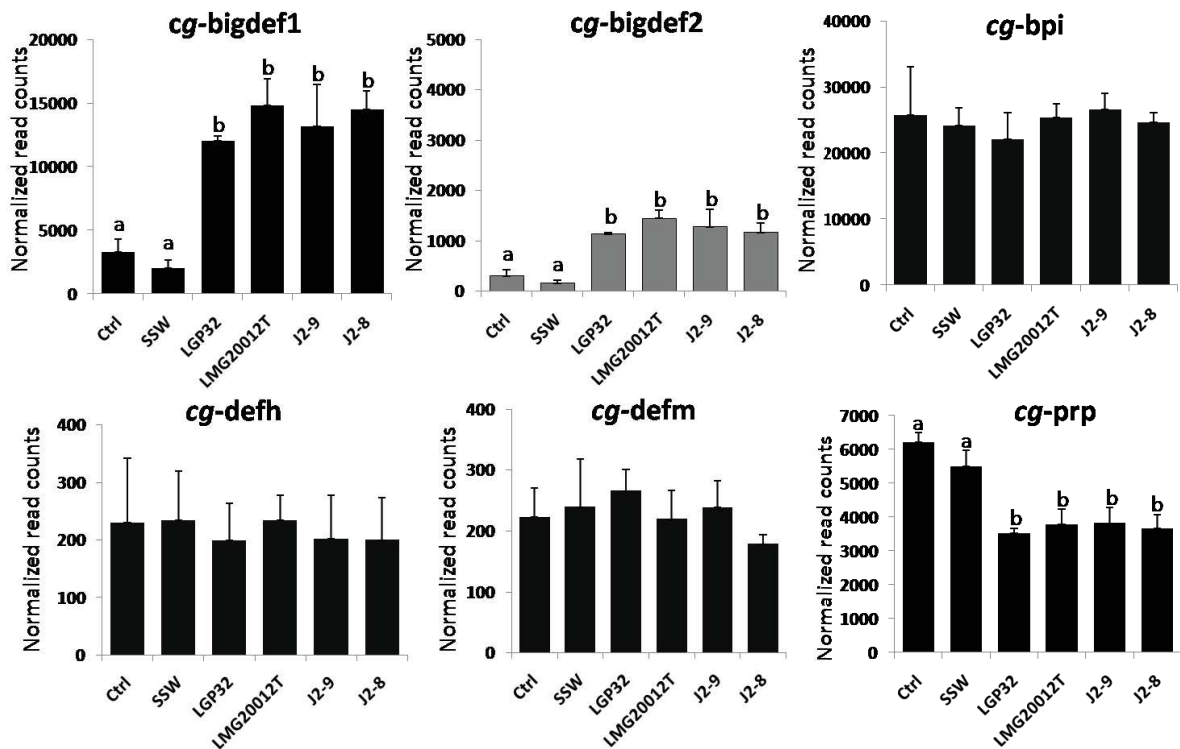


Figure S3 | Antimicrobial peptides responded similarly to virulent and non-virulent strains.

Normalized read counts for AMP genes (*cg-bigdef1*, *cg-bigdef2*, *cg-bpi*, *cg-defh*, *cg-defm*, *cg-prp*) are plotted for vibrio-infected oysters (LGP32, LMG20012T, J2-9, J2-8), mock-infected oysters (SSW) and naive oysters (Ctrl). Transcripts from *cg-big3* and *cg-molluscidin* were absent from oyster family Decipher#14. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA ($p < 0.001$).

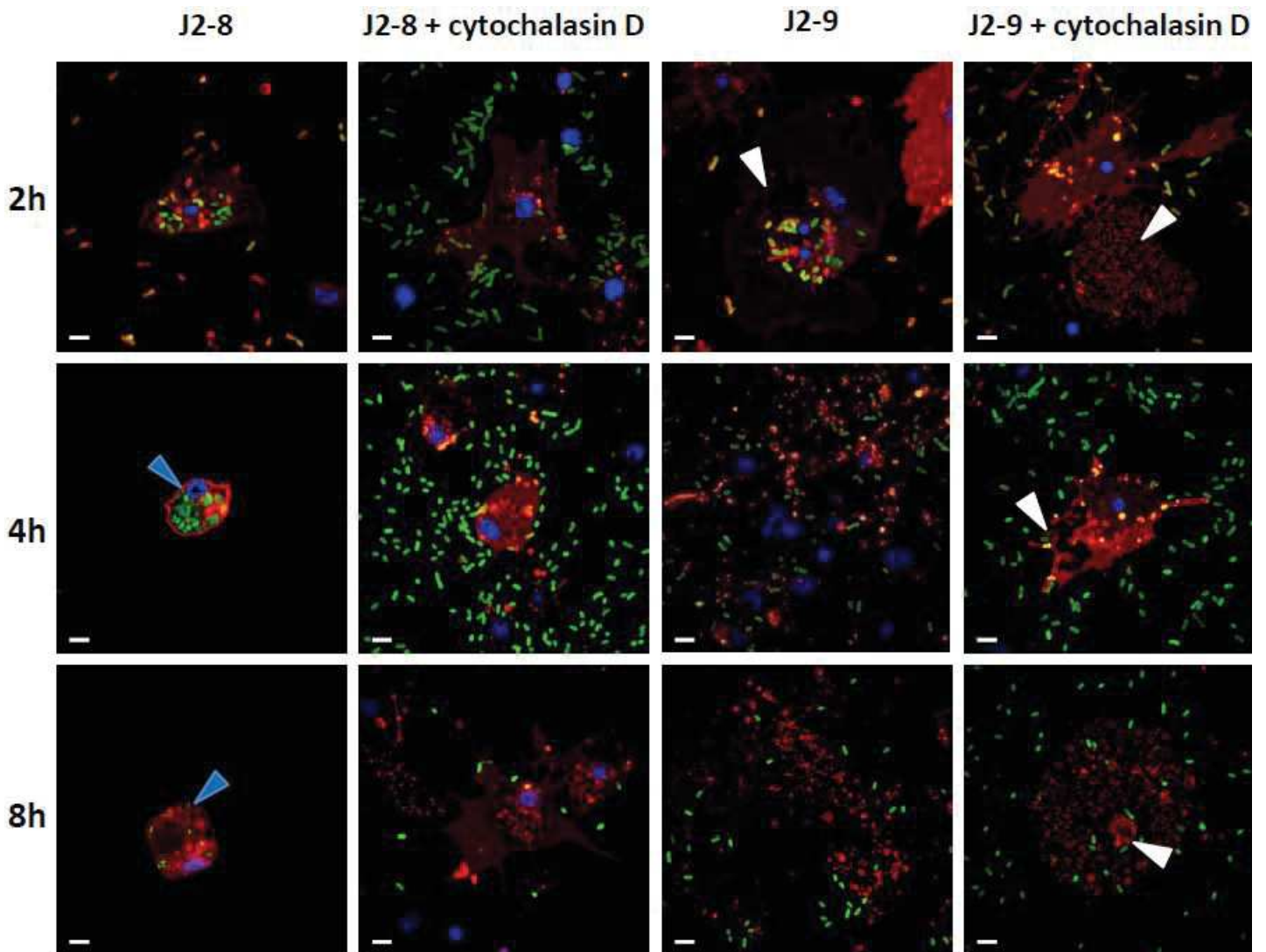


Figure S4 | J2-9 causes damages to hemocytes.

Cellular interaction between GFP-expressing J2-9 or GFP-expressing J2-8 with hemocytes monolayer on coverslip with inhibition of phagocytosis or not. Phagocytosis is inhibited by cytochalasin D. MOI 50:1. Hemocytes and bacteria were fixed with paraformaldehyde 4% in sterile sea water at 2h, 4h and 8h after contact. Nucleus were stained with DAPI and membrane with WGA-TRITC. J2-9 can invade hemocytes and J2-9 is cytotoxic. J2-9 is also cytotoxic when phagocytosis is inhibited. J2-8 is phagocytosed at 2hours, 4hours and eliminated at 8hours. No damages can be observed with J2-8. Scalebar:5 μ m.

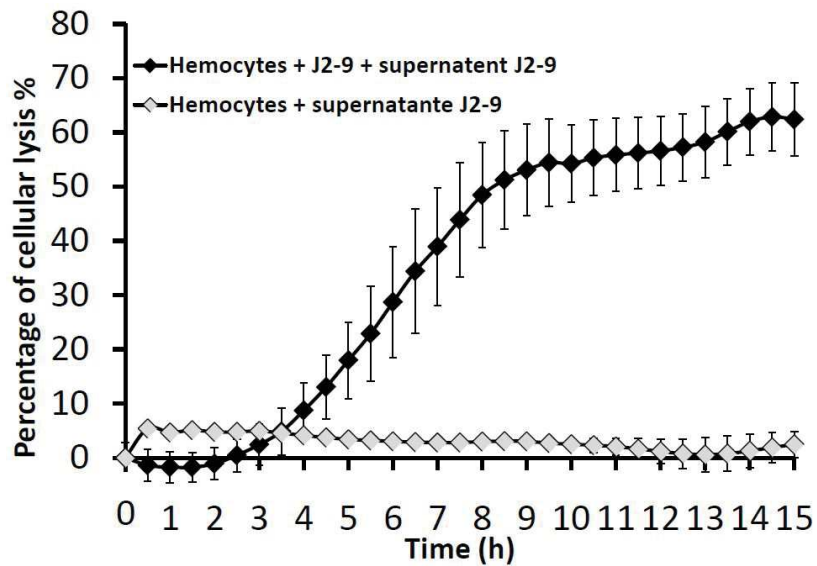


Figure S5 I Extracellular secretion products of J2-9 are not cytotoxic

Cytotoxicity of vibrio on monolayer of hemocytes has been followed by measuring the fluorescence of sytox green during during 15 hours. MOI 50:1. Cytotoxicity kinetic of J2-9 with overnight supernatant (black diamond) and overnight supernatant of J2-9 alone (grey diamond). J2-9 with supernatant lyses 60% of hemocytes whereas supernatant of J2-9 alone is not cytotoxic. The error bar represent the standard deviation of technical replicats.

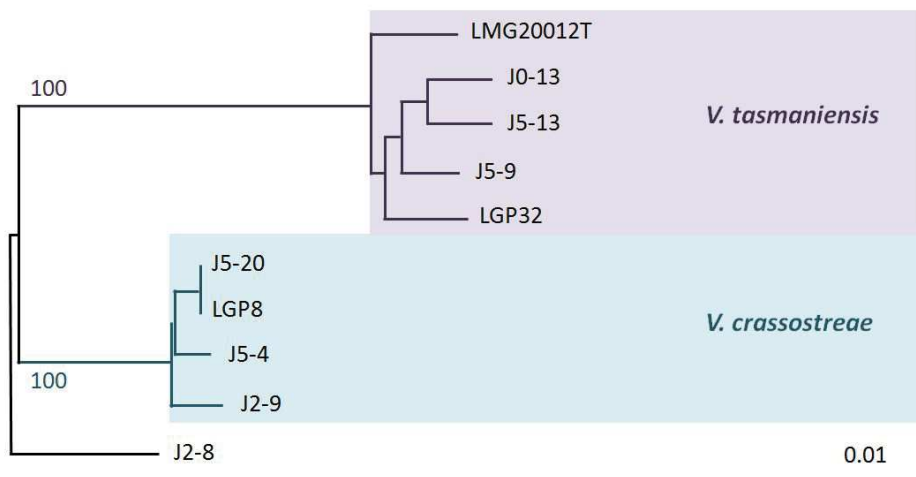


Figure S6 I Phylogenetic analysis based on concatenated alignments of partial nucleic acid sequences of *gyrB*, *topA*, *mreB* and *hsp60* genes of strains analyzed in Fig.6

The tree was built by the Neighbor Joining method (Kimura 2 parameter) based on sequences aligned using Muscle (2204 sites). Branch lengths are drawn to scale and are proportional to the number of nucleotide changes. Numbers at each node represent the percentage value given by bootstrap analysis of 1000 replicates.

Table S1 | qPCR quantification of vibrios in oyster tissues

Real-time qPCR was performed on 40ng/μl of DNA on the same samples using for RNAseq. Quantification of vibrios was calculated in number of vibrio genome copy per number of oyster genome copy because of Avogadro number and genome size of oyster and vibrios. These primers have been chosen because they are specific for each vibrio species. The ratio is the mean of 3 independent experiment.

Strains	Ratio: copy of vibrio genome/copy of oyster genome	Standard deviation
LGP32	0.045	0.037
LMG20 012T	0.015	0.005
J2-9	0.02	0.0014
J2-8	0.02	0.0038

Table S2 | Oligonucleotide for qPCR

Sequences of primers using for RNAseq validation and Vibrios detection.

Primers	Genes	Sequences	Description	target
CGI_10007949 F1	CGI_10007949	5'-GGA-TGA-CGT-GTT-TCG-TAG-GG-3'	B-1,3-galactosyltransferase brn	Oyster
CGI_10007949 R1	CGI_10007949	5'-TCA-ATG-TCT-GCC-AAC-AGC-TC-3'	B-1,3-galactosyltransferase brn	Oyster
CGI_10010688 F2	CGI_10010688	5'-GAC-GGA-AAG-CTG-GAC-ACT-GA-3'	Bone-morphogenetic 1-like	Oyster
CGI_10010688 R2	CGI_10010688	5'-AGG-TCA-TAG-GGA-GGG-GCT-TT-3'	Bone-morphogenetic 1-like	Oyster
CGI_10000441 F2	CGI_10000441	5'-CCC-AGG-GTG-CTC-AAC-AAT-CA-3'	Krueppel-like factor 5	Oyster
CGI_10000441 R2	CGI_10000441	5'-TGT-GTT-TTC-GTA-TGT-GGC-GC-3'	Krueppel-like factor 5	Oyster
CGI_10000066 F2	CGI_10000066	5'-TCT-GCT-CTG-ATT-CGT-GTC-CA-3'	Metallothionein	Oyster
CGI_10000066 R2	CGI_10000066	5'-TTG-CAG-TTT-TCC-GGT-CCA-GT-3'	Metallothionein	Oyster
CGI_10024165 F2	CGI_10024165	5'-AGG-ATG-AGA-CGG-TTG-CTC-AG-3'	Paired bov Pax-8-like isoform X1	Oyster
CGI_10024165 R2	CGI_10024165	5'-CCA-ACA-ACT-TTG-GCA-GAA-CC-3'	Paired bov Pax-8-like isoform X1	Oyster
CGI_10020521 F1	CGI_10020521	5'-CCA-CCT-ACA-CTC-CAA-CGG-AC-3'	Zinc transporter 2-like	Oyster
CGI_10020521R1	CGI_10020521	5'-GGA-CGT-GGA-TAA-AGG-CTG-CT-3'	Zinc transporter 2-like	Oyster
CGI_10003627F1	CGI_10003627	5'-AGA-TTG-CCT-GTC-CAG-TCA-CG-3'	Metalloreductas STEAP4-like	Oyster
CGI_10003627R1	CGI_10003627	5'-AAA-CTT-CAT-GGC-TCC-CTC-CG-3'	Metalloreductas STEAP4-like	Oyster
CGI_10002304F1	CGI_10002304	5'-TGT-ATC-CGG-TCG-AGA-GTG-AG-3'	Cyclin-G-associated kinase-like	Oyster
CGI_10002304R1	CGI_10002304	5'-TAA-CCG-ATT-CCA-GCT-TGC-GG-3'	Cyclin-G-associated kinase-like	Oyster
CGI_10010647F2	CGI_10010647	5'-TAC-GTC-GCC-TTC-ACA-GAC-AC-3'	Heat shock 70	Oyster
CGI_10010647R2	CGI_10010647	5'-CGG-CCA-ATG-TTT-CAT-GTC-GG-3'	Heat shock 70	Oyster
CGI_10019038F2	CGI_10019038	5'-TGG-CCA-CAT-TGT-CCC-TTC-AG-3'	Arginine deiminase/G1/S-specific cyclin-E1	Oyster
CGI_10019038 R2	CGI_10019038	5'-CGA-AGG-ACC-AGT-TGA-GGA-GG-3'	Arginine deiminase/G1/S-specific cyclin-E1	Oyster
CGI_10025754 F1	CGI_10025754	5'-GCC-CAC-GAA-TCT-TGC-TGA-AC-3'	Interleukin 17	Oyster
CGI_10025754 R1	CGI_10025754	5'-TTT-GGG-TAG-CGG-GTG-GAA-AG-3'	Interleukin 17	Oyster
CGI_10000478 F1	CGI_10000478	5'-GAC-GAC-CCT-ATC-CCA-ACA-CC-3'	Neuronal acetylcholine receptor subunit α-6-like	Oyster
CGI_10000478 R1	CGI_10000478	5'-ATC-TCG-CCG-ATC-CTT-TTC-CC-3'	Neuronal acetylcholine receptor subunit α-6-like	Oyster
CGI_10004930 F2	CGI_10004930	5'-AAG-TGG-TCG-AGA-AAC-ACC-CG-3'	NADPH oxidase 5	Oyster
CGI_10004930 R2	CGI_10004930	5'-CCG-GGT-CAG-ACG-AAC-TCT-TC-3'	NADPH oxidase 5	Oyster
CGI_10007268 F2	CGI_10007268	5'-AGC-AAT-GCT-GGA-CAC-AAC-AG-3'	Zinc transporter ZIP10-like isoform X1	Oyster
CGI_10007268 R2	CGI_10007268	5'-AAT-GGC-GAT-GAA-GCT-GTA-CC-3'	Zinc transporter ZIP10-like isoform X1	Oyster

CGI_10009274 F2	CGI_10009274	5'-AGC-TGA-CAA-CAC-TGC-CCA-AT-3'	Complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	Oyster
CGI_10009274 R2	CGI_10009274	5'-TTA-CTG-GTT-TCA-GCT-GTG-CG-3'	Complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	Oyster
CGI_10000910 F2	CGI_10000910	5'-AAT-GTC-ACA-ATG-GGA-AGC-GC-3'	Complement C1q4	Oyster
CGI_10000910 R2	CGI_10000910	5'-GGA-GGT-GGA-ATA-TGC-GCT-GT-3'	Complement C1q4	Oyster
CGI_10020815 F2	CGI_10020815	5'-TGG-CCA-ACA-TGA-ACA-TGT-CC-3'	Complement C1q2	Oyster
CGI_10020815 R2	CGI_10020815	5'-TGC-TCC-CAC-TGT-TGT-ACC-AA-3'	Complement C1q2	Oyster
CGI_10000960 F1	CGI_10000960	5'-ACT-GGG-GAA-AGA-GGA-CGG-AT-3'	Frizzled-1	Oyster
CGI_10000960 R1	CGI_10000960	5'-ACA-CGC-TTG-GCT-CCA-TGT-AA-3'	Frizzled-1	Oyster
CGI_10020472 F2	CGI_10020472	5'-TGA-TGG-ACT-CGG-CTC-AGT-TG-3'	Deleted in malignant brain tumors 1-like	Oyster
CGI_10020472 R2	CGI_10020472	5'-TCA-ATG-GCG-GTT-CTC-TCA-CC-3'	Deleted in malignant brain tumors 1-like	Oyster
EFUfw	AB122066	5'-GAG-CGT-GAA-CGT-GGT-ATC-AC-3'	Elongation factor 1-alpha	Oyster
EFUrv	AB122066	5'-ACA-GCA-CAG-TCA-GCC-TGT-GA-3'	Elongation factor 1-alpha	Oyster
C23fw	HS119070	5'-AAT-CTT-GCA-CCG-TCA-TGC-AG-3'	Ribosomal protein L40	Oyster
C23rv	HS119070	5'-AAT-CAA-TCT-CTG-CTG-ATC-TGC-3'	Ribosomal protein L40	Oyster
rps6F	FP004478	5'-CAG-AAG-TGC-CAG-CTG-ACA-GTC-3'	40S ribosomal protein S6	Oyster
rps6R	FP004478	5'-AGA-AGC-AAT-CTC-ACA-CGG-AC-3'	40S ribosomal protein S6	Oyster
OmpUS3	VS_2494	5'-GTC-CTA-CAG-ACA-GCG-ATA-GC-3'	Porin OmpU	LGP32
OmpUAS2	VS_2494	5'-GTG-GTA-AGC-CAT-GAT-ATC-GC-3'	Porin OmpU	LGP32
R5-2aF	VRSK9J2v1_730268	5'-GGA-TGG-GAC-CAA-CTA-CGG-TG-3'	Protein R5-2	J2-9
R5-2aR	VRSK9J2v1_730268	5'-CGT-AGC-CCG-GAG-GAA-GAA-TC-3'	Protein R5-2	J2-9
LMG20012TF2	VTAS012-v1-10089	5'-GGC-GTT-TCT-TCA-CTT-GCG-AC-3'	Exported protein of unknow function	LMG20 012T
LMG20012TR2	VTAS012-v1-10089	5'-TTT-GCG-GAG-AAG-TGC-TAG-GG-3'	Exported protein of unknow function	LMG20 012T
J2-8F2	VCR8J2v1-840028	5'-GAG-CTT-GAG-ATG-GAG-AAT-CG-3'	Anticodon nuclease	J2-8
J2-8R2	VCR8J2v1-840028	5'-ACC-GTT-TCT-ACT-TCT-GCA-CC-3'	Anticodon nuclease	J2-8
VtopA400F		5'-GAG-ATC-ATC-GGT-GGT-GAT-G -3'	Topoisomerase I	vibrios
VtopA1200R		5'-GAA-GGA-CGA-ATC-GCT-TCG-TG -3'	Topoisomerase I	vibrios
VmreB12F		5'-ACT-TCG-TGG-CAT-CTT-TTC-3'	Rod shapping protein gene B subunit	vibrios
VmreB999R		5'-CCG-TGC-ATA-TCG-ATC-ATT-TC -3'	Rod shapping protein gene B subunit	vibrios
VgyrB274F		5'- GAA-GTT-ATC-ATG-ACG-GTA-CTT-C-3'	DNA gyrase B subunit	vibrios
VgyrB1171R		5'-CCT-TTA-CGA-CGA-TCA-TTT-C -3'	DNA gyrase B subunit	vibrios
hsp60F		5'-GAA-TTC-GA6-666-GC6-GG6-GAY-GGG-AC6-AC6-AC -3'	Heat shock protein 60	vibrios
hsp60R		5'-CGC-GGG-ATC-CYK-6YK-6TC-6CC-RAA-6CC-6GG-6GC-YTT -3'	Heat shock protein 60	vibrios

Table S3 I List of oyster genes with significantly modulated expression

Log2 fold changes in gene expression were calculated relative to expression in mock-infected oysters. Data are means of three independent experiments. Only significant values are displayed (FDR<0.05). ns stands for not significant (FDR>0.05).

Experimental condition	Log2 Fold change				
	J2-9	J2-8	LGP32	LMG20012T	
All vibrios					
Immunity					
CGI_10000338	inhibitor of apoptosis	0,824	0,885	0,788	0,731
CGI_10004922	uncharacterized protein LOC105342241 precursor	2,476	1,974	2,965	2,095
CGI_10004986	heat shock 70 kDa 12A-like	1,220	1,098	1,171	1,072
CGI_10005194	Toll-like receptor 13	0,792	0,757	0,846	0,674
CGI_10005884	toll-like receptor 3 isoform X1	0,837	0,806	0,791	0,834
CGI_10008380	C1q-domain-containing partial	-0,850	-0,778	-0,698	-0,760
CGI_10009742	E3 ubiquitin- ligase HACE1-like isoform X2	0,722	0,685	0,647	0,684
CGI_10010206	TNF receptor-associated factor 6-like	0,628	0,695	0,589	0,610
CGI_10011188	TNFAIP3-interacting 2	0,711	0,684	0,619	0,655
CGI_10011332	transient receptor potential cation channel subfamily M member 2-like isoform X1	-0,833	-0,829	-0,933	-0,843
CGI_10012722	myeloid differentiation primary response 88-like	1,680	1,729	1,626	1,708
CGI_10012725	Myeloid differentiation primary response 88	1,149	1,103	0,926	1,151
CGI_10012786	tumor necrosis factor receptor superfamily member 27-like	1,892	1,695	1,840	1,718
CGI_10013305	Three prime repair exonuclease 1	-1,021	-0,697	-0,987	-0,753
CGI_10017464	low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor-like isoform X2	-0,740	-0,855	-0,875	-0,750
CGI_10018046	interleukin-1 receptor-associated kinase 4-like	0,903	0,831	0,848	0,739
CGI_10018753	Scavenger Receptor Cysteine-Rich repeat protein (SRCR)	0,902	0,989	0,834	0,782
CGI_10021486	Interleukin-17 receptor D	0,883	0,834	0,789	0,758
CGI_10022978	early growth response 1-B-like	0,757	0,554	1,128	0,531
CGI_10023211	dual oxidase maturation factor 1-like	0,558	0,604	0,512	0,574
CGI_10024671	inhibitor of apoptosis	0,953	0,902	0,974	0,728
CGI_10025370	dual oxidase 2-like	0,883	0,842	0,855	0,842
CGI_10025754	interleukin 17	2,595	2,428	2,341	2,532
CGI_10025826	bacterial dynamin	0,926	0,953	0,757	0,802
CGI_10027614	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype-like	1,150	1,028	1,185	1,060
CGI_10027788	Prostaglandin E2 receptor EP4 subtype	-0,771	-0,746	-0,817	-0,692
CGI_10027789	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype-like	1,692	1,425	1,769	1,542
CGI_10027790	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype-like	1,692	1,477	1,779	1,457
CGI_10028411	dual oxidase 2-like	0,548	0,482	0,556	0,523
CGI_10028807	tumor necrosis factor ligand superfamily member 14 isoform X1	2,614	2,607	2,675	2,694
CGI_10016949	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in b(B)-cells n [Caenorhabditis elegans]	0,695	0,661	0,606	0,615
CGI_10025773	Scavenger Receptor Cysteine-Rich repeat protein (SRCR)	1,708	1,739	1,665	1,489
Cell proliferation and differentiation					
CGI_10000790	tyrosine- kinase receptor Tie-1-like	0,813	0,800	0,714	0,688
CGI_10000960	Frizzled-1	-1,019	-0,922	-1,015	-0,717

CGI_10003994	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	0,743	0,649	0,726	0,687
CGI_10006061	Src kinase-associated phospho 2-A	0,566	0,594	0,584	0,583
CGI_10006899	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	0,875	0,821	0,693	0,813
CGI_10013195	low-density lipo receptor-related 6- partial	0,747	0,599	0,756	0,627
CGI_10013232	vascular endothelial growth factor receptor 1-like	0,724	0,750	0,715	0,663
CGI_10013553	multiple epidermal growth factor-like domains 6 isoform X1	1,034	0,785	0,997	0,746
CGI_10014448	transcription factor ETV7-like isoform X1	1,293	1,201	1,190	1,153
CGI_10015910	transforming growth factor-beta-induced ig-h3-like	-0,820	-0,691	-0,754	-0,581
CGI_10018781	low-density lipo receptor-related 4-like	-0,610	-0,639	-0,629	-0,526
CGI_10020091	F-box only 40	0,658	0,723	0,777	0,808
CGI_10023208	multiple epidermal growth factor-like domains 11 isoform X1	0,696	0,777	0,796	0,686
CGI_10025889	Multiple epidermal growth factor-like domains 6	0,839	0,726	0,805	0,685
CGI_10026937	growth differentiation factor 15	0,686	0,641	0,733	0,619
CGI_10028754	girdin-like	0,621	0,585	0,542	0,564

Cell signalisation and adhesion

CGI_10004193	receptor-type tyrosine- phosphatase T-like	0,686	0,775	0,767	0,590
CGI_10007567	Receptor-type tyrosine- phosphatase mu	0,715	0,727	0,651	0,636
CGI_10008580	Regulator of G- signaling 3	0,901	0,654	0,982	0,655
CGI_10013134	VWFA and cache domain-containing 1-like	0,742	0,629	0,563	0,609
CGI_10015913	von Willebrand factor	-1,070	-0,801	-0,829	-0,746
CGI_10016492	receptor-type tyrosine- phosphatase T-like	0,894	0,925	0,836	0,767
CGI_10017314	membrane frizzled-related -like	-0,616	-0,566	-0,615	-0,564
CGI_10021276	TBC1 domain family member 2B	0,601	0,673	0,609	0,630
CGI_10024609	GTPase-activating Rap Ran-GAP domain 3 isoform X2	0,855	0,792	0,916	0,777
CGI_10027721	proto-oncogene tyrosine- kinase Src	0,926	0,863	0,807	0,772
CGI_10028745	dual specificity mitogen-activated kinase kinase 6	0,664	0,588	0,698	0,600

Cytoskeleton dynamics

CGI_10008222	kelch 24	1,068	0,863	1,079	0,925
CGI_10024216	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1 alpha	1,217	1,048	0,928	1,033
CGI_10026034	probable serine threonine- kinase pats1	1,018	0,944	1,027	0,893

Extracellular matrix remodeling

CGI_10000136	ETS-related transcription factor Elf-3	0,783	0,641	0,660	0,687
CGI_10000167	astacin-like metalloprotease toxin 1	0,634	0,637	0,667	0,651
CGI_10000838	hemicentin-1- partial	0,765	0,685	0,849	0,655
CGI_10011233	hemicentin-1-like isoform X1	0,662	0,765	0,630	0,664
CGI_10015700	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like	0,848	0,735	0,830	0,738
CGI_10016448	Tolloid 1	0,607	0,551	0,580	0,493
CGI_10026431	mammalian ependymin-related 1-like	-0,910	-1,063	-0,993	-0,719

Metabolism

CGI_10013879	vesicular glutamate transporter 1	1,713	1,928	1,800	1,840
CGI_10005111	solute carrier family 26 member 6-like	1,113	0,783	1,287	0,891
CGI_10007380	transcription factor SUM-1-like	0,956	0,911	0,909	0,914
CGI_10008546	Excitatory amino acid transporter	0,970	0,619	1,108	0,748
CGI_10008673	cyclic AMP receptor A	1,129	0,975	1,122	0,910

CGI_10008962	cytosolic phospholipase A2-like isoform X5	0,787	0,697	0,738	0,673
CGI_10011328	solute carrier family 28 member 3-like	0,780	0,766	0,878	0,630
CGI_10011959	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase	0,661	0,639	0,626	0,587
CGI_10012822	balbiani ring 3-like	-0,662	-0,606	-0,686	-0,559
CGI_10013925	cis-aconitate partial	0,719	0,828	0,926	0,780
CGI_10014162	steroid 17-alpha-hydroxylase 17,20 lyase-like	1,858	1,639	1,942	1,665
CGI_10015018	solute carrier family 26 member 6-like	1,013	0,673	1,079	0,804
CGI_10018441	cytochrome P450 2J6-like	0,794	0,741	0,861	0,873
CGI_10019737	Malonyl -acyl carrier transacylase	1,011	0,798	1,046	0,880
CGI_10022009	required for meiotic nuclear division 1 homolog	0,682	0,567	0,652	0,564
CGI_10024405	aquaporin-1-like	-0,754	-0,641	-0,771	-0,645

Metal homeostasis

CGI_10012042	metallothionein IV	-0,853	-0,908	-0,859	-0,821
CGI_10019513	Zinc transporter 1	1,038	0,698	1,299	0,735
CGI_10020696	zinc metallo ase nas-15-like	1,045	0,795	1,131	0,774
CGI_10024789	zinc transporter ZIP1-like	1,098	0,690	1,301	0,737

Physiological response

CGI_10004816	endothelin-converting enzyme 2-like	0,821	0,656	0,839	0,753
CGI_10009465	cholecystokinin receptor-like	1,157	0,903	0,999	1,152
CGI_10011273	sex peptide receptor-like	1,491	1,240	1,608	1,272
CGI_10018656	melatonin receptor type 1A-like	0,861	0,844	0,899	0,885
CGI_10025253	cholecystokinin receptor type A-like	1,922	1,774	1,769	1,773
CGI_10026865	sex peptide receptor-like	1,219	1,076	1,222	1,094

Stress response

CGI_10013261	cystatin B	-0,811	-0,797	-0,647	-0,628
CGI_10027358	tumor p53-inducible 11-like isoform X3	0,625	0,680	0,571	0,613

Unknown

CGI_10013657	---NA---	0,732	0,570	0,859	0,612
CGI_10001389	hypothetical protein CGI_10001389	0,747	0,691	0,688	0,658
CGI_10001847	hypothetical protein CGI_10001847	0,951	0,904	0,921	0,968
CGI_10001863	---NA---	0,976	0,999	0,911	0,813
CGI_10003648	---NA---	0,676	0,634	0,744	0,623
CGI_10003650	---NA---	0,840	0,767	1,001	0,836
CGI_10004692	hypothetical protein CGI_10004692	-0,745	-0,658	-0,694	-0,635
CGI_10008857	hypothetical protein CGI_10008857	0,867	0,906	0,753	0,825
CGI_10009568	---NA---	2,570	2,540	2,742	2,449
CGI_10010145	ribonuclease Oy-like	0,805	0,764	0,745	0,811
CGI_10010768	hypothetical protein CGI_10010768	0,873	0,644	0,851	0,753
CGI_10011432	MTL1-like isoform X2	0,879	0,834	0,721	0,795
CGI_10013274	hypothetical protein CGI_10013274	1,511	1,419	1,340	1,278
CGI_10013277	hypothetical protein CGI_10013277	0,886	0,797	1,048	0,850
CGI_10013278	hypothetical protein CGI_10013278	1,152	1,167	1,001	1,147
CGI_10015182	---NA---	0,875	0,707	0,967	0,885
CGI_10015407	---NA---	1,220	0,785	0,946	0,734

CGI_10015817	---NA---	0,863	0,630	0,899	0,693
CGI_10016546	GCC2 and GCC3 domain containing	1,940	1,955	2,108	2,029
CGI_10017716	---NA---	0,894	0,741	1,061	0,681
CGI_10017950	---NA---	0,731	0,646	0,747	0,737
CGI_10019164	FMRF amide receptor	1,528	1,432	1,568	1,442
CGI_10019462	---NA---	0,728	0,690	0,617	0,654
CGI_10019754	hypothetical protein CGI_10019754	0,639	0,593	0,645	0,629
CGI_10020176	rolling stone-like	0,638	0,605	0,691	0,683
CGI_10020600	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105319064 isoform X2	1,144	0,813	1,100	0,990
CGI_10021487	hypothetical protein CGI_10021487	0,842	0,749	0,721	0,665
CGI_10023278	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105343113	1,522	1,467	1,150	1,368
CGI_10024397	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105341803	0,861	0,816	0,861	0,786
CGI_10025511	T9SS C-terminal target domain-containing	1,293	0,792	1,290	0,816
CGI_10025778	---NA---	0,539	0,511	0,504	0,518
CGI_10026775	hypothetical protein CGI_10026775	0,735	0,635	0,585	0,652

Virulent strains

Immunity

CGI_10000016	C-type lectin domain family 4 member F	-0,784	ns	-0,795	ns
CGI_10004930	NADPH oxidase 5	-0,680	ns	-0,914	ns
CGI_10011877	E3 ubiquitin- ligase TRAF7-like isoform X1	0,521	ns	0,598	ns
CGI_10015287	serine threonine- kinase ULK2-like isoform X3	0,643	ns	0,688	ns
CGI_10017081	oxygen oxidoreductase 1	0,729	ns	0,705	ns
CGI_10017352	Tripartite motif-containing 2	0,716	ns	0,705	ns
CGI_10020472	deleted in malignant brain tumors 1 -like	-0,704	ns	-0,867	ns
CGI_10022187	cAMP-responsive element modulator-like isoform X1	0,711	ns	0,726	ns
CGI_10025603	ankyrin repeat and SOCS box 12-like	0,719	ns	0,739	ns

Metabolism

CGI_10005115	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1	0,627	ns	0,653	ns
CGI_10006723	solute carrier family 28 member 3-like	0,689	ns	0,840	ns
CGI_10009030	dehydrocholesterol reductase	-0,563	ns	-0,580	ns
CGI_10009981	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	0,744	ns	0,763	ns
CGI_10010924	Large neutral amino acids transporter small subunit 2	0,684	ns	0,683	ns
CGI_10010925	Y+L amino acid transporter 2	0,634	ns	0,627	ns
CGI_10011760	sodium-coupled monocarboxylate transporter 1-like	0,654	ns	0,765	ns
CGI_10019051	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	0,643	ns	0,654	ns
CGI_10024520	phosphorylase b kinase gamma catalytic skeletal muscle heart isoform isoform X2	0,683	ns	0,791	ns
CGI_10024740	7-alpha-hydroxycholest-4-en-3-one 12-alpha-hydroxylase-like	0,567	ns	0,708	ns

Cell proliferation and differentiation

CGI_10000441	Krueppel-like factor 5	0,617	ns	0,646	ns
CGI_10007949	Beta-1,3-galactosyltransferase brn	0,605	ns	0,609	ns
CGI_10010446	AF-9 isoform X4	0,660	ns	0,639	ns
CGI_10010688	bone morphogenetic 1-like	0,553	ns	0,545	ns
CGI_10010960	ariadne-2	0,569	ns	0,574	ns

CGI_10016254	Core-binding factor subunit beta	0,675	ns	0,847	ns
CGI_10019038	Arginine deiminase/G1/S-specific cyclin-E1	0,872	ns	1,053	ns
CGI_10019520	protocadherin Fat 4-like	0,655	ns	0,872	ns
CGI_10020900	Plexin-B3 (pas entière)	0,652	ns	0,848	ns
CGI_10028323	epidermal growth factor 7 isoform X1	-0,665	ns	-0,569	ns
Extracellular matrix remodeling					
CGI_10006759	retinoic acid receptor gamma-like isoform X1	0,679	ns	0,684	ns
CGI_10011582	fibrillin-2-like isoform X2	0,601	ns	0,749	ns
CGI_10019228	cartilage matrix -like	0,652	ns	0,955	ns
CGI_10019483	A disintegrin and metallo ase with thrombospondin motifs 9	0,700	ns	0,686	ns
CGI_10023231	cartilage matrix -like	0,522	ns	0,573	ns
CGI_10026436	mammalian ependymin-related 1-like	-0,679	ns	-0,718	ns
Calcium homeostasis					
CGI_10002556	Calcitonin receptor	0,544	ns	0,680	ns
CGI_10009976	neuronal calcium sensor 2-like	0,586	ns	0,605	ns
Cell signalisation and adhesion					
CGI_10017761	beta-arrestin-1-like isoform X1	0,668	ns	0,678	ns
Cytoskeleton dynamics					
CGI_10023252	Switch-associated 70	0,595	ns	0,567	ns
Metal homeostasis					
CGI_10000066	Metallothionein	0,582	ns	0,723	ns
Nervous system					
CGI_10000478	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6-like	-0,651	ns	-0,638	ns
CGI_10008391	Melanopsin	-0,516	ns	-0,512	ns
CGI_10020925	high-affinity choline transporter 1-like	0,703	ns	0,836	ns
CGI_10026972	MFS-type transporter SLC18B1-like isoform X1	0,612	ns	0,739	ns
Physiological response					
CGI_10011647	retinoid-inducible serine carboxypeptidase-like	-0,626	ns	-0,708	ns
CGI_10012017	cGMP-inhibited 3 ,5 -cyclic phosphodiesterase A-like isoform X2	0,665	ns	0,669	ns
Stress response					
CGI_10006988	enolase-phosphatase E1-like	0,670	ns	0,754	ns
CGI_10019135	Spermine oxidase	0,768	ns	0,818	ns
Unknown					
CGI_10000756	hypothetical protein CGI_10000756	0,696	ns	0,777	ns
CGI_10005486	glycine-rich domain-containing 2-like	0,644	ns	0,667	ns
CGI_10005541	---NA---	-0,507	ns	-0,654	ns
CGI_10007164	hypothetical protein CGI_10007164	0,607	ns	0,587	ns
CGI_10013275	hypothetical protein CGI_10013275	-0,695	ns	-0,632	ns
CGI_10020129	glycine-rich domain-containing 2-like	0,671	ns	0,694	ns
CGI_10024700	D site-binding -like isoform X1	0,632	ns	0,600	ns
CGI_10026388	delta 4	0,791	ns	0,823	ns
CGI_10026390	cell wall DAN4-like isoform X2	0,619	ns	0,616	ns
LGP32					

Metabolism					
CGI_10007027	diacylglycerol kinase epsilon-like	ns	ns	0,647	ns
CGI_10009966	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 6-like	ns	ns	0,565	ns
CGI_10010340	cholecystokinin receptor type A-like	ns	ns	0,879	ns
CGI_10012085	Maltase-glucoamylase intestinal	ns	ns	0,508	ns
CGI_10021916	Solute carrier family 35 member E1	ns	ns	0,559	ns
CGI_10023604	Beta-hexosaminidase	ns	ns	0,590	ns
CGI_10024389	Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	ns	ns	0,757	ns
CGI_10025610	eukaryotic elongation factor 2 kinase-like	ns	ns	0,691	ns
CGI_10026568	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2-like	ns	ns	0,655	ns
Stress response					
CGI_10009878	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5	ns	ns	-0,719	ns
CGI_10010171	lethal(2)essential for life-like	ns	ns	0,664	ns
CGI_10010646	heat shock 70	ns	ns	0,764	ns
CGI_10010647	heat shock 70	ns	ns	1,057	ns
CGI_10011916	tyrosinase tyr-3	ns	ns	0,607	ns
CGI_10021964	Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1	ns	ns	0,586	ns
CGI_10024247	dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5-like isoform X1	ns	ns	0,774	ns
Cell proliferation and differentiation					
CGI_10004252	ankyrin repeat and KH domain-containing 1-like	ns	ns	0,672	ns
CGI_10024165	paired box Pax-8-like isoform X1	ns	ns	0,649	ns
CGI_10024241	SH2B adapter 1 isoform X1	ns	ns	0,596	ns
CGI_10024242	SH2B adapter 1-like	ns	ns	0,659	ns
CGI_10027736	G1/S-specific cyclin-E1	ns	ns	0,907	ns
CGI_10028440	polycomb Scm isoform X1	ns	ns	0,635	ns
Metal homeostasis					
CGI_10007268	zinc transporter ZIP10-like isoform X1	ns	ns	-0,564	ns
CGI_10020521	zinc transporter 2-like	ns	ns	0,538	ns
CGI_10021194	metallothionein	ns	ns	0,673	ns
CGI_10021196	Metallothionein	ns	ns	0,724	ns
Extracellular matrix remodeling					
CGI_10007657	solute carrier family 23 member 2-like	ns	ns	0,679	ns
CGI_10017877	Sodium-dependent vitamin C transporter 2	ns	ns	0,694	ns
CGI_10026433	ependymin-related 1-like	ns	ns	-0,678	ns
CGI_10026598	Chondroitin proteoglycan-2	ns	ns	-0,730	ns
Immunity					
CGI_10006371	Scavenger Receptor Cysteine-Rich repeat protein (SRCR)	ns	ns	-0,738	ns
CGI_10012948	Exonuclease 3 -5 domain-containing 1	ns	ns	-0,672	ns
CGI_10015980	deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1-like	ns	ns	0,664	ns
Cytoskeleton dynamics					
CGI_10006708	phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase 1	ns	ns	0,579	ns
CGI_10025810	PDZ and LIM domain 3-like isoform X2	ns	ns	0,591	ns
CGI_10028196	Profilin-4	ns	ns	-0,726	ns

Calcium homeostasis					
CGI_10011294	Calmodulin	ns	ns	-0,582	ns
CGI_10025417	neurocalcin homolog	ns	ns	-0,625	ns
Cell signalisation and adhesion					
CGI_10011668	metabotropic glutamate receptor 1-like	ns	ns	0,565	ns
CGI_10014986	Sodium myo-inositol cotransporter	ns	ns	0,610	ns
Unknown					
CGI_10001365	DD3-3-like	ns	ns	0,623	ns
CGI_10003321	---NA---	ns	ns	0,627	ns
CGI_10003521	---NA---	ns	ns	0,545	ns
CGI_10011884	hypothetical protein CGI_10011884	ns	ns	-0,697	ns
CGI_10015821	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105346580	ns	ns	0,727	ns
CGI_10017458	Putative ankyrin repeat protein	ns	ns	0,536	ns
CGI_10018491	---NA---	ns	ns	0,647	ns
CGI_10027114	hypothetical protein CGI_10027114	ns	ns	-0,710	ns
J2-9					
Calcium homeostasis					
CGI_10023772	Transmembrane protein 165	0,509	ns	ns	ns
Immunity					
CGI_10000910	Complement C1q 4	-0,734	ns	ns	ns
CGI_10002038	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1-like	0,661	ns	ns	ns
CGI_10002304	cyclin-G-associated kinase-like	0,652	ns	ns	ns
CGI_10009274	complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	-0,682	ns	ns	ns
CGI_10009319	tyrosinase tyr-3	-0,838	ns	ns	ns
CGI_10016586	fibrinogen A	-0,648	ns	ns	ns
CGI_10017638	Serine protease inhibitor dipetalogastin	-0,747	ns	ns	ns
CGI_10017670	Toll-like receptor 13	0,646	ns	ns	ns
CGI_10020815	Complement C1q 2	-0,768	ns	ns	ns
Metabolism					
CGI_10001936	L-threonine 3-dehydrogenase, mitochondrial-like	0,579	ns	ns	ns
CGI_10006620	DegV domain-containing protein DR_1903	0,842	ns	ns	ns
CGI_10010566	Importin subunit alpha-2	0,592	ns	ns	ns
CGI_10015403	very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl- dehydratase 2	0,678	ns	ns	ns
Cell proliferation and differentiation					
CGI_10011883	iroquois-class homeodomain IRX-6-like	-0,603	ns	ns	ns
CGI_10021355	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	0,644	ns	ns	ns
CGI_10028190	Low-density lipo receptor	-0,710	ns	ns	ns
Cell signalisation and adhesion					
CGI_10005916	Mesenchyme-specific cell surface glycoprotein	-0,731	ns	ns	ns
Metal homeostasis					
CGI_10003627	metalloreductase STEAP4-like	0,598	ns	ns	ns
Nervous system					
CGI_10011840	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6-like	-0,764	ns	ns	ns

CGI_10027975	Midnolin	0,619	ns	ns	ns
Physiological response					
CGI_10020960	endothelin-converting enzyme 1-like	-0,718	ns	ns	ns
Unknown					
CGI_10002341	ATP-binding cassette sub-family F member 2	0,528	ns	ns	ns
CGI_10004621	hypothetical protein CGI_10004621	0,538	ns	ns	ns
CGI_10007446	hypothetical protein CGI_10007446	-0,804	ns	ns	ns
CGI_10020130	hypothetical protein CGI_10020130	0,610	ns	ns	ns
CGI_10028784	EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase	0,611	ns	ns	ns
LMG20 012T					
Metabolism					
CGI_10008289	Fatty acid-binding intestinal	ns	ns	ns	0,680
CGI_10014173	cytochrome P450 family partial	ns	ns	ns	0,565
CGI_10015195	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	ns	ns	ns	0,634
CGI_10016186	sulfotransferase family cytosolic 1B member 1-like	ns	ns	ns	0,554
Immunity					
CGI_10016962	glutathione S-transferase omega-1-like	ns	ns	ns	0,646
Unknown					
CGI_10012559	coadhesin-like isoform X1	ns	ns	ns	-0,635
J2-8					
Immunity					
CGI_10003144	C-type lectin domain family 10 member A	ns	-0,688	ns	ns
CGI_10004092	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	ns	-0,624	ns	ns
CGI_10007048	poly [ADP-ribose] polymerase 14-like	ns	0,514	ns	ns
CGI_10016362	Complement C1q 2	ns	-0,704	ns	ns
Cell proliferation and differentiation					
CGI_10009585	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	ns	0,774	ns	ns
CGI_10022583	Neurogenic locus notch 2	ns	-0,699	ns	ns
Cell signalisation and adhesion					
CGI_10004002	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	ns	-0,689	ns	ns
CGI_10011480	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5-like isoform X2	ns	0,743	ns	ns
Unknown					
CGI_10001388	hypothetical protein CGI_10001388	ns	0,719	ns	ns
CGI_10001482	hypothetical protein CGI_10001482	ns	0,651	ns	ns
CGI_10003224	leucine-rich repeat-containing 74A-like isoform X1	ns	0,475	ns	ns
CGI_10015785	---NA---	ns	0,501	ns	ns
CGI_10025649	CUB and zona pellucida-like domain-containing 1	ns	-0,543	ns	ns
CGI_10026329	---NA---	ns	0,571	ns	ns
V. tasmaniensis					
Unknown					
CGI_10012445	Arrestin domain-containing 2	ns	ns	0,726	0,664
CGI_10028490	---NA---	ns	ns	0,606	0,600

V. crassostreae

Immunity

CGI_10002780	Tripartite motif-containing 2	0,685	0,673	ns	ns
CGI_10008379	C1q-domain-containing partial	-0,804	-0,789	ns	ns
CGI_10016022	Complement C1q 2	-0,553	-0,566	ns	ns
CGI_10026148	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	-0,608	-0,628	ns	ns

Cell signalisation and adhesion

CGI_10016372	von Willebrand factor A domain-containing 7-like	-0,483	-0,524	ns	ns
--------------	--	--------	--------	----	----

Extracellular matrix remodeling

CGI_10016708	fibropellin-1-like isoform X1	-0,591	-0,647	ns	ns
--------------	-------------------------------	--------	--------	----	----

Metal homeostasis

CGI_10003519	metallothionein IV	-0,837	-0,945	ns	ns
--------------	--------------------	--------	--------	----	----

Unknown

CGI_10008134	hypothetical protein CGI_10008134	0,724	0,686	ns	ns
CGI_10023510	hypothetical protein CGI_10023510	0,697	0,684	ns	ns

LGP32 LMG20 012T and J2-8

Unknown

CGI_10007653	poly(U)-specific endoribonuclease-like	ns	0,627	0,730	0,709
--------------	--	----	-------	-------	-------

LGP32 J2-9 and J2-8

cell proliferation and differentiation

CGI_10003385	Receptor-type tyrosine- phosphatase kappa	0,691	0,764	0,660	ns
CGI_10010080	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	0,721	0,764	0,620	ns
CGI_10015524	limbic system-associated membrane -like isoform X1	-0,544	-0,537	-0,575	ns
CGI_10026621	Frizzled-1	-0,804	-0,661	-0,857	ns

Immunity

CGI_10002753	macrophage mannose receptor 1-like	-0,662	-0,608	-0,668	ns
CGI_10012712	Stabilin- partial	-0,704	-0,543	-0,703	ns
CGI_10016659	slit homolog 3 -like	-0,680	-0,591	-0,564	ns
CGI_10020809	complement C1q 4	-0,754	-0,678	-0,694	ns
CGI_10021609	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype-like	0,664	0,650	0,776	ns

Metabolism

CGI_10003941	sodium-coupled monocarboxylate transporter 1-like	0,643	0,641	0,632	ns
CGI_10004693	Mitochondrial intermediate peptidase	-0,575	-0,553	-0,560	ns
CGI_10017882	endochitinase A-like	0,633	0,490	0,641	ns

Stress response

CGI_10004951	heat shock 70 kDa 12A-like	0,777	0,676	0,691	ns
--------------	----------------------------	-------	-------	-------	----

Unknown

CGI_10002943	chorion class high-cysteine HCB 13-like	0,671	0,596	0,788	ns
--------------	---	-------	-------	-------	----

J2-9 LGP32 and LMG20 012T

Extracellular matrix remodeling

CGI_10016148	hemicentin-2-like isoform X2	0,713	ns	0,751	0,576
--------------	------------------------------	-------	----	-------	-------

Immunity

CGI_10000359	low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor-like isoform X2	-0,899	ns	-1,048	-0,732
--------------	---	--------	----	--------	--------

CGI_10024233	hemagglutinin amebocyte aggregation factor-like	0,730	ns	0,957	0,665
Metabolism					
CGI_10010580	glucose dehydrogenase [quinone]-like	0,704	ns	0,843	0,579
CGI_10017876	Solute carrier family 23 member 2	0,767	ns	0,676	0,584
CGI_10020218	sodium-coupled monocarboxylate transporter 1-like	-0,590	ns	-0,622	-0,585
Metal homeostasis					
CGI_10001203	copper-transporting ATPase 1-like isoform X1	0,675	ns	0,819	0,568
CGI_10012799	Zinc transporter ZIP1	0,939	ns	0,924	0,638
Stress response					
CGI_10027395	Heat shock protein 70	0,782	ns	0,738	0,865
Unknown					
CGI_10000961	hypothetical protein CGI_10000961	-0,892	ns	-0,944	-0,718
CGI_10001699	proline-rich transmembrane 1-like	0,747	ns	0,845	0,655
CGI_10012882	Transmembrane 2	0,659	ns	0,794	0,655
CGI_10020743	alternative mitochondrial-like	0,932	ns	0,759	0,746
J2-8 J2-9 and LMG20 012T					
cell proliferation and differentiation					
CGI_10013231	vascular endothelial growth factor receptor 1-like	0,589	0,710	ns	0,607
Immunity					
CGI_10013675	microfibril-associated glyco 4-like	-0,722	-0,635	ns	-0,652
Stress response					
CGI_10004949	heat shock 70 kDa 12A-like	0,766	0,736	ns	0,687
Unknown					
CGI_10027715	---NA---	0,863	0,756	ns	0,765

Table S4. List of oyster genes with expression significantly modulated in response to anesthesia and injection of sterile seawater

Log2 Fold changes in gene expression were calculated relative to expression in naive animals. Data are means of three independent experiments. Only significant values are displayed (FDR<0.05)

CGI	Description	Log2 Fold Change
CGI_10001021	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	0,757
CGI_10001530	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	0,716
CGI_10007647	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]-like	1,582
CGI_10004067	2 -5 -oligoadenylate synthase 1-like	-0,724
CGI_10002041	25S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase nop2-like	0,576
CGI_10023028	40S ribosomal S9	0,680
CGI_10019403	46 kDa FK506-binding nuclear -like isoform X2	0,655
CGI_10008153	60S ribosomal export NMD3-like	0,826
CGI_10007587	60S ribosome subunit biogenesis NIP7 homolog	0,737
CGI_10024740	7-alpha-hydroxycholest-4-en-3-one 12-alpha-hydroxylase-like	0,660
CGI_10028173	78 kDa glucose-regulated	-0,632
CGI_10011582	A disintegrin and metallo ase with thrombospondin motifs 1	0,854
CGI_10016999	A disintegrin and metallo ase with thrombospondin motifs 16	0,845
CGI_10019483	A disintegrin and metallo ase with thrombospondin motifs 9	1,125
CGI_10017355	AChain Crystal Structure Of The Anaplastic Lymphoma Kinase Catalytic Domain	0,832
CGI_10005263	AT-rich interactive domain-containing 1B-like	1,151
CGI_10014926	AT-rich interactive domain-containing 1B-like	1,018
CGI_10010225	ATP-binding cassette sub-family A member 1-like	0,713
CGI_10020425	ATP-binding cassette sub-family A member 1-like	0,940
CGI_10021468	ATP-binding cassette sub-family F member	0,727
CGI_10002341	ATP-binding cassette sub-family F member 2	0,951
CGI_10027843	ATP-binding cassette sub-family F member 3	0,972
CGI_10026623	ATP-dependent RNA helicase DDX55	0,846
CGI_10023410	ATP-dependent RNA helicase partial	0,715
CGI_10006763	ATPase family AAA domain-containing 3A	0,754
CGI_10020479	Acetyl-coenzyme A synthetase 2- mitochondrial	-0,610
CGI_10003156	Acyl- synthetase short-chain family member mitochondrial	-0,742
CGI_10003464	Alba C9orf23	-1,377
CGI_10026809	Aldehyde dehydrogenase family 16 member A1	-0,770
CGI_10012353	Aldose 1-epimerase	1,010
CGI_10014131	Alkaline tissue-nonspecific isozyme	0,907
CGI_10012792	Alpha- kinase vwkA	0,767
CGI_10000994	Amidase	-0,580
CGI_10013331	Ankyrin repeat domain-containing 50	1,032
CGI_10017734	Ankyrin repeat domain-containing 50	1,368
CGI_10018199	Ankyrin repeat domain-containing 50	0,859
CGI_10023178	Ankyrin repeat domain-containing 50	0,928
CGI_10003665	Anosmin-1	0,928
CGI_10013161	Arrestin domain-containing 2	-0,811
CGI_10024555	BTB and MATH domain-containing 36-like	1,032
CGI_10004764	Beta-hexosaminidase	-0,669

CGI_10005314	Bifunctional purine biosynthesis PURH	0,866
CGI_10019179	C-C chemokine receptor type 8-like	2,717
CGI_10008241	C-type lectin domain family member A-like	1,631
CGI_10008380	C1q-domain-containing partial	-0,743
CGI_10009289	CAP-Gly domain-containing linker 1-like	0,753
CGI_10017190	CCAAT enhancer-binding zeta	0,696
CGI_10023765	CD109 antigen-like	1,418
CGI_10023767	CD109 antigen-like	1,220
CGI_10017016	CD151 antigen-like	0,639
CGI_10019451	CRAL-TRIO domain-containing	0,861
CGI_10023304	Carboxypeptidase D	-0,963
CGI_10027078	Cat eye syndrome critical region 5	1,145
CGI_10025966	Chitin synthase 6	-0,713
CGI_10026618	Choline transporter 1	0,745
CGI_10010240	Chorion peroxidase	2,142
CGI_10011578	Collagen alpha-1(XII) chain	-0,656
CGI_10016362	Complement C1q 2	-0,709
CGI_10026769	Complement C1q 2	-0,845
CGI_10016254	Core-binding factor subunit beta	0,758
CGI_10005690	Cysteine-rich with EGF-like domain 2	0,838
CGI_10006287	Cytochrome P450 1A1	0,829
CGI_10007530	DBH-like monooxygenase 1	2,252
CGI_10012435	DDB1- and CUL4-associated factor 13	0,625
CGI_10023201	DNA damage-regulated autophagy modulator 2	0,732
CGI_10027394	DNA helicase MCM9 isoform X1	-0,756
CGI_10014460	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	0,511
CGI_10002339	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2	0,840
CGI_10016516	DUF21 domain-containing At4g33700-like	-0,626
CGI_10025470	E3 ubiquitin- ligase DTX3L	-0,658
CGI_10027065	E3 ubiquitin- ligase MIB2	-1,048
CGI_10017544	EGF-like domain-containing 1	-0,603
CGI_10017543	EGF-like domain-containing 2 isoform X2	-0,546
CGI_10017545	EGF-like domain-containing 2 isoform X2	-0,608
CGI_10004789	ERGIC-53 like	0,726
CGI_10017860	ESF1 homolog	0,752
CGI_10026933	Eosinophil peroxidase	-0,605
CGI_10028339	Eukaryotic translation initiation factor 5B	0,536
CGI_10008546	Excitatory amino acid transporter	1,026
CGI_10013151	Excitatory amino acid transporter 3	-0,545
CGI_10021324	FAM199X-B- partial	0,700
CGI_10018381	FAM63B-like isoform X1	0,687
CGI_10014836	FAM98A	0,717
CGI_10017918	FMRFamide receptor-like	0,872
CGI_10016225	Fas ligand	-0,888
CGI_10020387	Fatty acid synthase	1,045
CGI_10008301	Fatty acid-binding heart	1,079

CGI_10010982	Ferredoxin-fold anticodon-binding domain-containing 1	0,853
CGI_10002067	Fibroblast growth factor receptor 2	-0,781
CGI_10009359	Fibroblast growth factor receptor 2	-0,604
CGI_10011379	Fibronectin type III domain-containing 1	0,585
CGI_10012352	Follistatin-related 4	1,789
CGI_10008036	G -activated inward rectifier potassium channel 3-like	0,845
CGI_10013237	Glutamate decarboxylase 1	1,839
CGI_10025558	Glutathione S-transferase theta-1	0,731
CGI_10020915	H ACA ribonucleo complex non-core subunit NAF1	0,754
CGI_10015230	H ACA ribonucleo complex subunit 4	0,675
CGI_10023958	H-type lectin domain	0,672
CGI_10024527	HGH1 homolog	0,656
CGI_10010171	Heat shock Hsp20 domain containing	1,136
CGI_10010444	Hepatocyte growth factor	1,387
CGI_10028772	Heterochromatin 1-binding 3	-0,563
CGI_10011802	Homeobox partial	0,650
CGI_10009740	Inhibin beta A chain	-0,638
CGI_10005392	Inhibitor of apoptosis	1,159
CGI_10005393	Inhibitor of apoptosis	1,153
CGI_10014064	Innexin unc- partial	1,259
CGI_10028414	Kielin chordin	1,136
CGI_10004830	Krueppel-like factor 11	0,814
CGI_10000441	Krueppel-like factor 5	0,969
CGI_10024574	Krueppel-like factor 5	0,465
CGI_10004843	Kyphoscoliosis peptidase	0,610
CGI_10003590	L-ascorbate oxidase	-0,847
CGI_10004443	L-ascorbate oxidase	0,707
CGI_10012988	L-ascorbate oxidase	-0,868
CGI_10001936	L-threonine 3- mitochondrial-like	0,688
CGI_10002565	LLP homolog	0,872
CGI_10021819	LTV1 homolog	0,873
CGI_10026821	Laminin subunit alpha-3	-0,662
CGI_10006150	Latent-transforming growth factor beta-binding 4	-0,794
CGI_10017744	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3	1,190
CGI_10002962	Low-density lipo receptor-related 2	-0,913
CGI_10018997	Low-density lipo receptor-related 4	0,747
CGI_10003966	MAM and LDL-receptor class A domain-containing 1-like	-0,936
CGI_10004601	MAM and LDL-receptor class A domain-containing 1-like	0,840
CGI_10025870	MAM and LDL-receptor class A domain-containing 1-like	0,776
CGI_10026972	MFS-type transporter SLC18B1-like isoform X1	0,906
CGI_10018564	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phospho	0,789
CGI_10014565	Mannose-P-dolichol utilization defect 1	0,641
CGI_10019917	Microsomal triglyceride transfer large subunit	0,599
CGI_10004802	Mid1-interacting 1A	0,783
CGI_10021221	Mpv17 2	0,814
CGI_10017881	Multidrug resistance-associated 4	0,607

CGI_10004362	Multiple epidermal growth factor-like domains 10	-0,672
CGI_10017404	Myb-binding 1A	0,805
CGI_10006015	Myophilin	0,849
CGI_10006016	Myophilin	0,721
CGI_10020906	NAD-dependent deacetylase Sirt6-like	0,703
CGI_10005280	NC domain	0,790
CGI_10005278	NC domain-containing	0,997
CGI_10026082	Neuroglobin	0,654
CGI_10024456	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6	-1,100
CGI_10010874	Non-lysosomal glucosylceramidase	0,553
CGI_10019069	Nucleolar 10	0,661
CGI_10010087	Nucleolar 14	0,607
CGI_10004835	Nucleolar GTP-binding 2	0,653
CGI_10010569	Nucleolar MIF4G domain-containing 1	0,718
CGI_10008207	Nucleolar pre-ribosomal-associated 1	0,914
CGI_10026874	Obg-like ATPase 1	0,545
CGI_10018696	Oxidative stress-induced growth inhibitor 2	0,918
CGI_10028819	PBDC1-like	0,864
CGI_10010237	PREDICTED: uncharacterized protein C19orf52-like	0,746
CGI_10021823	PREDICTED: uncharacterized protein C7orf50 homolog	0,780
CGI_10017349	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105317622 isoform X2	0,888
CGI_10015844	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105319252	1,051
CGI_10004105	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105320535	1,477
CGI_10010833	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105320548 isoform X1	1,050
CGI_10003796	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105322187	0,664
CGI_10003043	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105322889	0,740
CGI_10015526	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105327700	2,436
CGI_10023732	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105329095	1,041
CGI_10008360	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105333527	0,677
CGI_10025559	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105335899	0,878
CGI_10013387	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105336172	1,238
CGI_10023563	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105336697	-0,875
CGI_10008804	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105336910 isoform X1	0,598
CGI_10006885	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105337665	1,262
CGI_10020787	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105337946	1,123
CGI_10019789	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105338113	0,577
CGI_10022886	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105340540 isoform X1	0,957
CGI_10013731	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105340663 isoform X1	0,604
CGI_10008017	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105341191 isoform X1	0,740
CGI_10024373	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105341771	1,096
CGI_10017081	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105342376	2,022
CGI_10005810	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105343262	0,796
CGI_10007670	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105346062	2,166
CGI_10014765	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105346727	0,869
CGI_10016127	Pancreatic secretory granule membrane major glyco GP2	-0,703
CGI_10006117	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	3,936

CGI_10006118	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	3,928
CGI_10006178	Phosphoserine phosphatase	1,059
CGI_10004931	Propionyl- carboxylase alpha mitochondrial	-0,672
CGI_10008703	Protocadherin Fat 4	-0,802
CGI_10003171	RNA 3 -terminal phosphate cyclase	0,861
CGI_10026126	RNA cytidine acetyltransferase	0,666
CGI_10000313	RRP12	0,776
CGI_10025541	RRP5 homolog	0,658
CGI_10013581	Radial spoke head 10 B2	0,713
CGI_10005650	Ras-related Rab-11A	1,286
CGI_10018017	Ras-related Rab-1A	0,747
CGI_10023314	Receptor-type tyrosine- phosphatase gamma	-0,946
CGI_10008403	Rho-related GTP-binding	0,642
CGI_10010821	Ribosome biogenesis bop1	0,766
CGI_10012202	SDA1 homolog	0,688
CGI_10011072	SJCHGC02598 partial	-0,778
CGI_10006146	Sarcoplasmic calcium-binding	-0,835
CGI_10008723	Sequestosome- partial	0,892
CGI_10017638	Serine protease inhibitor dipetalogastin	-0,780
CGI_10026996	Sodium glucose cotransporter 4	-0,587
CGI_10019439	Sodium-dependent phosphate transport 2B	0,873
CGI_10014831	Solute carrier family 12 member 2	1,105
CGI_10017876	Solute carrier family 23 member 2	0,826
CGI_10017877	Solute carrier family 23 member 2	1,050
CGI_10019125	Solute carrier family 23 member 2	0,997
CGI_10010057	Solute carrier family 25 member 38	0,973
CGI_10028762	Solute carrier family 25 member 38	0,945
CGI_10024389	Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	0,753
CGI_10002040	Spermidine synthase	0,623
CGI_10023542	Spore cortex-lytic enzyme	0,839
CGI_10025038	Spore cortex-lytic enzyme	1,157
CGI_10004108	Sterol regulatory element-binding 1	0,536
CGI_10002938	Sulfotransferase 1C4	1,103
CGI_10025511	T9SS C-terminal target domain-containing	1,942
CGI_10013305	Three prime repair exonuclease 1	-0,910
CGI_10018725	Tissue factor pathway inhibitor 2	1,015
CGI_10005193	Toll-like receptor 2	-0,794
CGI_10016448	Tolloid 1	0,938
CGI_10010522	Transcription factor IIIA	0,637
CGI_10020641	Transducin beta 3	0,621
CGI_10012882	Transmembrane 2	1,765
CGI_10012136	Tripartite motif-containing 2	0,817
CGI_10012796	Tripartite motif-containing 2	-0,725
CGI_10017352	Tripartite motif-containing 2	1,220
CGI_10021357	Tripartite motif-containing 2	1,600
CGI_10005803	Tripartite motif-containing 3	0,641

CGI_10009743	Tripartite motif-containing 3	-0,532
CGI_10011982	Tripartite motif-containing 45	-0,819
CGI_10012944	Tripartite motif-containing 45	0,801
CGI_10022283	Tripartite motif-containing 45	0,777
CGI_10010609	Type II secretion system (T2SS) N-terminal domain	0,668
CGI_10016964	Tyrosine- phosphatase Lar	-0,783
CGI_10016965	Tyrosine- phosphatase Lar	-0,544
CGI_10013738	Tyrosine- phosphatase non-receptor type 23	0,745
CGI_10020714	U3 small nucleolar RNA-associated 4 homolog	0,721
CGI_10013185	U3 small nucleolar ribonucleo IMP3	0,677
CGI_10019402	U3 small nucleolar ribonucleo MPP10	0,625
CGI_10014785	UPF0462 C4orf33 homolog	0,571
CGI_10022383	Universal stress A	-0,686
CGI_10004749	VWFA and cache domain-containing 1-like	1,049
CGI_10013334	VWFA and cache domain-containing 1-like	-0,542
CGI_10017379	VWFA and cache domain-containing 1-like	0,955
CGI_10025570	VWFA and cache domain-containing 1-like	-0,899
CGI_10011465	WD repeat-containing 3	0,782
CGI_10023488	WD repeat-containing 36	0,647
CGI_10024696	WD repeat-containing 43	0,511
CGI_10004778	Zinc finger ubi-d4	-0,632
CGI_10012799	Zinc transporter ZIP1	0,802
CGI_10013239	Zonadhesin	2,459
CGI_10025090	actin cytoskeleton-regulatory complex PAN1-like isoform X1	-0,687
CGI_10026160	actin depolymerizing factor	1,122
CGI_10017283	aldehyde dehydrogenase family 16 member A1-like	-0,715
CGI_10005959	alpha-crystallin B chain-like	0,803
CGI_10021044	alpha-mannosidase 2C1-like isoform X1	-0,546
CGI_10028435	amidophosphoribosyltransferase isoform X1	0,672
CGI_10009087	ammonium transporter 1	-0,640
CGI_10009803	anaphase-promoting complex subunit 5-like	0,872
CGI_10016690	ankyrin repeat and KH domain-containing mask-like	1,354
CGI_10027204	ankyrin repeat domain-containing 50-like isoform X2	0,597
CGI_10002880	antileuko ase	-0,713
CGI_10007514	apolipo D-like	-1,264
CGI_10018491	apolipo D-like	0,981
CGI_10014470	apolipophorins-like isoform X1	0,466
CGI_10013723	aquaporin -like	-0,692
CGI_10018626	aquaporin-8-like isoform X2	1,113
CGI_10014628	arginine N-methyltransferase 1 isoform X1	0,613
CGI_10018308	arrestin domain-containing 3-like	1,177
CGI_10028027	arylsulfatase B-like	0,564
CGI_10005254	asparagine--tRNA cytoplasmic	0,530
CGI_10000167	astacin-like metalloprotease toxin 1	0,633
CGI_10027125	bestrophin-1-like isoform X1	0,664
CGI_10007857	beta-N-acetylhexosaminidase	0,810

CGI_10017760	beta-arrestin-1-like isoform X2	0,612
CGI_10011787	beta-microsemino -like	1,230
CGI_10017122	betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like	1,148
CGI_10007191	blastula protease 10-like	0,969
CGI_10010688	bone morphogenetic 1-like	1,000
CGI_10018684	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-like	0,575
CGI_10014728	c-binding -like	1,925
CGI_10005633	calmodulin	-0,853
CGI_10013419	calmodulin 1	0,641
CGI_10003593	calpain-2 catalytic subunit-like	-0,577
CGI_10005777	carboxypeptidase N subunit 2	0,848
CGI_10019228	cartilage matrix -like	0,990
CGI_10010114	cell death abnormality 1-like	1,968
CGI_10005625	cell growth-regulating nucleolar -like	1,036
CGI_10026390	cell wall DAN4-like isoform X2	0,982
CGI_10013462	cell wall integrity and stress response component 4-like	-1,186
CGI_10025118	cell wall integrity and stress response component 4-like	0,913
CGI_10025119	cell wall integrity and stress response component 4-like	1,223
CGI_10023737	centrosome-associated CEP250-like	0,629
CGI_10018711	chitin binding beak 1	1,283
CGI_10010445	chitin deacetylase - partial	2,292
CGI_10027473	chitin deacetylase - partial	0,984
CGI_10009438	chitin synthase	0,893
CGI_10004524	cholecystokinin receptor type A-like	0,760
CGI_10024466	chondroitin proteoglycan-2-like	1,890
CGI_10021733	chorion peroxidase-like	1,172
CGI_10008415	chromobox 8	1,138
CGI_10020625	chymotrypsinogen A-like	-0,742
CGI_10013953	claudin domain-containing 1-like	0,516
CGI_10006386	coadhesin-like isoform X2	0,717
CGI_10024583	collagen alpha-1(IX) chain isoform X1	-0,672
CGI_10020809	complement C1q 4	-0,528
CGI_10003000	complement C1q partial	-1,170
CGI_10002102	complement C1q tumor necrosis factor-related 3-like	-1,447
CGI_10005220	complement C1q tumor necrosis factor-related 3-like	2,467
CGI_10009272	complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	-0,686
CGI_10009273	complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	-0,714
CGI_10009274	complement C1q tumor necrosis factor-related 7-like	-0,950
CGI_10026413	copine-8-like isoform X2	0,669
CGI_10002304	cyclin-G-associated kinase-like	-0,799
CGI_10013578	cystatin-B-like	0,573
CGI_10001636	cytochrome P450 2J6-like	1,117
CGI_10012973	cytochrome P450 3A11-like	0,761
CGI_10018754	deleted in malignant brain tumors 1 -like	0,836
CGI_10022550	deleted in malignant brain tumors 1 -like	-0,661
CGI_10026985	deleted in malignant brain tumors 1 -like	0,601

CGI_10019298	deleted in malignant brain tumors 1 partial	0,605
CGI_10013132	diablo mitochondrial-like	0,745
CGI_10017778	dipeptidase 1-like	-0,841
CGI_10011127	diphthine--ammonia ligase	0,832
CGI_10028745	dual specificity mitogen-activated kinase kinase 6	0,787
CGI_10026432	ependymin-related 1-like	1,580
CGI_10028323	epidermal growth factor 7	-0,703
CGI_10001553	eukaryotic initiation factor 4A-I	0,986
CGI_10008815	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	0,607
CGI_10021675	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B isoform X1	0,505
CGI_10006122	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K isoform X2	0,696
CGI_10027107	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	0,811
CGI_10017841	excitatory amino acid transporter 1-like	0,904
CGI_10008477	fatty acid-binding heart-like	0,750
CGI_10003521	filamin-A-like isoform X1	0,738
CGI_10024748	flocculation FLO10-like	1,823
CGI_10024194	follistatin-A-like isoform X1	0,742
CGI_10011073	g- coupled receptor 158	-0,802
CGI_10009751	galectin-4-like isoform X1	0,795
CGI_10015451	galectin-4-like isoform X1	0,748
CGI_10004130	gastrula zinc finger -like	1,116
CGI_10007920	geranylgeranyl pyrophosphate synthase isoform X2	0,646
CGI_10023928	glucose dehydrogenase [quinone]-like	1,064
CGI_10024768	glucose dehydrogenase [quinone]-like	0,842
CGI_10015551	glutamate receptor kainate 2-like	1,207
CGI_10002310	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit mitochondrial	0,879
CGI_10015808	glutathione S-transferase-like	0,904
CGI_10008716	glycine--tRNA ligase-like	0,717
CGI_10009933	glycoside hydrolase family 3	1,012
CGI_10027969	grainyhead-like isoform X1	0,735
CGI_10012922	growth arrest and DNA damage-inducible GADD45 gamma-like	0,816
CGI_10015344	guanine nucleotide-binding -like 3 homolog	0,810
CGI_10010646	heat shock 70	-0,868
CGI_10024233	hemagglutinin amebocyte aggregation factor-like	2,676
CGI_10016148	hemicentin-2-like isoform X2	0,909
CGI_10026371	high affinity copper uptake 1-like	0,799
CGI_10003321	histidine-rich glyco -like	0,963
CGI_10000756	hypothetical protein CGI_10000756	1,830
CGI_10001162	hypothetical protein CGI_10001162	1,078
CGI_10001306	hypothetical protein CGI_10001306	0,765
CGI_10001444	hypothetical protein CGI_10001444	-1,037
CGI_10001978	hypothetical protein CGI_10001978	-0,652
CGI_10002366	hypothetical protein CGI_10002366	-0,725
CGI_10002474	hypothetical protein CGI_10002474	0,727
CGI_10002722	hypothetical protein CGI_10002722	0,776
CGI_10003422	hypothetical protein CGI_10003422	1,729

CGI_10004793	hypothetical protein CGI_10004793	1,136
CGI_10004809	hypothetical protein CGI_10004809	1,109
CGI_10004912	hypothetical protein CGI_10004912	-1,234
CGI_10005076	hypothetical protein CGI_10005076	1,690
CGI_10005237	hypothetical protein CGI_10005237	0,755
CGI_10005824	hypothetical protein CGI_10005824	-0,574
CGI_10006259	hypothetical protein CGI_10006259	0,680
CGI_10006505	hypothetical protein CGI_10006505	-0,876
CGI_10006869	hypothetical protein CGI_10006869	1,449
CGI_10007411	hypothetical protein CGI_10007411	0,993
CGI_10007669	hypothetical protein CGI_10007669	2,213
CGI_10007713	hypothetical protein CGI_10007713	0,731
CGI_10007834	hypothetical protein CGI_10007834	-1,586
CGI_10008720	hypothetical protein CGI_10008720	0,815
CGI_10008988	hypothetical protein CGI_10008988	1,016
CGI_10010768	hypothetical protein CGI_10010768	0,731
CGI_10011039	hypothetical protein CGI_10011039	-0,663
CGI_10013027	hypothetical protein CGI_10013027	0,717
CGI_10013279	hypothetical protein CGI_10013279	1,628
CGI_10013585	hypothetical protein CGI_10013585	0,771
CGI_10014344	hypothetical protein CGI_10014344	0,840
CGI_10014364	hypothetical protein CGI_10014364	1,221
CGI_10014451	hypothetical protein CGI_10014451	0,843
CGI_10014865	hypothetical protein CGI_10014865	1,567
CGI_10015198	hypothetical protein CGI_10015198	-0,649
CGI_10015284	hypothetical protein CGI_10015284	1,252
CGI_10015422	hypothetical protein CGI_10015422	-0,535
CGI_10017894	hypothetical protein CGI_10017894	-0,627
CGI_10018550	hypothetical protein CGI_10018550	0,690
CGI_10018836	hypothetical protein CGI_10018836	-0,955
CGI_10018986	hypothetical protein CGI_10018986	1,933
CGI_10019825	hypothetical protein CGI_10019825	1,240
CGI_10019858	hypothetical protein CGI_10019858	1,665
CGI_10020040	hypothetical protein CGI_10020040	0,795
CGI_10020130	hypothetical protein CGI_10020130	0,749
CGI_10020246	hypothetical protein CGI_10020246	1,852
CGI_10020517	hypothetical protein CGI_10020517	-0,726
CGI_10020607	hypothetical protein CGI_10020607	1,050
CGI_10020612	hypothetical protein CGI_10020612	0,665
CGI_10020692	hypothetical protein CGI_10020692	-0,697
CGI_10020836	hypothetical protein CGI_10020836	-0,582
CGI_10020900	hypothetical protein CGI_10020900	0,710
CGI_10021070	hypothetical protein CGI_10021070	1,022
CGI_10021124	hypothetical protein CGI_10021124	0,606
CGI_10022294	hypothetical protein CGI_10022294	-0,757
CGI_10022887	hypothetical protein CGI_10022887	1,151

CGI_10023299	hypothetical protein CGI_10023299	-0,515
CGI_10023301	hypothetical protein CGI_10023301	-0,852
CGI_10023585	hypothetical protein CGI_10023585	0,827
CGI_10023586	hypothetical protein CGI_10023586	1,158
CGI_10023734	hypothetical protein CGI_10023734	0,843
CGI_10024053	hypothetical protein CGI_10024053	1,251
CGI_10024185	hypothetical protein CGI_10024185	0,887
CGI_10025307	hypothetical protein CGI_10025307	0,882
CGI_10026219	hypothetical protein CGI_10026219	1,160
CGI_10026546	hypothetical protein CGI_10026546	0,739
CGI_10027221	hypothetical protein CGI_10027221	0,813
CGI_10027224	hypothetical protein CGI_10027224	1,202
CGI_10027474	hypothetical protein CGI_10027474	1,064
CGI_10027604	hypothetical protein CGI_10027604	3,413
CGI_10028252	hypothetical protein CGI_10028252	0,571
CGI_10028346	hypothetical protein CGI_10028346	3,211
CGI_10028581	hypothetical protein CGI_10028581	-0,616
CGI_10027129	hypoxia up-regulated 1-like isoform X1	0,717
CGI_10005238	immediate early response gene 5	0,645
CGI_10021001	inositol-3-phosphate synthase 1	0,841
CGI_10015700	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like	0,926
CGI_10017857	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 isoform X1	1,012
CGI_10014532	interferon-induced 44-like	-0,624
CGI_10021775	inverted formin-2-like	0,610
CGI_10017164	kelch 3 isoform X1	0,596
CGI_10018987	kielin chordin	1,368
CGI_10018988	kielin chordin	2,460
CGI_10028286	kielin chordin	0,668
CGI_10018739	kynurenine formamidase-like	-0,799
CGI_10010934	lachesin- partial	-0,742
CGI_10017030	leucine--tRNA cytoplasmic-like	0,629
CGI_10016865	leucine-rich repeat-containing 58-like	0,959
CGI_10011703	leucine-rich repeat-containing 74B-like	-0,613
CGI_10006892	limbic system-associated membrane -like isoform X1	0,576
CGI_10028190	low density lipo receptor	0,593
CGI_10018781	low-density lipo receptor-related 4-like	-0,560
CGI_10014965	mRNA turnover 4 homolog	0,780
CGI_10002756	macrophage mannose receptor 1-like	1,174
CGI_10012085	maltase- intestinal isoform X1	0,592
CGI_10026431	mammalian ependymin-related 1-like	-1,495
CGI_10024590	mantle 9	1,254
CGI_10027602	mediator of DNA damage checkpoint 1-like isoform X1	2,874
CGI_10027603	mediator of DNA damage checkpoint 1-like isoform X1	1,053
CGI_10020516	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 26 isoform X1	-0,686
CGI_10019932	meiotically up-regulated gene 158 -like	0,781
CGI_10023366	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	0,617

CGI_10003007	metabotropic glutamate receptor 4-like	-0,704
CGI_10003519	metallothionein IV	-1,383
CGI_10012042	metallothionein IV	-1,698
CGI_10010551	methionine synthase isoform X1	0,738
CGI_10025706	methylenetetrahydrofolate reductase isoform X1	0,895
CGI_10007991	microfibril-associated glyco 4-like	-0,849
CGI_10016587	microfibril-associated glyco 4-like	-0,690
CGI_10023523	mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog 1-like	0,699
CGI_10015670	mitogen-activated kinase kinase kinase 4-like	-0,513
CGI_10015909	mitotic apparatus p62-like	1,014
CGI_10024560	mitotic apparatus p62-like	1,258
CGI_10014305	monoacylglycerol lipase ABHD12 isoform X1	0,950
CGI_10014420	monocarboxylate transporter 12-like	-0,788
CGI_10006884	mucin-5AC-like isoform X1	1,359
CGI_10017999	multidrug resistance 1 isoform X1	0,526
CGI_10005121	multidrug resistance-associated 9	0,533
CGI_10028436	multifunctional ADE2-like	0,936
CGI_10027853	multiple coagulation factor deficiency 2 homolog	0,821
CGI_10003472	multiple epidermal growth factor-like domains 10	-0,749
CGI_10010466	multiple epidermal growth factor-like domains 10 isoform X1	1,111
CGI_10002494	multiple epidermal growth factor-like domains 6	-0,976
CGI_10014218	neuraminidase (sialidase)	-0,944
CGI_10028086	neuroendocrine convertase 2-like isoform X4	-0,799
CGI_10024963	neuroguidin isoform X1	0,667
CGI_10018348	neuroligin- X-linked isoform X1	-0,826
CGI_10005896	neuromedin-U receptor 2-like	0,792
CGI_10008280	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3-like	-1,133
CGI_10024895	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3-like	-1,144
CGI_10000478	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6-like	-0,717
CGI_10017716	neurotrophin receptor-interacting factor 2-like	0,841
CGI_10018119	nicalin isoform X3	0,683
CGI_10022466	nidogen and EGF-like domain-containing 1	-0,618
CGI_10017506	notchless homolog 1-like	0,763
CGI_10023570	nuclear fragile X mental retardation-interacting 1-like	0,682
CGI_10007403	nuclear receptor subfamily 0 group B member 1-like	0,725
CGI_10016539	nucleolar 58 isoform X2	0,619
CGI_10021169	nucleolar RNA helicase 2-like	1,046
CGI_10022148	nucleolar complex 2 homolog	0,589
CGI_10022150	nucleolar complex 2 homolog	0,840
CGI_10017584	organic cation transporter -like	-1,160
CGI_10013618	otopettrin-2-like isoform X3	-0,638
CGI_10020780	p21-activated kinase-interacting 1-like	0,620
CGI_10003800	pancreatic triacylglycerol lipase-like	-0,659
CGI_10001712	paramyosin-like isoform X1	0,880
CGI_10002951	paramyosin-like isoform X1	0,668
CGI_10017559	parathyroid hormone parathyroid hormone-related peptide receptor-like	1,259

CGI_10020628	partial	1,756
CGI_10020629	partial	1,785
CGI_10004704	pentatricopeptide repeat-containing At1g10270	-1,028
CGI_10015817	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform	0,971
CGI_10022015	phosphoenolpyruvate phosphomutase	0,715
CGI_10011818	phosphoglucomutase	-0,784
CGI_10018115	phosphomannomutase 2-like	0,687
CGI_10024520	phosphorylase b kinase gamma catalytic skeletal muscle heart isoform isoform X2	0,749
CGI_10008319	poly [ADP-ribose] polymerase 15-like	-0,616
CGI_10018746	polyenoic fatty acid isomerase-like	1,492
CGI_10011973	porphobilinogen deaminase isoform X2	0,606
CGI_10026351	pre-rRNA processing FTSJ3	0,610
CGI_10009484	pre-rRNA-processing TSR1 homolog	0,559
CGI_10006249	probable 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component mitochondrial	-0,706
CGI_10026326	probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	0,659
CGI_10020527	probable arginine N-methyltransferase 6	0,774
CGI_10011517	probable assembly chaperone of rpl4	0,771
CGI_10004114	probable calcium-binding CML25	0,549
CGI_10019867	probable dimethyladenosine transferase	0,686
CGI_10006932	probable methyltransferase TARBP1	0,931
CGI_10001934	probable rRNA-processing EBP2	0,840
CGI_10006075	proline-rich transmembrane 1-like	0,832
CGI_10027790	prostaglandin E2 receptor EP4 subtype-like	0,958
CGI_10003362	protease inhibitor1	-0,694
CGI_10026193	proto-oncogene c-Fos-like isoform X2	1,220
CGI_10019520	protocadherin Fat 4-like	0,705
CGI_10027377	protocadherin Fat 4-like	0,652
CGI_10004722	ras-related Rab- partial	0,718
CGI_10004361	receptor-type tyrosine- phosphatase T-like	-0,626
CGI_10009582	receptor-type tyrosine- phosphatase alpha-like isoform X4	-0,803
CGI_10004210	receptor-type tyrosine- phosphatase mu-like	-0,744
CGI_10000294	retinaldehyde binding -related	0,748
CGI_10006761	retinoic acid receptor gamma-like isoform X1	0,830
CGI_10011647	retinoid-inducible serine carboxypeptidase-like	-1,204
CGI_10015968	ribonucleo -associated	0,693
CGI_10008100	ribosomal RNA-processing 14-C-like isoform X2	0,588
CGI_10017635	ribosome production factor 2 homolog	0,698
CGI_10021053	rolling stone-like	0,851
CGI_10027502	rootletin-like isoform X7	-0,530
CGI_10005366	runt-related transcription factor 1-like isoform X2	1,189
CGI_10005596	sacsin-like	-0,594
CGI_10017639	serine protease inhibitor dipetalogastin-like	-1,085
CGI_10012652	serine threonine- phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C-like	0,980
CGI_10024784	serine threonine- phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit C-like isoform X4	0,783
CGI_10001333	serine--tRNA cytoplasmic	0,685
CGI_10011273	sex peptide receptor-like	0,694

CGI_10026865	sex peptide receptor-like	1,083
CGI_10009966	short-chain dehydrogenase reductase family 9C member 7-like	0,699
CGI_10003810	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	-0,992
CGI_10009981	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	0,970
CGI_10015185	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	-0,617
CGI_10026568	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1-like	1,260
CGI_10011760	sodium-coupled monocarboxylate transporter 1-like	0,708
CGI_10021520	sodium-dependent multivitamin transporter-like	-0,659
CGI_10019440	sodium-dependent phosphate transport 2B-like	0,671
CGI_10000052	sodium-dependent proline transporter-like	0,816
CGI_10005111	solute carrier family 26 member 6-like	1,283
CGI_10015018	solute carrier family 26 member 6-like	2,619
CGI_10019135	spermine oxidase-like	0,786
CGI_10009824	stAR-related lipid transfer mitochondrial-like	0,712
CGI_10002727	stimulated by retinoic acid gene 6 homolog	0,780
CGI_10003650	substance-K receptor-like	0,814
CGI_10026671	sulfite oxidase-like	1,557
CGI_10012005	suppressor of SWI4 1 homolog	0,647
CGI_10007459	surfeit locus 2	1,489
CGI_10010672	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6	0,693
CGI_10015300	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	0,646
CGI_10004923	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase homolog A	0,667
CGI_10028084	temptin-like	2,125
CGI_10023830	tetraspanin-18-like isoform X1	0,985
CGI_10024557	tetraspanin-18-like isoform X1	0,933
CGI_10004363	tetraspanin-4 isoform X3	0,645
CGI_10000226	tissue inhibitor of metallo ase partial	1,819
CGI_10000389	tissue inhibitor of metalloproteases	1,094
CGI_10007954	titin isoform X2	0,646
CGI_10008376	transcription activator MSS11-like	-0,842
CGI_10005518	transcriptional regulator Erg- partial	1,273
CGI_10004808	transforming growth factor 2 partial	1,191
CGI_10022113	translational activator GCN1-like	0,807
CGI_10015182	transmembrane 2-like	1,836
CGI_10015183	transmembrane 2-like	0,844
CGI_10015914	transmembrane 59-like	-0,658
CGI_10024171	trefoil factor	0,653
CGI_10005120	tripartite motif-containing 2-like	0,820
CGI_10018786	tumor necrosis factor ligand superfamily member 14-like	-0,530
CGI_10001711	tumor necrosis factor receptor superfamily member 27-like	0,803
CGI_10001849	tyramine beta-hydroxylase-like	1,235
CGI_10017107	tyramine beta-hydroxylase-like	1,299
CGI_10017108	tyramine beta-hydroxylase-like	1,240
CGI_10009318	tyrosinase tyr-3	1,347
CGI_10009319	tyrosinase tyr-3	0,758
CGI_10011916	tyrosinase tyr-3	1,593

CGI_10011454	tyrosine- kinase Fer-like	-1,059
CGI_10024204	tyrosine- kinase Fps85D isoform X4	-0,910
CGI_10011806	tyrosine- kinase transmembrane receptor Ror-like	-0,669
CGI_10015199	uncharacterized threonine-rich GPI-anchored glyco -like	-0,625
CGI_10018173	uncharacterized threonine-rich GPI-anchored glyco -like	-0,647
CGI_10015826	uncharacterized transporter slc- -like isoform X1	0,765
CGI_10010456	unconventional myosin-XV	-0,807
CGI_10026946	unhealthy ribosome biogenesis 2 homolog	0,715
CGI_10019991	universal stress A	1,039
CGI_10026164	universal stress A	-0,720
CGI_10019051	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	0,692
CGI_10016372	von Willebrand factor A domain-containing 7-like	-0,631
CGI_10016571	von Willebrand factor A domain-containing 7-like	-0,715
CGI_10003997	von Willebrand factor D and EGF domain-containing -like	-0,841
CGI_10018087	von Willebrand factor D and EGF domain-containing -like	-0,634
CGI_10016016	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1	2,572
CGI_10003960	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	-0,882
CGI_10007171	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	-0,622
CGI_10007172	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	-0,842
CGI_10011269	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like	-0,557
CGI_10014497	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like isoform X2	3,249
CGI_10016017	von Willebrand factor type EGF and pentraxin domain-containing 1-like isoform X2	2,459
CGI_10020696	zinc metallo ase nas-15-like	1,508
CGI_10024789	zinc transporter ZIP1-like	0,905
CGI_10005541	zinc transporter ZIP10-like isoform X1	0,596

Materials and methods

Strains and media

Virulent strains were *V. tasmaniensis* LGP32 (Gay et al 2004a), *V. crassostreae* J2-9 (Lemire et al 2014). Non-virulent strains were *V.sp.* J2-8, close phylogenetic neighbor of the virulent *V. crassostreae* population (Lemire et al 2014) as well as the reference strain LMG20 012T assigned to *V. tasmaniensis*. Vibrio strains were grown in LB NaCl 0,5M agar or on LB NaCl 0,5M at 20°C during 16 h. Strains were engineered to express GFP by introducing the pMRB plasmid (Le Roux et al 2011). Chloramphenicol was added to medium for GFP-expressing vibrios at the concentration of 10µg/ml.

Oysters

Spats from 3 families of diploid *C. gigas* oysters (referred to as Decipher#1, 14 and 15) were produced at the Ifremer hatchery of Argenton, France in the frame of the Decipher project. One additional family of standardized spat from Ifremer (referred to as NSI) was obtained by mass-rearing. All families were tested in experimental infections. Decipher#14 was chosen for RNAseq experiments.

Experimental infection

Experimental infections were performed at 20°C by adapting the procedure previously described (Duperthuy et al 2010). Briefly, oysters were anesthetized for 3h according to the protocol of Suquet *et al.* 2009 (Suquet et al 2009). Groups of 20 juvenile oysters (1.5-2cm) were then distributed into tanks containing 3L of seawater per condition. Stationary phase cultures of bacteria (20h at 20°C) were washed by centrifugation (15min, 1500g, 20°C) and resuspended in sterile sea water (SSW) before injection at 7.5×10^7 CFU in oyster adductor muscle. Mortalities were monitored daily over 7 days. Two tanks were monitored per condition. Statistical analyses were performed using non parametric Kaplan Meier test in order to estimate log-rank values for comparing conditions. All experimental infections were performed according to the Ifremer animal care guidelines and policy.

Histology

Groups of 10 spats (1.5-2cm) were injected with 7.5×10^7 CFU of GFP-expressing LGP32 or J2-9. Groups of 5 spats were injected with 7.5×10^7 CFU of GFP-expressing LMG20 012T or J2-8 (controls). Two non-injected oysters were used as controls. Spats were distributed in 1 tank of 3L of seawater per condition at 20°C. Oysters were sampled and fixed 8 h after injection in seawater Davidson (20% of formaldehyde, 30% of sterile seawater, 10% of glycerol and 30% of 95% ethanol). Histological sections were performed at HISTALIM, Montpellier, France. Briefly, oysters were extracted from the

shell, tissues were dehydrated and included in paraffin with an inclusion automaton. Longitudinal sections were obtained with a microtome. Sections were immunostained with an anti-GFP primary antibody coupled to alkaline phosphatase (Abcam). Revelation was performed with the PA-Red kit (Roche). Sections were scanned with slide scanner Hamamatsu NANOZOOMER. Hemocytes were observed with the microscope ZEISS Z1 with the objective Zeiss 63X/1.4 Plan-Apo Oil.

***In vitro* cytotoxicity assay.**

Hemocytes were plated in 96 well-plates (2×10^5 cell/well) or in 12 well-plates (5×10^5 cell/well) with Transwell Permeable Support with a pore size of 0.4 μm . After 1h, plasma was removed and $5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Sytox Green (Molecular Probes) diluted in 200 μl sterile seawater was added to each well. Vibrios previously washed and opsonized in plasma for 1h were added to the wells at a MOI of 50:1. Sytox fluorescence was monitored (λ_{ex} 480nm/ λ_{em} 550nm) over 15h using a TECAN microplate reader. Maximum cytolysis was determined by adding 0.1% Triton X-100 to hemocytes. To determine the role of phagocytosis in the vibrio-induced cytolysis of hemocytes, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin D was added to the wells 30 min before adding vibrios. Statistical analysis was performed using RM-ANOVA.

Confocal microscopy of interaction between hemocytes and vibrios *in vivo*

Groups of 15 juvenile oysters (4-5 cm) were injected with 1.5×10^8 CFU of GFP-expressing vibrios (either J2-9 or J2-9) washed and resuspended in sterile seawater. Control oysters received an injection of an equal volume of sterile seawater. For each experimental condition, hemolymph was collected from 5 oysters 2h, 4h and 8h after injection. Samples were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and cytospun at 600g for 10 min onto Superfrost glass slide. Glass slides were then washed in PBS and stained with 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Sigma) and $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Phalloïdine-TRITC (Sigma) during 30 min at room temperature. Microscopy was performed using Leica DM 2500 confocal microscope with a Leica 63x ACS APO 1.3 objective.

Transmission electron microscopy of interaction between hemocytes and vibrios *in vivo*

Groups of 7 juvenile oysters (4-5 cm) were injected with 1.5×10^8 CFU vibrios without previous wash. A equal volume of fresh culture medium (LB NaCl 0.5 M) was injected to control oysters. After 2 h and 8 h, the hemolymph of 7 oysters was sampled, pooled and treated with fixation solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in sterile seawater) for 1 h at room temperature, of vibrio. Fixed hemolymph (5ml) was then centrifuged at 1000g for 10 min. The hemocyte pellet was resuspended in 2 ml of fixation solution and keep over night at 4°C. Post-fixation was achieved in 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature in the dark. Excess fixing agents were eliminated during dehydration of samples in a graded series of aqueous solution containing increasing amounts

of ethanol finishing by absolute acetone. Finally, dehydrated samples were embedded in epoxy resin (EmBed 812). Sections (70 nm thick) were stained with uranyl acetate and observed with a Tecnai F20 FEI 200KV transmission electron microscope at MRI platform in Montpellier.

RNAseq experiments

Three independent experimental infections were performed on juvenile oysters from family Decipher#14 as described above. Juvenile oysters were injected with LGP32, LMG20 012T, J2-9, J2-8 or sterile seawater (mock-infected oysters). Non-treated oysters were also sampled in order to compare their transcriptome to the response of oysters to anesthesia and sterile injection of seawater. For each experimental infection and every experimental condition, 30 oysters were sampled 8h after injection (before mortality occurred). Pools of 30 oysters were extracted from shell and immediately frozen in liquid nitrogen. Pools of tissues were ground by bead-beating (Retsch, Mixer Mill MM400) with a stainless steel ball pre-chilled in liquid nitrogen. Oyster powder homogenates were then lysed in 1.6ml Trizol (Life technologies Inc.) and vortexed during 2.5 h at 4°C. Samples were stored at -80°C until RNA extraction.

RNA was extracted with the Direct-Zol RNA Miniprep kit from Proteogene according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were checked with Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific, Les Ulis, France) and the integrity of the RNA was analyzed by capillary electrophoresis with the instrument BioAnalyzer Agilent 2100. RNASeq library construction and sequencing were performed by Fasteris Company (Canada, <https://www.fasteris.com>). Directional cDNA libraries were constructed and sequenced on an illumina Hiseq, in paired-end reads of 2 x75 bp. All data treatment was then carried out under a local galaxy instance (Goecks et al 2010). Phred scores were checked using Fastq-X tool kit (Blankerberg et al 2010) and were higher than 26 over 90% of the read length for all the sequences. All the reads were thus kept for subsequent analyses. Mapping to the *C. gigas* reference genome (assembly version V9, Zhang et al 2012a) was performed using RNAstar (Galaxy Version 2.4.0d-2, Dobin et al 2012). HTSeq-count was used to count the number of reads overlapping annotated genes (mode Union) (Galaxy Version v0.6.1) (Anders et al 2015). Finally, the differential gene expression levels were analyzed with the DESeq2 package (Love et al 2014). Fold changes in gene expression between oysters injected with vibrios and mock-infected oysters were considered significant when the adjusted *P*-value (*P*_{adj}) for multiple testing with the Benjamini-Hochberg procedure which controls false discovery rate (FDR) was < 0.05. The same threshold was applied to fold changes in gene expression between mock-infected oysters and naïve controls.

As *C. gigas* antimicrobial peptides (AMPs) were not present in the *C. gigas* reference genome (assembly version V9, (Zhang et al 2012a), read counts for all AMPs were obtained by alignment using DIAMOND 0.7.9 (Buchfink et al 2015). The AMPs database was prepared using diamond makedb and the reads for each sample/replicate were compared to the database using diamond blastx. Alignments were filtered for the best hit and e-value < 1e-6. Read counts for each AMP were normalized against the total sequence number for each sample/replicate.

Functional Gene Ontology annotation

Blastx comparison against NR database was performed for each set of genes with a maximum number of target hits of 20 and a minimal e-value of 0.001. XML blast result files were loaded onto Blast2GO (Conesa et al. 2005) for GO mapping and annotation with version b2g_sep13 of the B2G database. Functional categories corresponding to significantly modulated genes (331 genes), were then determined manually supported by bibliography. A Heatmap of 3 independent experiments mean of Log₂ fold change was generated using cluster 3.0 (<http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>).

Validation of RNA sequencing by RT-qPCR

Sequencing results were validated by RT-qPCR on the same RNA as those used for deep sequencing (Figure S3 and Table S1). cDNA were synthesized using M-MLV RT (Invitrogen Inc.) with 1 µg of RNA and random primers (250ng). Real-time qPCR was performed on 40ng/µl of cDNA at the qPHd platform of qPCR in Montpellier using the Light-Cycler 480 System (Roche) and using the oyster gene specific primers (Supporting Information Table S1). Relative expression was calculated using the 2- $\Delta\Delta C_q$ method (Pfaffl 2001), with normalization to the *C. gigas* rps6 (GenBank FP004478), C23 (GenBank HS119070) and EF1 (GenBank AB123066).

DNA extraction and specific vibrio quantification by RT-qPCR

Genomic DNA was extracted with the DNA kit Promega (Wizard SV Genomic DNA Purification System) on the same samples used for RNAseq. DNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Real-time qPCR was performed on a Light-Cycler 480 System (Roche) using 40ng/µl of DNA as a template. Strain-specific primers were designed to amplify monocopy genes from specific vibrio genomes (Supporting Information Table S1). Primers were designed with Primer 3 plus (<http://primer3plus.com/>). Efficiency and specificity were checked on DNA extracted from 6 different vibrio strains. To quantify oyster genomes, BPI primers were used (table S2). The vibrio charge in oyster tissues was calculated as a number of vibrio genome copy per number of oyster genome copy. Genome size of oyster and vibrios in provided in table S5.

References

- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31: 166-169.
- Bae YS, Choi MK, Lee WJ (2010). Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis. *Trends Immunol* 31: 278-287.
- Bailey SF, Rodrigue N, Kassen R (2015). The effect of selection environment on the probability of parallel evolution. *Mol Biol Evol* 32: 1436-1448.
- Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S et al (2017). Pseudomonas aeruginosa Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *MBio* 8.
- Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M et al (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 19: Unit 19 10 11-21*.
- Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivresse S, Alunno-Bruscia M et al (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* 11: 1043-1052.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12: 59-60.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
- Destoumieux-Garzon D, Duperthuy M, Vanhove AS, Schmitt P, Wai SN (2014). Resistance to Antimicrobial Peptides in Vibrios. *Antibiotics (Basel)* 3: 540-563.
- Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Romestand B, Caro A, Got P et al (2010). The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* 12: 951-963.
- Duperthuy M, Schmitt P, Garzon E, Caro A, Rosa RD, Le Roux F et al (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2993-2998.
- Fabrice Pernet JB, Patrik Le Gall, Charlotte Corporeau, Lionel Dégremont, Franck Lagarde, Jean-François Pépin, Nicolas Keck (2012). Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *AEI* 2:215-237.
- Gay M, Berthe FC, Le Roux F (2004). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* 59: 49-56.
- Gerdol M, Venier P, Pallavicini A (2015). The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia. *Dev Comp Immunol* 49: 59-71.
- Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 11: R86.
- He X, Zhang Y, Yu F, Yu Z (2011). A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish Shellfish Immunol* 31: 1247-1250.

Jia Z, Zhang T, Jiang S, Wang M, Cheng Q, Sun M et al (2015). An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Dev Comp Immunol* 53: 253-264.

Jiang S, Li H, Zhang D, Zhang H, Wang L, Sun J et al (2015). A C1q domain containing protein from *Crassostrea gigas* serves as pattern recognition receptor and opsonin with high binding affinity to LPS. *Fish Shellfish Immunol* 45: 583-591.

Le Roux F, Davis BM, Waldor MK (2011). Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Res* 39: 1004-1013.

Le Roux F, Wegner KM, Baker-Austin C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C et al (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Front Microbiol* 6: 830.

Le Roux F, Wegner KM, Polz MF (2016). Oysters and *Vibrios* as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends Microbiol* 24: 568-580.

Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B et al (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell* 153: 797-811.

Lemire A, Goudenege D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y et al (2015). Populations, not clones, are the unit of *vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *Isme Journal* 9: 1523-1531.

Li J, Metruccio MME, Evans DJ, Fleiszig SMJ (2017). Mucosal fluid glycoprotein DMBT1 suppresses twitching motility and virulence of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 13: e1006392.

Love MI, Huber W, Anders S (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550.

Oldenburg M, Kruger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A et al (2012). TLR13 Recognizes Bacterial 23S rRNA Devoid of Erythromycin Resistance-Forming Modification. *Science* 337: 1111-1115.

Oyanedel D, Gonzalez R, Flores-Herrera P, Brokordt K, Rosa RD, Mercado L et al (2016). Molecular characterization of an inhibitor of NF-kappaB in the scallop *Argopecten purpuratus*: First insights into its role on antimicrobial peptide regulation in a mollusk. *Fish Shellfish Immunol* 52: 85-93.

Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquacult Env Interac* 3: 257-273.

Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F (2015). *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* 6: 686.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Rosa RD, Santini A, Fievet J, Bulet P, Destoumieux-Garzon D, Bachere E (2011). Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 6: e25594.

Rosenstiel P, Sina C, End C, Renner M, Lyer S, Till A et al (2007). Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178: 8203-8211.

Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, de Lorgeril J, Bachere E, Destoumieux-Garzon D (2012). The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* 3: 160.

Suquet M, GdK, Ricardo Gonzalez Araya, Isabelle Queau, Luc Lebrun, Pierrick Le Souchu and Christian Mingant (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* 22 (2009) 29-34.

Takemura AF, Chien DM, Polz MF (2014). Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol* 5: 38.

Vanhove AS, Duperthuy M, Charriere GM, Le Roux F, Goudenege D, Gourbal B et al (2015). Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* 17: 1152-1165.

Vanhove AS, Rubio TP, Nguyen AN, Lemire A, Roche D, Nicod J et al (2016). Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ Microbiol* 18: 875-888.

Wang B, Kundu M (2017). Canonical and noncanonical functions of ULK/Atg1. *Curr Opin Cell Biol* 45: 47-54.

Wang R, Zhong Y, Gu X, Yuan J, Saeed AF, Wang S (2015). The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol* 6: 144.

Yang HT, Yang MC, Sun JJ, Shi XZ, Zhao XF, Wang JX (2016). Dual oxidases participate in the regulation of intestinal microbiotic homeostasis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol* 59: 153-163.

Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F et al (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490: 49-54.

Zhang L, Li L, Guo X, Litman GW, Dishaw LJ, Zhang G (2015). Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep* 5: 8693.

Zhao LL, Wang YQ, Dai YJ, Zhao LJ, Qin Q, Lin L et al (2016). A novel C-type lectin with four CRDs is involved in the regulation of antimicrobial peptide gene expression in *Hyriopsis cumingii*. *Fish Shellfish Immunol* 55: 339-347.

Résultats complémentaires

Caractérisation du tropisme tissulaire des *V. crassostreae* par imagerie intravitale.

L'un des objectifs de ma thèse était de déterminer le tropisme tissulaire des vibrios, leur(s) voie(s) d'entrée et les dégâts causés aux tissus. Ceci demande le développement de protocoles d'infection non invasifs, respectueux des voies naturelles qui jusqu'ici n'ont pas permis d'induire des mortalités. En effet, divers essais d'infections expérimentales réalisés au laboratoire utilisant non pas l'injection mais la balnéation sont restés infructueux. Toutefois, dans le cadre de la thèse de Marylise Duperthuy (2010) puis du Master 1 de Maeva Grassi (2016) que j'ai co-encadré pour son stage, nous avons pu montrer que les vibrios accédaient rapidement à l'hémolymphe en balnéation (Figure 25). Ceci m'a conduit à tenter divers développements pour caractériser les voies d'entrées et la cinétique d'invasion des tissus par les *Vibrio splendidus* pathogènes d'huître.

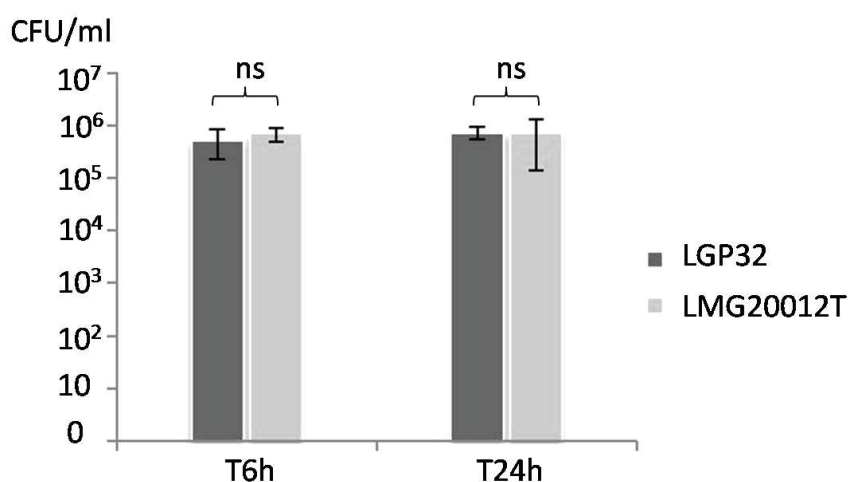


Figure 25 | Quantification des *Vibrio tasmaniensis* LGP32 et LMG20 012T dans l'hémolymphe des huîtres après 6 heures et 24 heures de balnéation.

Dénombrement de *V. tasmaniensis* LGP32 (bleu) et LMG20 012T (jaune) cultivable (CFU/ml) dans l'hémolymphe des huîtres. Dans trois expériences indépendantes, des lots de 10 huîtres sont balnées avec les souches *V. tasmaniensis* LGP32 ou *V. tasmaniensis* LGM20 012T (10^7 CFU/ml d'eau de mer) pendant 6 heures (T6h) et 24 heures (T24h) puis l'hémolymphe est prélevée. Pour chaque lot, les hémolymphe sont regroupées et un aliquot est étalé sur milieu Zobell + Chloramphénicol [10 μ g/ml] en triplicats. Les CFU sont comptés après une incubation de 48h à 20°C. Une analyse statistique est réalisée, Test non paramétrique de Kuskal-Wallis + test de comparaison multiple de Dunn's.

La méthode sur laquelle j'ai le plus travaillé est le suivi de la progression de pathogènes dans des hôtes vivants par microscopie intravitale en fluorescence. Ce type d'approche a été utilisé chez différentes espèces modèles comme la souris (Millet et al. 2014), ou le poisson zèbre pour suivre des pathogènes (Gratacap and Wheeler 2014) et notamment des vibrios (Millet et al. 2014) (Dubert et al.

2016). En effet, l'imagerie intravitale confocale ou bi-photonique a permis de montrer que *V. cholerae* est restreint aux cryptes dans la partie proximale du petit intestin contrairement à la partie distale où il n'est pas cantonné aux cryptes (Millet et al. 2014). Chez les invertébrés, la cinétique d'infection de la larve de palourde par *V. tubiashii subsp. europaensis* a pu être suivie sur des animaux vivants en microscopie (Dubert et al. 2016). Ce type d'approche n'a jamais été réalisé chez l'huître, néanmoins une telle approche permettrait d'obtenir des informations détaillées de la cinétique de colonisation de l'hôte par les pathogènes, c'est pourquoi nous avons essayé de mettre au point une technique d'imagerie intravitale pour suivre les *V. tasmaniensis* et les *V. crassostreae* tout au long de l'infection. Nous avons donc adapté le protocole utilisé chez le poisson zèbre dans l'espoir d'observer les vibrios dans des tissus vivants.

Pour la mise au point, nous avons choisi de travailler avec des doses importantes de vibrios. Pour cela, l'huître a été injectée avec des vibrios exprimant la GFP puis elle est décoquillée 12h après l'injection, le plus délicatement possible pour éviter de créer des lésions. L'animal a été placé dans une goutte d'eau de mer stérile au milieu d'une boîte fluorodish avec un fond en verre spécialement conçu pour la microscopie. L'huître a ensuite été maintenue immobile en milieu d'eau de mer stérile et d'agar low-melting à 0.7%. La concentration en agar permet le maintien de l'animal tout en le conservant vivant. Après observation au microscope, nous avons pu constater que les tissus restaient vivants pendant plus de 24h (les cellules ciliées bougent encore ainsi que les muscles du manteau) après la sortie de l'huître de sa coquille. Toutefois, l'observation des tissus s'est montrée difficile étant donné l'épaisseur trop importante des individus. C'est pourquoi une étape de marquage au bleu d'Evans a été ajoutée avant le décoquillage afin de pouvoir observer les tissus en bi-photons.

Les résultats obtenus ont indiqué que le bleu d'Evans permettait le marquage des tissus (fluorescence rouge) mais ne semblait pas inhiber leur mobilité. Toutefois, le marquage s'est révélé hétérogène selon les individus. Chez une huître injectée avec le *Vibrio crassostreae* LGP8 exprimant le GFP (fluorescence verte), nous avons pu observer une colonisation de la branchie, du manteau et du sinus (Figure 26). La glande digestive et l'intestin n'ont pas pu être observés car l'épaisseur de l'huître est trop importante même en fluorescence avec le biphoton. Les tentatives de balnéation ont malheureusement échouées.

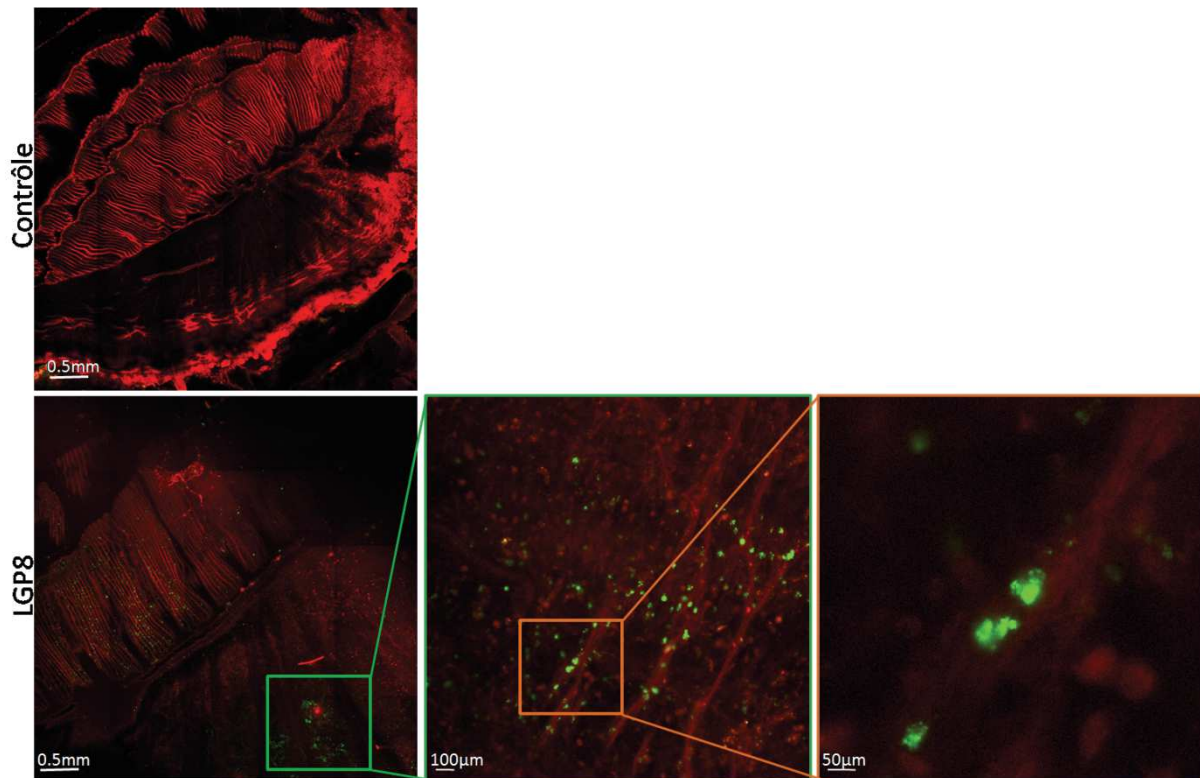


Figure 26 | Imagerie intravivale d'une huître infectée avec *V. crassostreae* LGP8.

Une huître (1 cm) a été injectée avec 3×10^7 CFU de *V. crassostreae* LGP8 exprimant la GFP. Les tissus ont été marqués 12 heures par baignade de l'huître dans de l'eau de mer 1% bleu d'Evans. Ensuite l'animal est sorti de sa coquille 24 heures après l'injection. Il est placé dans une boîte fluorodish avec de l'agar low melting eau de mer 0,7%. Les images ont été réalisées avec un biphoton. Les images d'huîtres entières représentent une mosaïque de différents champs d'observation avec un overlap de 10%. L'observation au biphoton montre que la branchie et le manteau sont colonisés par LGP8 16 heures après l'injection.

Identification de facteurs de cytotoxicité potentiels par génomique comparative

Au cours de cette thèse, nous avons montré que les *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* sont cytotoxiques pour les hémocytes de l'huître et que cette cytotoxicité apparaît comme un déterminant majeur de la virulence. De plus, nous avons montré que les mécanismes de cytotoxicité mis en jeu sont différents chez les deux souches. A ce jour, des déterminants de la virulence ont été décrits en infections expérimentales. Ceux-ci diffèrent entre les deux souches étudiées. Nous savons par exemple que le gène R5-7 est nécessaire à la virulence de J2-9 (Lemire et al. 2014) mais il est absent du génome de LGP32. De même, la porine OmpU nécessaire à la phagocytose et à la cytotoxicité intracellulaire de LGP32 (Duperthuy et al. 2011), ne semble pas être un candidat majeur de la cytotoxicité de J2-9 qui elle, s'exprime indépendamment de la phagocytose. Au-delà de ces déterminants majeurs de la virulence, nos travaux ont montré que des antioxydants (SOD) et détoxifiants (pompes à efflux des métaux) jouent un rôle important dans la survie de LGP32 chez son hôte et sa virulence en infections expérimentales. C'est particulièrement le cas de la P-ATPase CopA

(Vanhove et al. 2016). Celle-ci joue également un rôle important dans la survie de J2-9 chez l'huître (Le Roux et al., communication personnelle), suggérant que la tolérance aux métaux est un déterminant majeur dans l'adaptation des vibrios à l'hôte *C. gigas*.

De manière surprenante, aucun gène impliqué directement dans le mode d'action de l'activité cytotoxique de LGP32 ou de J2-9 n'a été identifié jusqu'à présent. C'est pourquoi nous avons réalisé une analyse de génomique comparative dans le but d'identifier les protéases, les phospholipases, les hémolysines et les systèmes de sécrétion présents dans les génomes des souches virulentes et non virulentes. En effet, de nombreuses études ont montré que ces molécules sont impliquées non seulement dans la cytotoxicité des vibrios mais également dans leur virulence comme par exemple chez *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* (Naka et al. 1995, Ishihara et al. 2002, Sikora et al. 2011, Miyoshi 2013, Song et al. 2016). Le rôle des systèmes de sécrétion a également été clairement démontré notamment celui du T2SS, T3SS et T6SS chez *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* (Sikora et al. 2011, Zhang et al. 2012b, Sikora 2013, Santos et al. 2017).

La comparaison des génomes a été réalisée en utilisant les outils de la base de données MAGE du génoscope. L'ensemble des enzymes hydrolytiques et des TSS ont été répertoriés chez les 2 souches virulentes (LGP32 et J2-9) et les 2 souches non virulentes (LMG20012T et J2-8). Dans le génome de *V. tamaniensis* LGP32, on trouve 5 gènes qui codent des hémolysines, 5 qui codent des phospholipases et 28 autres qui codent des protéases. Parmi ces gènes, il a 2 hémolysines, 2 phospholipases et 13 protéases présentes spécifiquement chez LGP32. Notons que les 2 hémolysines correspondent à des gènes codant potentiellement pour une hémolysine de type RTX (VS_1394)(Repeats-in-toxin) et une hémolysine de type LDH (VS_II0201)(Lecithin-dependent hemolysin). Le génome de LGP32 code également pour plusieurs systèmes de sécrétion (TSS) notamment un T1SS (2 gènes), un T6SS (2 gènes) et un T2SS (8 gènes).

De manière remarquable, nous avons montré que l'expression de certains de ces effecteurs est fortement modulée dans les stades intracellulaires de LGP32. Notamment la phospholipase VS_II0149 et la métalloprotéase PrtV/InhA (VS_II1062) sont très fortement induites dans les stades intracellulaires de LGP32. A l'inverse, la métalloprotéase Vsm (VS_II1062) est fortement réprimée (Section A: Table S1). Nous avons donc entrepris de caractériser le rôle de ces effecteurs dans la virulence de LGP32. Nos résultats montrent que seule la perte de PrtV/inhA induit une diminution partielle de la cytotoxicité de LGP32 (Figure 27, A). Malheureusement, les mutants pour les deux métalloprotéases n'ont pas montré de phénotype en infection expérimentale (Binesse et al. 2008). Nous avons construit également un mutant pour la phospholipase VS_II0149 mais contrairement à nos attentes, cette mutation s'est révélée favorable à la cytotoxicité de LGP32 sur les hémocytes, ce

qui ne nous a pas amenés plus loin dans la caractérisation de ce mutant, même si ce phénotype reste complexe à interpréter (Figure 27, B).

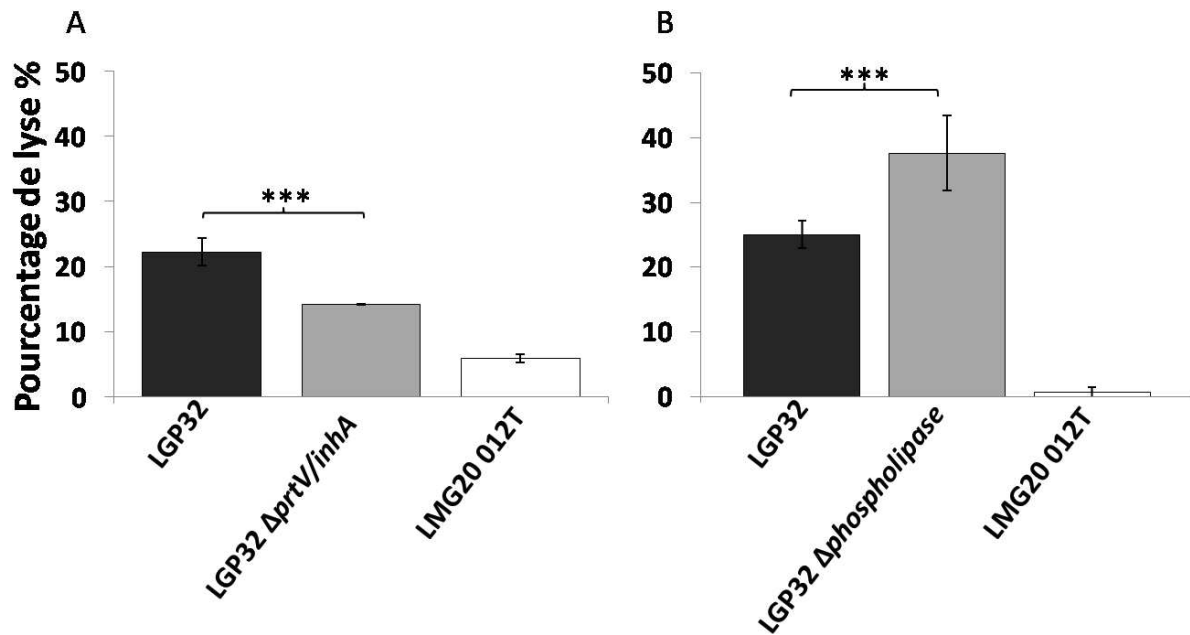


Figure 27 | Cytotoxicité des mutants LGP32 Δ phospholipase (VS_II0149) et Δ prtV/inhA (VS_II062).

Les histogrammes représentent le maximum de cytotoxicité des vibrios en pourcentage de lyse d'hémocytes par mesure de la fluorescence du sytox green. En noir sont représentés la cytotoxicité des souches LGP32 et LMG20 012T et les histogrammes gris représente la mesure de la cytotoxicité des mutants (A)LGP32 Δ prtV/inhA et (B)LGP32 Δ phospholipase. Les barres d'erreurs représentent l'écart type du triplicat technique. La mutation induit une baisse significative de la cytotoxicité de LGP32 Δ prtV/inhA et une augmentation significative de la cytotoxicité de LGP32 Δ phospholipase. (RM-ANOVA p-value<0.001).

Concernant J2-9, les gènes candidats à la virulence incluent 6 gènes codant des hémolysines, 2 codant des toxines RTX, 6 codant des phospholipases et 28 codant des protéases. A l'inverse, on retrouve 6 protéases spécifiquement présentes chez *V. crassostreae* J2-9. Dans ces gènes, les protéases sont majoritairement des protéases à sérine (4 gènes : VCR9J2_760131, VCR9J2_900099, VCR9J2_900099, VCR9J2_990025). En outre, *V. crassostreae* J2-9 possède des éléments d'un T1SS (12 gènes), d'un T2SS (15 gènes), d'un T4SS (19 gènes) et d'un T6SS (21 gènes). Récemment, il a été montré que les gènes codant pour le T4SS et le T6SS sont présent sur le plasmide pGV1512 (Bruto et al. 2017).

De manière remarquable, le nombre de gènes codant des hémolysines, des phospholipases et des protéases est équivalent chez les souches non virulentes LMG20 012T (Hémolysines : 6 gènes, Phospholipases : 3 gènes, Protéases : 27 gènes) et J2-8 (Hémolysines : 6 gènes, Toxines RTX : 2 gènes Phospholipases : 8 gènes, Protéases : 29 gènes).

Tableau 2 | Gènes codant pour des hémolysines, phospholipases, protéases et systèmes de sécrétion chez LGP32, LMG20 012T, J2-9 et J2-8.

Comparaison réalisée sur le site MAGE du génoscope à partir des génomes des souches *V. tasmaniensis* LGP32, *V. tasmaniensis* LMG20 012T, *V. crassostreae* J2-9 et *V. sp.* J2-8.

Nom et identifiant du gène	Souches
Hémolysines	
Conserved hypothetical protein; Putative hemolysin-type calcium-binding region	
VCR8J2v1_70001	J2-8
VS_1240	LGP32
Hemolysin	
VCR8J2v1_460007	J2-8
VCR9J2v1_800035	J2-9
VTAS012_v1_60159	LMG20012T
Hemolysin III	
VCR8J2v1_20019	J2-8
VCR9J2v1_130018	J2-9
VS_3133	LGP32
Hemolysin VIIY	
VTAS012_v1_10242	LMG20012T
Putative hemolysin	
VCR8J2v1_30122	J2-8
VCR9J2v1_1600017, VCR9J2v1_720001	J2-9
VS_2797	LGP32
VTAS012_v1_220075	LMG20012T
Putative Hemolysin related protein	
VCR8J2v1_250349	J2-8
VCR9J2v1_700112	J2-9
Putative hemolysin, inner membrane subunit	
VTAS012_v1_230018	LMG20012T
Putative hemolysin-type calcium-binding region (fragment)	
VTAS012_v1_1130001	LMG20012T
Putative hemolysin-type RTX toxin	
VS_1394	LGP32
Putative RTX toxin	
VCR9J2v1_700001	J2-9
VCR8J2v1_560066	J2-8
VCR8J2v1_830041	J2-8

VS_II0512	LGP32
Putative RTX toxin (fragment)	
VCR9J2v1_920001	J2-9
Thermolabile hemolysin	
VCR8J2v1_190414	J2-8
VCR9J2v1_1330127	J2-9
VTAS012_v1_470009	LMG20012T
Thermolabile hemolysin precursor (TL)-(Lecithin-dependent hemolysin) (LDH)	
VS_II0201	LGP32
Phospholipases	
Putative Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase	
VCR9J2v1_50066	J2-9
Lysophospholipase	
VS_3037	LGP32
VTAS012_v1_300026	LMG20012T
Lysophospholipase L2	
VCR8J2v1_500020	J2-8
VCR9J2v1_1630019	J2-9
Phospholipase	
VS_II0149	LGP32
VTAS012_v1_10363	LMG20012T
Putative Acyl transferase/acyl hydrolase/lysophospholipase	
VCR8J2v1_190357, VCR8J2v1_850234, VCR8J2v1_890018	J2-8
VCR9J2v1_1330068	J2-9
Putative outer membrane lysophospholipase patatin-like	
VCR8J2v1_250314	J2-8
VCR9J2v1_700147	J2-9
Putative outer membrane phospholipase A	
VCR8J2v1_830033	J2-8
Putative phospholipase C precursor	
VCR8J2v1_240189	J2-8
VCR9J2v1_720311	J2-9
VS_1708	LGP32
Putative phospholipase D	
VCR9J2v1_1330003	J2-9
VCR8J2v1_190301	J2-8

VS_II0107	LGP32
VTAS012_v1_10330	LMG20012T
Putative phospholipase protein	
VS_1644	LGP32
Protéases	
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX	
VS_2204	LGP32
Putative serine protease	
VS_0879	LGP32
Aminoacyl-histidine dipeptidase	
VS_2422	LGP32
ATP-binding protease component	
VTAS012_v1_100001	LMG20012T
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	
VTAS012_v1_240031	LMG20012T
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA	
VCR8J2v1_490040	J2-8
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX	
VCR8J2v1_510025	J2-8
VCR9J2v1_760148	J2-9
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	
VCR8J2v1_510026	J2-8
VCR9J2v1_760147	J2-9
VS_2205	LGP32
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (Endopeptidase Clp) (Caseinolytic protease) (Protease Ti) (Heat shock protein F21.5)	
VTAS012_v1_240030	LMG20012T
ATP-dependent hsl protease ATP-binding subunit hslU	
VCR8J2v1_30070	J2-8
VCR9J2v1_1600069	J2-9
VS_2902	LGP32
ATP-dependent Lon protease	
VS_2203	LGP32
ATP-dependent protease hslV	
VCR8J2v1_30069	J2-8
VCR9J2v1_1600070	J2-9
VS_2901	LGP32

ATP-dependent protease La	
VCR8J2v1_510024	J2-8
VCR9J2v1_760149	J2-9
ATP-dependent protease LA-related	
VS_II1375	LGP32
Carboxy-terminal protease for penicillin-binding protein 3	
VTAS012_v1_340006	LMG20012T
Cell division protease ftsH	
VCR8J2v1_250278	J2-8
VCR9J2v1_700181	J2-9
Collagenase and related protease	
VCR8J2v1_240345	J2-8
VCR9J2v1_720153	J2-9
VS_1567	LGP32
Conserved hypothetical protein carrying homologs of Site-2 protease domain	
VCR8J2v1_450010	J2-8
DNA-binding ATP-dependent protease La	
VTAS012_v1_240032	LMG20012T
Extracellular zinc metalloprotease	
VCR8J2v1_70052	J2-8
VCR9J2v1_180068	J2-9
VS_1267	LGP32
High frequency lysogenization protein hfID	
VCR8J2v1_850116	J2-8
Hypothetical metalloprotease	
VCR8J2v1_50225	J2-8
VCR9J2v1_170022	J2-9
VS_II0424	LGP32
Modulator for HflB protease specific for phage lambda cII repressor	
VTAS012_v1_370009, VTAS012_v1_370010	LMG20012T
Molecular chaperone and ATPase component of HslUV protease	
VTAS012_v1_170023	LMG20012T
Multifunctional acyl-CoA thioesterase I and protease I and lysophospholipase L1	
VTAS012_v1_160020	LMG20012T
Peptidase component of the HslUV protease	
VTAS012_v1_170024	LMG20012T

Predicted ATP-dependent protease	
VTAS012_v1_10103	LMG20012T
Predicted ATP-dependent serine protease	
VS_2456	LGP32
Probable protease htpX homolog	
VS_2035	LGP32
Proline iminopeptidase	
VCR8J2v1_190791	J2-8
VCR9J2v1_60110	J2-9
Prolyl endopeptidase	
VCR8J2v1_550043	J2-8
Protease	
VCR8J2v1_50275	J2-8
VCR9J2v1_150006	J2-9
VTAS012_v1_80038	LMG20012T
Protease 2	
VTAS012_v1_100017	LMG20012T
Protease degS	
VCR8J2v1_860115	J2-8
VCR9J2v1_70089	J2-9
Protease do	
VCR8J2v1_860116	J2-8
VCR9J2v1_70088	J2-9
Protease II (Oligopeptidase B)	
VCR8J2v1_490024	J2-8
VS_1060	LGP32
Protease IV (Endopeptidase IV)	
VS_0937	LGP32
Protease IV (signal peptide peptidase)	
VCR8J2v1_220073	J2-8
VCR9J2v1_710033	J2-9
VTAS012_v1_210039	LMG20012T
Protease, ATP-dependent zinc-metallo	
VTAS012_v1_80023	LMG20012T
Protein pmbA	
VCR8J2v1_460038	J2-8
VCR9J2v1_1580042	J2-9

Putative ATP-dependent Lon protease	
VS_0152	LGP32
VTAS012_v1_110005	LMG20012T
Putative ATP-dependent protease	
VCR8J2v1_240502, VCR8J2v1_550019	J2-8
VCR9J2v1_720041, VCR9J2v1_730232	J2-9
Putative collagenase family protease	
VTAS012_v1_30099	LMG20012T
Putative Flp pilus assembly protein, protease CpaA (Type IV prepilin peptidase)	
VS_2446	LGP32
Putative INSULIN-DEGRADING ENZYME (INSULIN PROTEASE)	
VCR8J2v1_510054	J2-8
VCR9J2v1_760119	J2-9
Putative intracellular protease/amidase	
VCR9J2v1_920032	J2-9
Putative intramembrane serine protease	
VTAS012_v1_300005	LMG20012T
Putative M50 family membrane-associated zinc metalloprotease	
VTAS012_v1_160035	LMG20012T
Putative M50 family membrane-associated zinc metalloprotease precursor	
VS_II0772	LGP32
Putative M6 secreted metalloprotease precursor PrtV	
VS_II1062	LGP32
Putative Oligoendopeptidase F	
VCR8J2v1_190543	J2-8
Putative protease	
VS_2474, VS_2565	LGP32
VTAS012_v1_540006	LMG20012T
Putative protease (zinc in catalytic domain) with proprotein convertase P-domain	
VCR9J2v1_1330132	J2-9
Putative protease La homolog	
VS_1430	LGP32
VTAS012_v1_530008	LMG20012T
Putative protease, membrane anchored	
VTAS012_v1_450013	LMG20012T
Putative serine protease	

VCR9J2v1_760131	J2-9
Putative SI family secreted trypsin-like serine protease	
VS_II0815	LGP32
Putative trypsin protease	
VCR9J2v1_80059	J2-9
Putative trypsin protease (exported)	
VCR9J2v1_900099	J2-9
Putative trypsin-like serine protease	
VCR8J2v1_450056	J2-8
VCR9J2v1_60021	J2-9
Regulator of sigma E protease	
VCR8J2v1_250110	J2-8
Secreted trypsin-like serine protease	
VCR9J2v1_990025	J2-9
serine endoprotease, periplasmic	
VTAS012_v1_20061, VTAS012_v1_20062	LMG20012T
Similar to Putative protease	
VS_2473	LGP32
Stringent starvation protein SspB; ClpXP protease specificity-enhancing factor	
VS_0435	LGP32
Tail-specific protease	
VCR8J2v1_240516	J2-8
VCR9J2v1_720026	J2-9
Tail-specific protease precursor	
VS_1417	LGP32
Zinc metallopeptidase	
VTAS012_v1_40021	LMG20012T
Zinc metalloprotease	
VCR8J2v1_190182	J2-8
VCR9J2v1_730025	J2-9
Zinc protease	
VS_II1486	LGP32
VTAS012_v1_10218	LMG20012T
Zn-dependent protease	
VCR8J2v1_190088	J2-8
VCR9J2v1_730122	J2-9

VS_II1485	LGP32
VTAS012_v1_10217	LMG20012T
T1SS	
Prolipoprotein signal peptidase (signal peptidase II)	
VTAS012_v1_20155	LMG20012T
Putative ATPase, type I secretion system (ABC TRANSPORTER, TOXIN SECRETION (HEMOLYSIN B))	
VCR8J2v1_190142	J2-8
VCR9J2v1_730074	J2-9
Putative HlyD-like secretion protein	
VCR8J2v1_850190, VCR8J2v1_860069	J2-8
VCR9J2v1_10069, VCR9J2v1_70134	J2-9
Putative Secretion protein HlyD	
VCR8J2v1_190567 VCR8J2v1_60037 VCR8J2v1_850069 VCR8J2v1_850070 VCR8J2v1_850328	J2-8
VCR9J2v1_10190 VCR9J2v1_10191 VCR9J2v1_1350072 VCR9J2v1_1360036	J2-9
VS_1988	LGP32
Putative toxin secretion ABC transporter (HlyB)	
VCR9J2v1_80034	J2-9
Putative toxin secretion protein (HlyD)	
VCR9J2v1_80035	J2-9
Putative Type I secretion membrane fusion protein, HlyD	
VCR8J2v1_190145	J2-8
VCR9J2v1_730071	J2-9
Putative Type I secretion outer membrane protein, TolC	
VCR8J2v1_850002 VCR8J2v1_870046	J2-8
VCR9J2v1_180002 VCR9J2v1_960111	J2-9
Putative type I secretion protein, HlyD family	
VTAS012_v1_100020	LMG20012T
Putative type I secretion system, ATP-binding protein	
VTAS012_v1_100019	LMG20012T
Secretion protein HlyD family protein	
VCR8J2v1_850294	J2-8
Secretion protein, HlyD family	
VS_II0008	LGP32
VTAS012_v1_200062	LMG20012T
Secretion protein, HlyD family protein	
VTAS012_v1_10281	LMG20012T
Type I secretion outer membrane , TolC family protein	

T2SS**General secretion pathway protein A**

VCR8J2v1_860098	J2-8
VCR9J2v1_70105	J2-9
VS_0409	LGP32
VTAS012_v1_20045	LMG20012T

General secretion pathway protein C

VCR8J2v1_40072	J2-8
VCR9J2v1_20154	J2-9

General secretion pathway protein D

VCR8J2v1_40073	J2-8
VCR9J2v1_20153	J2-9

General secretion pathway protein E

VCR8J2v1_40074	J2-8
VCR9J2v1_20152	J2-9

General secretion pathway protein F

VCR8J2v1_40075	J2-8
VCR9J2v1_20151	J2-9

General secretion pathway protein G

VCR8J2v1_40076	J2-8
VCR9J2v1_20150	J2-9

General secretion pathway protein H

VCR8J2v1_40077	J2-8
VCR9J2v1_20149	J2-9

General secretion pathway protein I

VCR8J2v1_40078	J2-8
VCR9J2v1_20148	J2-9

General secretion pathway protein J

VCR8J2v1_40079	J2-8
VCR9J2v1_20147	J2-9

General secretion pathway protein K

VCR8J2v1_40080	J2-8
VCR9J2v1_20146	J2-9

General secretion pathway protein L

VCR8J2v1_40081	J2-8
VCR9J2v1_20145	J2-9

General secretion pathway protein M

VCR8J2v1_40082	J2-8
VCR9J2v1_20144	J2-9
VS_0144	LGP32

General secretion pathway protein N

VCR8J2v1_40083	J2-8
VCR9J2v1_20143	J2-9

Pseudopilin, cryptic, general secretion pathway

VTAS012_v1_110018	LMG20012T
Putative bacterial type II secretion system protein D; rcpA, CpaC	
VS_0019	LGP32
Putative bacterial type II secretion system protein E, TadA, CpaF	
VS_0022	LGP32
Putative bacterial type II secretion system protein, TadC-like protein	
VS_0024	LGP32
Putative bacterial type II secretion system, protein F, TadB	
VS_0023	LGP32
Putative general secretion pathway protein A	
VS_0408	LGP32
VTAS012_v1_20044	LMG20012T
Putative type II/IV secretion system family protein	
VCR9J2v1_80048	J2-9
Putative Type II-IV secretion protein	
VCR9J2v1_80066	J2-9
Type II secretion system protein C	
VTAS012_v1_110022	LMG20012T
Type II secretion system protein H	
VTAS012_v1_110017	LMG20012T
Type II secretion system protein I	
VTAS012_v1_110016	LMG20012T
Type II secretion system protein K	
VTAS012_v1_110014	LMG20012T
Type II secretion system protein L	
VTAS012_v1_110013	LMG20012T
Type II secretion system protein M	
VTAS012_v1_110012	LMG20012T
Type II secretion system protein N	
VS_0145	LGP32
VTAS012_v1_110011	LMG20012T
T4SS	
putative Flp pilus assembly protein, pilin Flp	
VCR9J2v1_700223	J2-9
VCR8J2v1_250234	J2-8
Putative Flp pilus assembly protein, protease CpaA (Type IV prepilin peptidase)	
VS_2446	LGP32
Putative Flp pilus assembly pseudopilin TadE	
VCR9J2v1_130075	J2-9
VCR9J2v1_700031	J2-9
VCR9J2v1_720248	J2-9
Putative Flp pilus assembly pseudopilin TadF	
VCR9J2v1_130075	J2-9
VCR9J2v1_700032	J2-9
VCR9J2v1_720249	J2-9
Putative MSHA pilin protein MshC	

VCR8J2v1_860023	J2-8
VCR9J2v1_70180	J2-9
VTAS012_v1_290022	LMG20 012T
Putative MSHA pilin protein MshD	
VCR8J2v1_860024	J2-8
VCR9J2v1_70179	J2-9
Putative pilin	
VS_2447	LGP32
Putative pilin Flp	
VCR9J2v1_130064	J2-9
VCR9J2v1_700041	J2-9
VCR9J2v1_720259	J2-9
Putative prepilin leader peptidase	
VS_0017	LGP32
Putative prepilin leader peptidase TadV/CpaA	
VCR9J2v1_130065	J2-9
VCR9J2v1_700042	J2-9
VCR9J2v1_720258	J2-9
Putative type IV pilin	
VCR8J2v1_840087	J2-8
VS_0654	LGP32
VS_0657	LGP32
VTAS012_v1_40116	LMG20012T
VTAS012_v1_40119	LMG20012T
Putative type IV pilin PilA	
VCR9J2v1_900101	J2-9
Putative V10 pilin	
VCR8J2v1_820014	J2-8
Type IV pilin assembly protein	
VS_2548	LGP32
Type IV pilin assembly protein pilC	
VCR8J2v1_250338	J2-8
VCR9J2v1_700123	J2-9
VS_2549	LGP32
VTAS012_v1_270038	LMG20012T
Type IV pilus assembly protein tapB	
VCR8J2v1_250337	J2-8
VCR9J2v1_700124	J2-9
Type IV prepilin-like proteins leader peptide processing enzyme	
VS_2550	LGP32
T6SS	
Putative type VI secretion protein VasA-1	
VCR9J2v1_750060	J2-9
Putative type VI secretion protein VasB-1	
VCR9J2v1_750061	J2-9
Putative type VI secretion protein VasC-1 (VtsE)	

VCR9J2v1_750067	J2-9
Putative type VI secretion protein VasD-1 (VtsF)	
VCR9J2v1_750068	J2-9
Putative type VI secretion protein VasE-1 (VtsG)	
VCR9J2v1_750069	J2-9
Putative type VI secretion protein VasF-1 (VtsH)	
VCR9J2v1_750070	J2-9
Putative type VI secretion protein VasJ-1	
VCR9J2v1_750054	J2-9
Putative type VI secretion protein VasK-1 (VtsI)	
VCR9J2v1_750071	J2-9
Putative type VI secretion protein VasQ-1	
VCR9J2v1_750056	J2-9
Putative type VI secretion protein VasRA-1	
VCR9J2v1_750057	J2-9
Putative type VI secretion protein VasRB-1	
VCR9J2v1_750058	J2-9
Putative type VI secretion protein VasS-1	
VCR9J2v1_750059	J2-9
Putative type VI secretion protein VasV-1	
VCR9J2v1_750051	J2-9
Putative type VI secretion protein VasX-1	
VCR9J2v1_750072	J2-9
Putative type VI secretion protein VgrG	
VCR9J2v1_750053	J2-9
Putative type VI secretion protein VtsA	
VCR9J2v1_750063	J2-9
Putative type VI secretion protein VtsB	
VCR9J2v1_750064	J2-9
Putative type VI secretion protein VtsC	
VCR9J2v1_750065	J2-9
Putative type VI secretion protein VtsD	
VCR9J2v1_750066	J2-9
Putative type VI secretion protein, hemolysin-coregulated protein (Hcp)	
VCR9J2v1_750055	J2-9
Type VI secretion protein VasG (ClpV1)	
VCR9J2v1_750062	J2-9
Type VI Secretion System, VasF	
VS_II0985	LGP32
Type VI secretion system; VasA	
VS_II0994	LGP32

Rôle de la protéine R5-7 dans la cytotoxicité de *V. crassostreae* J2-9.

Dans le cadre d'une collaboration avec Yannick Labreuche du laboratoire de biologie intégrative des organismes marins à la station biologique de Roscoff, nous avons eu l'opportunité d'étudier le rôle du gène *R5-7* (VRSK9J2v1_730268) dans la cytotoxicité de J2-9 envers les hémocytes. Lors de précédents travaux, Yannick Labreuche et ses collaborateurs ont montré que le gène *R5-7* code pour une protéine de 798 acides aminés avec un poids théorique de 89kDa. Aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié. Il a été montré que le gène *R5-7* est nécessaire à la virulence de *V. crassostreae* J2-9 (Lemire et al. 2014). C'est pourquoi nous avons souhaité caractériser son rôle dans la cytotoxicité. Nos résultats révèlent que le mutant J2-9 $\Delta R5-7$ est significativement moins cytotoxique que la souche sauvage J2-9 (Figure 28). Nous avons ensuite injecté dans des huîtres juvéniles les souches *V. crassostreae* J2-9, *V. crassostreae* J2-9 $\Delta R5-7$ et *V. sp.* J2-8 avec ou sans la protéine R5-7 purifiée et couplée à la GFP. L'hémolymphe a été prélevée et colorée avant d'être observée au microscope confocal. Nous avons constaté que le mutant est phagocyté dès 2 heures contrairement à la souche sauvage. L'ajout de la protéine R5-7 restaure le phénotype sauvage du mutant $\Delta R5-7$ et inhibe la phagocytose de la souche non virulente et non cytotoxique J2-8. La protéine est localisée dans les hémocytes qui ne subissent aucun dommage cellulaire (Figure 29). **L'ensemble de nos résultats montrent que la protéine R5-7 est nécessaire à la cytotoxicité mais qu'elle n'est pas elle-même cytotoxique envers les hémocytes.** Pour le moment, son rôle dans la cytotoxicité est non résolu.

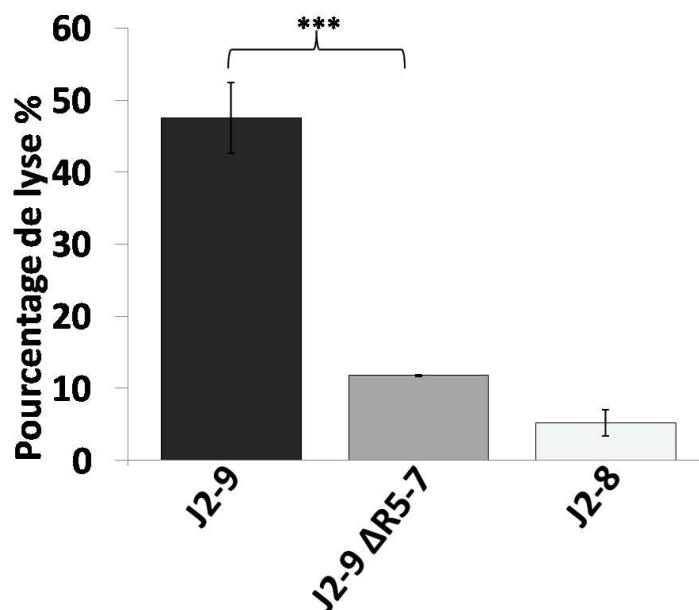


Figure 28 | Cytotoxicité de *V. crassostreae* J2-9 $\Delta R5-7$.

La cytotoxicité des vibrios envers une monocouche d'hémocyte a été suivie par mesure de la fluorescence du sytox green pendant 15h. Les cellules ont été infectées avec les bactéries à une MOI de 50:1. Le mutant J2-9

$\Delta R5-7$ est significativement moins cytotoxique que la souche sauvage (RM-ANOVA p-value<0.001). La barre d'erreur représente l'écart type du triplicat technique.

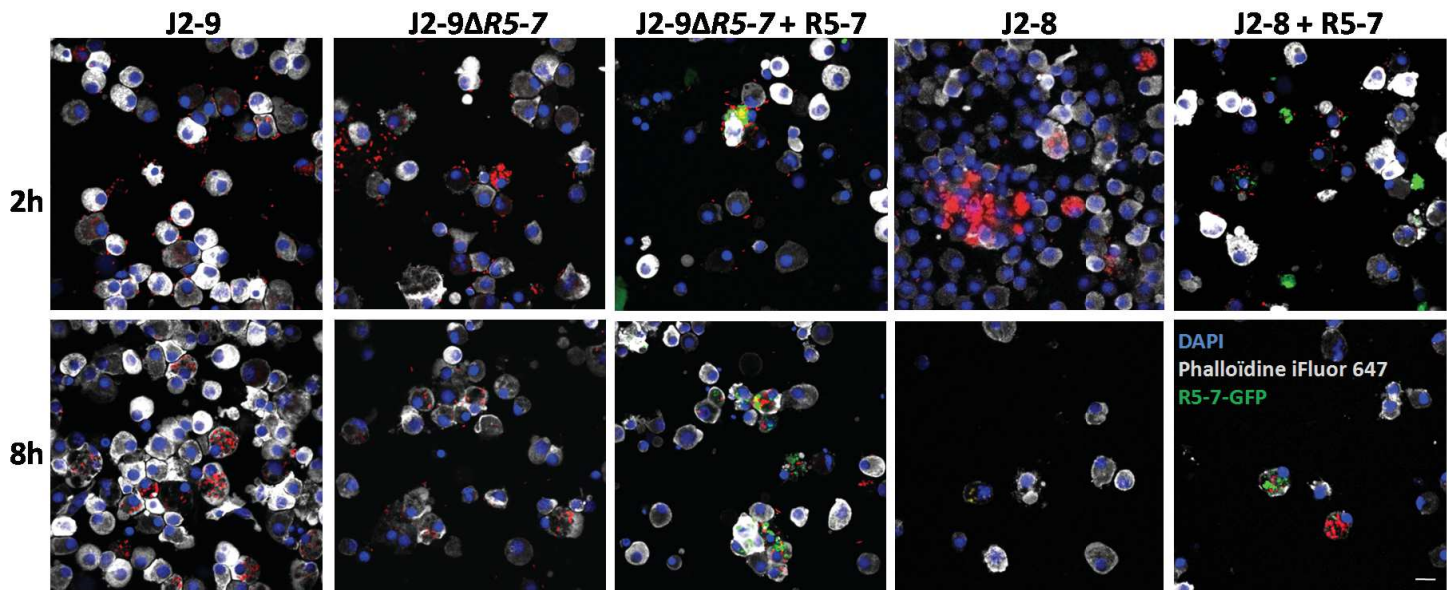


Figure 29 | Interaction *V. crassostreae* J2-9/hémocytes *in vivo* avec ou sans de la protéine R5-7-GFP.

Des huîtres ont été injectées avec *V. crassostreae* J2-9, *V. crassostreae* J2-9 $\Delta R5-7$ et J2-8 avec ou sans la protéine purifiée couplée à la GFP. L'hémolymphe est ensuite prélevée 2h et 8h après l'injection. L'actine est marquée à la Phalloïdine iFluor 647 et les acides nucléiques au DAPI. Les souches de vibrios expriment la protéine fluorescente mCherry. L'échelle correspond à 10 μ m.

Induction de la cytotoxicité par activation d'un programme de mort cellulaire

Alors que les bases moléculaires de la cytotoxicité restent méconnues pour les vibrios pathogènes LGP32 et J2-9, nous avons donc voulu aussi tester l'hypothèse que la mort des hémocytes induite pas des vibrios du clade Splendidus pouvait résulter de l'activation d'un programme de mort cellulaire tel que la pyroptose ou l'apoptose dont les voies de signalisation mettent en jeu l'activation de caspases. Il nous est alors paru particulièrement intéressant de tester si la mort des hémocytes induite par *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 était dépendante de l'activité des caspases. C'est pourquoi nous avons réalisé une quantification de la cytotoxicité de LGP32 et J2-9 en présence d'un inhibiteur des caspases nommé Z-VAD qui inhibe la pyroptose et l'apoptose. Les résultats montrent qu'en présence de Z-VAD, la cytotoxicité de LGP32 diminue significativement, passant de 40% à 20% (RM ANOVA : p value<0.001). Cependant, la cytotoxicité de LGP32 n'est pas totalement inhibée. A l'inverse, aucune différence de cytotoxicité n'est observée pour J2-9 en présence ou en absence de Z-VAD. **Ces résultats suggèrent que *V. tasmaniensis* LGP32 pourrait en partie induire un programme de mort cellulaire caspase dépendant contrairement à *V. crassostreae* J2-9** (Figure 30).

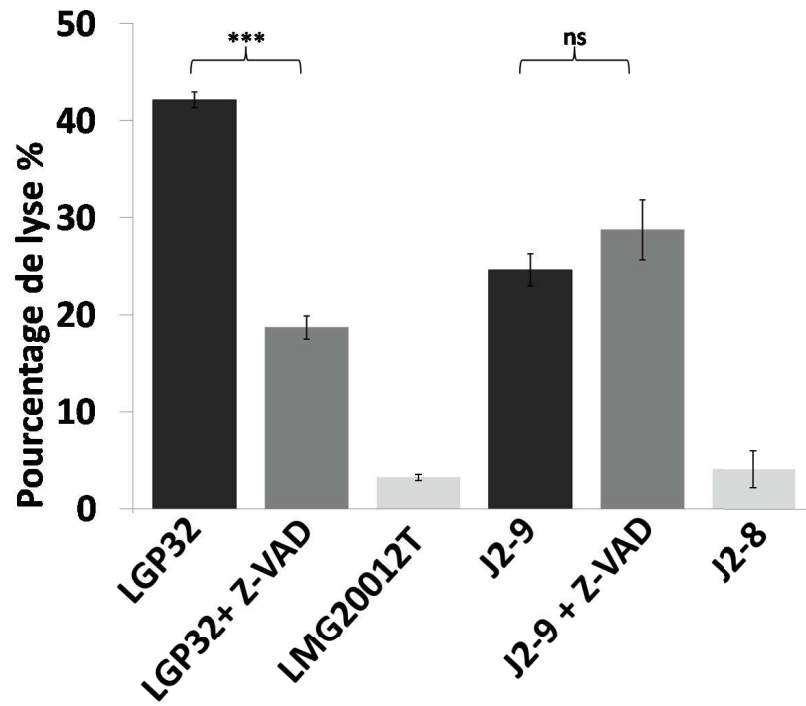


Figure 30 | Quantification de la cytotoxicité de LGP32 et J2-9 après inhibition des caspases

Les histogrammes représentent le maximum de cytotoxicité des vibrios en pourcentage de lyse d'hémocytes par mesure de la fluorescence du sytox green. En noir sont représentés la cytotoxicité des souches LGP32 et J2-9 sans Z-VAD et les histogrammes gris représente la mesure de la cytotoxicité en présence de Z-VAD. Les barres d'erreurs représentent l'écart type du triplicat technique. Le blocage des caspases par le Z-VAD induit une diminution de la cytotoxicité de LGP32 mais pas de celle observée avec J2-9. (RM-ANOVA p-value<0.001).

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes qui régissent les interactions entre différentes populations de vibrios et l'huître *Crassostrea gigas*. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux populations du clade Splendidus, les *V. tasmaniensis* et les *V. crassostreae*, pathogènes pour l'huître. Nous avons cherché à comprendre si ces populations induisent la mort des huîtres à travers des mécanismes de virulence similaires, reflétant des processus évolutifs convergents ou parallèles, ou au contraire si elles possèdent des mécanismes de virulence distincts. Ce chapitre fera l'objet d'une discussion des résultats obtenus en lien avec la littérature et des perspectives de recherche seront proposées en fonction des conclusions de ce travail de thèse.

1 Processus pathogènes des vibrios du clade Splendidus

1.1 Diversité des mécanismes de cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 pathogènes pour l'huître

Nos travaux ont démontré que les vibrios pathogènes *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 lysent les hémocytes par des mécanismes de cytotoxicité différents. L'entrée dans l'hémocyte par phagocytose est indispensable à la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32. En revanche, nos résultats montrent que *V. crassostreae* J2-9 est cytotoxique envers les hémocytes même si la phagocytose est bloquée. Les analyses par microscopie suggèrent que J2-9 est capable de lyser des phagocytes professionnels mais aussi des hémocytes qui ne possèdent pas d'activité de phagocytose (Section B : Figure S4). Néanmoins, les expériences réalisées avec le système Transwell permettant d'empêcher l'interaction physique entre les vibrios et les hémocytes indiquent que le contact direct entre J2-9 et les hémocytes est nécessaire à l'induction de la cytotoxicité (Section B : Figure 6B). La cytotoxicité envers les cellules immunitaires de l'hôte est un mécanisme de virulence très conservé chez les pathogènes qu'ils soient intracellulaires ou extracellulaires. Par exemple, les *Salmonella*, *Legionella*, *Brucella* et *Listeria* qui sont des spécialistes de la niche intracellulaire. Elles envahissent les macrophages et résistent à la phagocytose en modifiant la phagosome dans lequel

elles résident. Puis, elles induisent un programme de mort cellulaire (Sansonetti 2004, Roberta Souza dos Reis 2010). A l'inverse, *V. cholerae* a longtemps été considéré comme un pathogène extracellulaire cytotoxique car il sécrète des composés toxiques telles que la toxine cholérique, les toxines RTX, HlyA et rtxA, qui vont induire la mort des entérocytes par divers mécanismes (Kaper et al. 1995, Figueroa-Arredondo et al. 2001, Linhartova et al. 2010). Pourtant, il a été aussi montré que *V. cholerae* peut être internalisé dans des phagocytes dont il va provoquer la lyse (Ma et al. 2009, Satchell 2009). Nos résultats suggèrent que *V. tasmaniensis* LGP32 s'est spécialisé dans l'invasion et la lyse des phagocytes professionnels. A l'inverse, *V. crassostreae* J2-9 semble être cytotoxique pour l'ensemble des populations d'hémocytes. Bien que la cytotoxicité s'exprime par des mécanismes différents chez les deux souches virulentes, elle semble être un mécanisme majeur d'échappement aux cellules immunitaires conservé chez les vibrios du clade Splendidus.

1.2 Mécanismes de cytotoxicité des vibrios du clade Splendidus.

Bien que nous ayons prouvé que les deux populations virulentes du clade Splendidus lysent les hémocytes, les déterminants moléculaires conférant à ces souches leur cytotoxicité restent non identifiés. De nombreuses études ont montré que les mécanismes de cytotoxicité et de virulence des vibrios reposent sur des effecteurs cytotoxiques sécrétés par différents systèmes de sécrétion. Au sein de ces effecteurs, on trouve notamment des toxines formant des pores membranaires (parfois appelées hémolysines), des phospholipases qui hydrolysent les phospholipides membranaires et des protéases.

1.2.1 Effecteurs cytotoxiques

Parmi les vibrios du clade splendidus, une métalloprotéase Vsm (VS_II1062) et une protéase à sérine Vsp (VS_II0815) ont été identifiées chez *V. tasmaniensis* LGP32 (Le Roux et al. 2007) (Vanhove et al. 2015). La protéase Vsp est nécessaire à la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 contrairement à la protéase Vsm qui est pourtant un facteur de toxicité des produits de sécrétion extracellulaires (ECP) (Le Roux et al. 2007, Vanhove et al. 2015). Notre analyse du transcriptome de LGP32 a montré que la Vsm est sous exprimée dans les stades intracellulaires du vibrio alors que l'expression de Vsp n'est pas modulée. A l'inverse, une protéase homologue de PrtV/inhA (VS_II1062) et une phospholipase (VS_II0149) sont surexprimées dans les stades intracellulaires du vibrio. Des résultats préliminaires suggèrent que PrtV/inhA pourrait participer à la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 contrairement à la phospholipase (Section B : figure 22). Toutefois, la contribution de PrtV/inhA à la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 reste modérée.

Ainsi, bien que la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 s'exprime *in vitro* nous n'avons pas pu caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents par approche transcriptomique (Section A). Plusieurs raisons peuvent expliquer ceci. D'une part, Il est possible que les gènes impliqués dans la cytotoxicité n'aient pas d'homologie avec des gènes connus, et n'aient ainsi pas retenu notre attention. D'autre part, Il est également possible que les gènes impliqués dans la cytotoxicité ne soient pas régulés au niveau transcriptionnel. Il est alors impossible de les identifier par une approche RNAseq. Afin d'avancer dans la caractérisation des processus pathogènes de LGP32, nous pourrions envisager de rechercher par voie biochimique (fractionnement bioguidé) des enzymes de type hydrolases, ou phospholipases pouvant conférer la cytotoxicité à la souche LGP32. Dans un premier temps, nous pourrions tester l'activité hémolytique des vibrios pathogènes sur une gélose au sang. Dans un second temps, les produits de sécrétion (ECP) après contact avec les hémocytes pourraient être étudiés pour identifier une activité de type hémolytique ou phospholipase. Si une de ces activités enzymatiques est détectée, un fractionnement des ECP par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pourrait alors être entrepris pour isoler la molécule à l'origine de cette activité.

1.2.2 Les systèmes de sécrétion

En plus de la sécrétion d'effecteurs, Il nous reste à explorer le rôle des systèmes de sécrétion (TSS) dans la cytotoxicité. En effet, les TSS ont souvent été associés à la virulence et à la cytotoxicité des pathogènes. L'un des mieux décrit est le T3SS connue sous le nom "d'injectisome". Il permet aux pathogènes d'injecter des effecteurs directement dans la cellule hôte comme cela a été démontré chez les *Yersinia* et *V. parahaemolyticus* (Cornelis et al. 1998, Makino et al. 2003, Lee et al. 2015, de Souza Santos et al. 2017). Etonnamment, les génomes de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 ne codent pas pour un T3SS. C'est pourquoi nous avons recherché les gènes codant pour des éléments d'autres systèmes de sécrétion. Dans un premier temps, nous avons trouvé plusieurs gènes du système de sécrétion de type 1 (T1SS) dans le génome de J2-9 et de LGP32. Les T1SS sont notamment impliqués dans la sécrétion de toxines de type RTX comme les toxines HlyA et rtxA chez *V. cholerae* (Linhartova et al. 2010, Satchell 2015). Dans un deuxième temps, nous avons trouvé également des gènes impliqués dans le T2SS chez les deux vibrios pathogènes. Chez *V. cholerae*, le T2SS est impliqué dans la sécrétion de plusieurs facteurs de virulence telles que les protéases à sérine VesA, VesB, VesC (Sikora et al. 2011, Sikora 2013). En plus du T1SS et du T2SS, *V. crassostreae* J2-9 possède un plasmide pGV1512 qui code pour un système de sécrétion de type 4 (T4SS) et de type 6 (T6SS). Cependant les travaux de Bruto et al ont montré qu'ils ne sont pas nécessaire à la virulence (Bruto et al. 2017). De plus, le T4SS est un système conjugatif (Le Roux, communication personnelle). Par ailleurs, le T6SS est plutôt associé à la compétition inter-bactérienne ou à la

résistance contre les prédateurs unicellulaires eucaryotes (Miyata et al. 2011, Brooks et al. 2013, Metzger et al. 2016). Etant données les connaissances actuelles sur les mécanismes de cytotoxicité des vibrios splendides, nous pouvons supposer que *V. crassostreae* J2-9 sécrète des toxines par un T1SS ou un T2SS après adhésion à la surface de la cellule alors que *V. tasmaniensis* LGP32 sécrète des effecteurs cytotoxiques lors de ses stades intracellulaires pour dégrader la membrane vacuolaire.

1.2.3 Rôle de la protéine R5-7 dans la cytotoxicité de *V. crassostreae* J2-9

Lorsque nous avons entrepris ces travaux, le rôle de la protéine R5-7 présente chez l'espèce *V. crassostreae* restait inconnu. Nous nous sommes particulièrement intéressés à R5-7 car Lemire et al. avaient montré que le gène *R5-7* (numéroté VRSK9J2v1_730268 chez J2-9) était nécessaire à la virulence des souches de *V. crassostreae*, notamment J2-9, J5-5 et LGP8 (Lemire et al. 2014).

Nos travaux ont permis de montrer que les souches (J2-9, LGP8, J5-4, J5-20) de l'espèce *V. crassostreae* étaient cytotoxiques envers les hémocytes de l'huître et que la protéine R5-7 présente dans l'ensemble de ces génomes était nécessaire à la cytotoxicité de la souche J2-9. Cela reste à ce jour le seul gène nécessaire à la cytotoxicité identifié chez les *V. crassostreae*. Le gène *R5-7* code une protéine de 798 acides aminés avec un poids théorique de 89 kDa. Aucun domaine fonctionnel n'a pu être identifié sur la base d'homologies de séquences. Son importance pour la cytotoxicité des *V. crassostreae* sur les hémocytes d'huître pourrait expliquer son rôle dans la virulence. Toutefois, le mécanisme par lequel elle est impliquée dans la cytotoxicité reste inconnu. Au cours de nos travaux, nous avons observé que le surnageant de culture de J2-9 n'est pas cytotoxique (Section B : figure S5), ce qui a priori exclut l'hypothèse simple de la sécrétion extracellulaire d'une protéine R5-7 cytotoxique dans les ECP (extracellular products). Sachant que la souche *V. crassostreae* J2-9 n'exprime sa cytotoxicité que si elle entre en contact direct avec les hémocytes (Section B : Figure 6B), on peut supposer soit que R5-7 intervient dans l'adhésion de la bactérie à la surface des hémocytes, à l'image de ce qui avait été montré pour la porine membranaire OmpU qui est nécessaire à la reconnaissance, à l'invasion de l'hémocyte et à la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 (Duperthuy et al. 2010, Duperthuy et al. 2011), soit que R5-7 doive être sécrétée au contact proche des hémocytes pour exercer son activité cytotoxique. En effet, chez les *Pseudomonas*, il a été prouvé que l'expression et la sécrétion via un T2SS des hémolysines formant des pores ExlA sont dépendantes de l'adhésion à la surface de la cellule (Basso et al. 2017). Un tel mécanisme chez *V. crassostreae* J2-9 pourrait expliquer que le surnageant de culture ne montre aucune activité cytotoxique sur les hémocytes alors que J2-9 est capable d'induire la lyse des hémocytes en restant extracellulaire. L'adhésion de J2-9 à la surface de l'hémocyte via la protéine R5-7 pourrait induire l'expression de protéines cytotoxiques. Nos images en microscopie confocale et électronique

suggèrent que *V. crassostreae* J2-9 produit des protéines cytotoxiques car il dégrade la membrane cellulaire après avoir adhéré à la surface et il dégrade la membrane vacuolaire et les organelles de la cellule lorsqu'il est internalisé (Section B: figures 5 et S4). Pour approfondir cette étude, Yannick Labreuche a produit la protéine R5-7 fusionnée à la GFP afin de pouvoir localiser la protéine par microscopie à fluorescence. Dans le cadre d'une collaboration, nous avons injecté la protéine R5-7-GFP avec la souche J2-9 sauvage ou le mutant $\Delta R5-7$. Les premiers essais montrent que le mutant semble davantage phagocyté que la souche sauvage. Lorsque le mutant est injecté avec la protéine il n'est plus phagocyté au temps 2h et la protéine est internalisée dans les hémocytes qui ne subissent aucun dommage (Section B: figure 24). On peut en déduire que R5-7 n'a pas d'activité cytotoxique sur les hémocytes. Néanmoins, la localisation de la protéine est difficile à déterminer car elle n'est visible que si elle est présente en forte concentration. De plus, l'ajout de la GFP à la protéine R5-7 pourrait modifier la conformation de la protéine et par conséquent sa fonction. Il est donc possible que des agrégats de R5-7 soient phagocytés et que nous ne puissions pas observer la véritable localisation. Pour pallier à ce problème, une seconde méthode consisterait à réaliser un anticorps dirigé contre R5-7 à partir de la protéine purifiée. Cet anticorps permettrait de réaliser un marquage immunogold de la protéine R5-7 sur des coupes d'hémocytes en contact avec *V. crassostreae* J2-9. Le marquage immunogold permettrait d'observer la localisation exacte de R5-7 par microscopie électronique. Il n'est alors pas nécessaire de coupler la protéine à la GFP. La principale difficulté de cette approche étant la synthèse d'un anticorps spécifique de la protéine. En cas d'échec, il est possible d'ajouter un Tag polyhistidine de petite taille à la protéine R5-7 afin d'utiliser un anticorps dirigé contre celui-ci.

1.2.4 Mécanisme de cytotoxicité par induction d'un programme de mort cellulaire programmé.

Si de nombreux pathogènes exercent des effets cytotoxiques sur les cellules de leurs hôtes par la sécrétion d'effecteurs, une grande variété de bactéries pathogènes intracellulaires ou extracellulaires ont la capacité d'induire des programmes de mort cellulaire. Nos résultats préliminaires ont montré que le blocage des caspases induisait une diminution significative mais partielle de la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 contrairement à celle de *V. crassostreae* J2-9. On peut émettre l'hypothèse que le pathogène intracellulaire *V. tasmaniensis* LGP32 déclenche une mort cellulaire dépendante de l'activation des caspases. Ceci pourrait traduire un phénomène tel que l'apoptose ou la pyroptose. En effet, l'apoptose est une mort cellulaire non inflammatoire qui peut être activée par une voie extrinsèque ou par une voie intrinsèque qui conduit à l'activation des protéases caspases (Elmore 2007). Il en résulte un arrondissement des cellules, une réduction du volume cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et une formation

de corps apoptotiques qui vont être éliminés par phagocytose. Chez les vibrios, l'induction de l'apoptose a été observée sur des cellules humaines après interaction avec *V. vulnificus* (Zhao et al. 2009) (Ma et al. 2009). De manière intéressante, les images de microscopie des hémocytes en contact avec LGP32 montrent des cellules lysées (Section A: figure 1B). Ceci apparaît peu compatible avec un phénomène d'apoptose dans lequel l'intégrité de la membrane plasmique est préservée. Au vu de ces images, nous pouvons supposer que LGP32 induit la mort des hémocytes par induction d'une pyroptose.

Contrairement à l'apoptose, la pyroptose est une mort cellulaire pro-inflammatoire qui se distingue par l'activation de la caspase 1 et par la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Elle se caractérise par une condensation nucléaire, une dégradation de l'ADN et un gonflement cellulaire qui mène à la lyse de la cellule (Bergsbaken et al. 2009). La pyroptose est souvent associée à des infections par des pathogènes intracellulaires comme les *Salmonella* et les *Legionella* (Jorgensen and Miao 2015). Il a été montré que *Salmonella* induit l'activation de la caspase 1 notamment grâce à un système de sécrétion de type III ce qui provoque la pyroptose de la cellule (Brennan and Cookson 2000, Fink and Cookson 2005). La pyroptose n'a jamais été décrite chez l'huître et aucun vibrio n'est connu pour l'induire chez les mammifères. Il serait donc particulièrement intéressant de tester si les hémocytes subissent une mort par pyroptose suite à l'infection par le pathogène intracellulaire *V. tasmaniensis* LGP32. Pour tester cette hypothèse, l'inhibiteur spécifique de la caspase 1 (Y-VAD) pourrait permettre de différencier la pyroptose de l'apoptose. Nous pourrions ainsi voir si l'Y-VAD protège les hémocytes après phagocytoses de *V. tasmaniensis* LGP32. Plusieurs caspases ont été caractérisées chez l'huître *C. gigas* notamment les *Cg-caspases-1,-2,-3,-7* et *-8*. Les *Cg-caspases-1,-3* et *-7* ont été identifiées comme des caspases effectrices capables d'induire la mort cellulaire (Zhang et al. 2011b, Qu et al. 2014). Toutefois, il est impossible de faire un parallèle entre les fonctions de ces caspases avec leurs homologues chez les mammifères. En effet, leurs rôles fonctionnels dans la mort cellulaire n'ont jamais été caractérisés. C'est pourquoi, il n'est pas garanti que le Y-VAD permettent d'inhiber la *Cg-caspase-1*. Une solution consisterait alors à identifier des caractéristiques cellulaires de la pyroptose en microscopie électronique notamment le gonflement de la cellule, la rupture de la membrane plasmique et la dégradation de l'ADN dans le noyau.

Ainsi, les mécanismes qui sous-tendent la cytotoxicité des vibrios du clade Splendidus restent non résolus. D'une part, ils pourraient impliquer des effecteurs directement cytotoxiques telle que la protéase PrtV (il existe un nombre élevé de candidats potentiels dans les génomes connus), d'autre part ils pourraient à l'inverse passer par l'induction de voies de mort cellulaire comme la pyroptose comme le suggèrent

les résultats préliminaires chez LGP32. Par ailleurs, chez *V. crassostreae* J2-9, la protéine R5-7 joue un rôle majeur dans la cytotoxicité.

1.3 Le rôle essentiel des espèces réactives de l'oxygène et de l'homéostasie des métaux dans les interactions huître/vibrios.

1.3.1 L'homéostasie des métaux

Au cours de cette thèse nous avons montré que l'homéostasie des métaux joue un rôle clé dans les interactions huître/vibrio. Particulièrement, la perte du gène *copA* induit une perte de virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 comme cela avait été montré chez d'autres pathogènes intracellulaires comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella typhimurium* chez la souris (Section A) (Schwan et al. 2005, Ladomersky and Petris 2015). On peut en déduire que le pathogène est soumis à de fortes concentrations en cuivre dans l'huître. Une question se pose alors : les métaux divalents sont-ils utilisés par *C. gigas* comme un mécanisme d'élimination des bactéries pathogènes ?

Les résultats du transcriptome intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32 sont à mettre en parallèle avec le transcriptome de l'huître lors d'une infection par les vibrios du clade Splendidus. Nos résultats révèlent en effet que l'homéostasie du zinc et du cuivre est régulée en réponse à l'infection par des vibrios indépendamment de leur statut de virulence (Metallothionein IV : CGI_10012042, Zinc transporter 1 : CGI_10019513, Zinc transporter ZIP1-like : CGI_10024789, Metallothionein : CGI_10000066, Copper-transporting ATPase 1-like : CGI_10001203, Zinc transporter ZIP1 : CGI_10012799). Notons que la modulation de certains transporteurs de zinc et des métallothionéines (Zinc transporter ZIP10-like: CGI_10007268, Zinc transporter 2-like: CGI_10020521, Metallothionein: CGI_10021194, Metallothionein : CGI_10021196) est spécifique à la réponse contre le pathogène intracellulaire *V. tasmaniensis* LGP32. Parmi ces gènes, on trouve notamment des homologues du transporteur ZIP10 (CGI_10007268) et du transporteur Znt2 (CGI_10020521)(Section B). Ces observations confirment que l'homéostasie des ions métalliques divalents est déterminante dans l'élimination des vibrios chez l'huître et tout particulièrement dans l'infection par un pathogène intracellulaire comme *V. tasmaniensis* LGP32. Chez les mammifères, 14 transporteurs ZIP permettent l'influx de zinc dans le cytoplasme et 9 transporteurs Znt qui effluent le zinc vers le milieu extérieur ou dans des vésicules et des organelles intracellulaires (Kimura and Kambe 2016). De manière intéressante, le transporteur Znt2 envoie le zinc vers les vésicules, les lysosomes et les endosomes. On peut émettre l'hypothèse que l'hôte effluent le zinc vers des lysosomes qui vont par la suite

fusionner avec le phagosome afin d'éliminer le pathogène dans le phagolysosome (Kimura and Kambe 2016). Néanmoins, les gènes sont identifiés par homologie de séquence avec des gènes d'autres espèces par conséquent il est hasardeux d'en déduire leur fonction biologique sans données supplémentaires. L'accumulation des métaux dans le phagosome est aujourd'hui démontrée uniquement chez les mammifères. Récemment, le rôle du transporteur ATPase ATP7a dans l'accumulation du cuivre au sein du phagosome a été démontré chez la souris. De plus, il est nécessaire à la résistance de la souris face au pathogène *Salmonella typhimurium* (Ladomersky et al. 2017). Une autre étude a montré que les macrophages de souris accumulent le zinc dans les phagosomes quelques heures après la phagocytose du pathogène *M. tuberculosis* (Botella et al. 2011). Notre étude est la première à montrer que l'huître régule l'homéostasie des métaux durant une infection bactérienne.

Pour approfondir cette étude, nous pourrions bloquer l'expression des gènes préalablement identifiés par approche RNAseq en utilisant la technique du RNAi (RNA interference). Les dsRNA (Double strain RNA) sont utilisés comme outil de génétique inverse pour diminuer l'expression d'un gène et ainsi comprendre sa fonction. Néanmoins, les dsRNA induisent l'expression de nombreux gènes immunitaires chez *C. gigas* ce qui pourrait compliquer toute interprétation des résultats (Pauletto et al. 2017). Récemment, des siRNA (Small interfering RNA) ont été utilisés avec succès chez l'huître *C. gigas* (Huang et al. 2017). Il serait intéressant de mettre au point le RNAi des transporteurs de zinc et de cuivre surexprimés chez l'huître à l'aide de siRNA. Ainsi le blocage des transporteurs nous permettrait d'identifier leur rôle dans la résistance de l'huître à l'infection par des vibrios en infection expérimentale. Pour compléter cette approche, nous pourrions marquer une monocouche d'hémocytes avec des sondes fluorescentes spécifiques du zinc et du cuivre afin de localiser les métaux en microscopie dans les cellules après phagocytose des vibrios (Botella et al. 2011, Ladomersky et al. 2017). La localisation cellulaire des transporteurs pourrait être réalisée en produisant des anticorps dirigés contre les protéines ATPase et Znt. La difficulté étant d'obtenir des anticorps spécifiques du transporteur souhaité. Nous pourrions ainsi marquer en fluorescence les transporteurs dans les hémocytes après contact avec les vibrios.

1.3.2 Les espèces réactives de l'oxygène

L'homéostasie des métaux est elle aussi apparue très importante dans les interactions huître/vibrios. Le phénotypage du mutant $\Delta sodA$ de LGP32 a ainsi permis de prouver que la superoxyde dismutase (SodA: VS_2918) est nécessaire à la survie intracellulaire et la cytotoxicité *in vitro* de cette souche. Par ailleurs, l'analyse du transcriptome de l'huître révèle que deux gènes codant pour des Dual oxydases (CGI_10023211, CGI_10025370) sont surexprimés quel que soit le

statut de virulence des vibrios injectés. Nos résultats sont en adéquation avec les précédents travaux de de Lorgeril et collaborateur en 2011. Ils avaient montré que l'expression d'un gène DUOX-like chez les hémocytes était associée à une réponse efficace contre les pathogènes *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. aesturianus* (de Lorgeril et al. 2011). Néanmoins, nous n'avons jamais réussi à induire un burst oxydatif sur une monocouche d'hémocytes après stimulation par un vibrio *in vitro*. Pourtant, nous avons montré que les hémocytes ont la capacité de produire des ROS *in vitro* après contact avec du zymosan (Poirier et al. 2014). De manière intéressante, un gène codant pour une NADPH oxydase (CGI_10004930) est réprimé spécifiquement après l'injection des souches virulentes. Or, la NADPH oxydase catalyse la formation de l'ion superoxyde (O_2^-) dans le phagosome mais également en extracellulaire (Donaghy et al. 2012). De plus, Duperthuy et ses collaborateurs ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 inhibe la production de ROS en intracellulaire (Duperthuy et al. 2011). Une inhibition des ROS par les vibrios pourrait expliquer que les deux gènes codant pour une alkyl hydroperoxyde réductase (ahpC: VS_2126, tsa: VS_II0625) ne sont pas nécessaires à la survie intracellulaire, à la cytotoxicité et à la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32. De même, *sodA* n'est pas nécessaire à la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 malgré son rôle dans la survie intracellulaire *in vitro*. L'ensemble de ces données suggèrent que la production de ROS est une réponse antimicrobienne majeure de l'huître mais que les vibrios ont la capacité de l'inhiber.

Cette thèse a permis de montrer que l'homéostasie des métaux et les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle essentiel dans les interactions huître/vibrio. Le travail sur les métaux est un travail pionnier dans cette espèce et au-delà chez les invertébrés, qui a permis d'étendre la vision de la réponse antimicrobienne à une composante encore inexplorée, au delà des peptides antimicrobiens, des enzymes hydrolytiques et des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

2 Tropisme tissulaire et colonisation des tissus de l'huître *C. gigas* par les vibrios du clade Splendidus

Nos travaux nous ont conduits à explorer la diversité des interactions entre populations virulentes du clade Splendidus. Si les mécanismes sous-jacents sont spécifiques des populations considérées, un certain nombre de traits phénotypiques sont partagés par les populations virulentes qui se sont révélées capables d'échapper aux cellules immunitaires, les hémocytes, en induisant leur lyse, et de coloniser ensuite de manière systémique le tissu conjonctif des huîtres avant d'induire la mort des huîtres. A l'inverse, nous avons montré que les populations non virulentes étaient

contrôlées par les hémocytes, ne colonisaient pas le tissu conjonctif et n'induisaient pas la mort des huîtres. Ceci met une nouvelle fois l'accent sur le rôle majeur des hémocytes dans le contrôle des infections.

2.1 Inhibition de l'agrégation hémocytaire par les vibrios pathogènes

L'observation des coupes histologiques nous a montré que les vibrios non virulents sont contrôlés de manière très efficace par les hémocytes. Ainsi les souches *V. tasmaniensis* LGM20 012T et *V. sp.* J2-8 sont massivement phagocytées *in vivo* et sont contrôlées par des agrégats d'hémocytes. A l'inverse, aucun agrégat d'hémocyte contenant des vibrios n'est observé lors d'infections par *V. tasmaniensis* LGP32 ou *V. crassostreae* J2-9. L'agrégation joue un rôle dans la réparation des tissus mais son rôle dans l'immunité des huîtres reste peu étudiée (Kennedy 1996). Seule une étude en 2011 chez *C. virginica* a montré que la stimulation des hémocytes avec des β -glucane induit l'agrégation des hémocytes (Anderson et al. 2011). Nos résultats suggèrent que l'agrégation des hémocytes est une réponse majeure à l'infection par des vibrios et que cette réponse est inhibée par les souches virulentes afin de coloniser les tissus de l'huître. Nos travaux ont montré que les hémocytes de l'huître produisent des pièges d'ADN extracellulaires (ETs) capables de piéger les vibrios (Poirier et al. 2014). Or, ce phénomène appelé ETose a été associé à l'agrégation des hémocytes chez le crabe *Carcinus maenas*. En effet, l'incubation des hémocytes avec de la DNase inhibe l'agrégation (Robb et al. 2014). De plus, il a été montré que *V. cholerae* résiste à l'ETose en sécrétant des DNases (Bishop et al. 2014). On peut supposer que les vibrios mettent en place un processus d'inhibition actif de l'agrégation impliquant la sécrétion de nucléase. Nous pourrions tester cette hypothèse *in vitro* en mettant en contact des hémocytes avec des souches pathogènes, des souches non pathogènes ou de la DNase. Ensuite, nous induirions l'agrégation par un stimuli mécanique (tel qu'un pipetage des hémocytes) dans une plaque 96 puits. Ainsi nous verrions si les vibrios pathogènes inhibent l'agrégation hémocytaire. Nous pourrions également marquer au DAPI des coupes histologiques d'huître injectées avec des vibrios non virulents pour voir si les grands agrégats observés dans cette étude sont associés à de l'ADN extracellulaire.

2.2 Colonisation du tissu conjonctif par les vibrios pathogènes

Nos observations des coupes histologiques nous ont permis de montrer que *V. tasmaniensis* LGP32 comme *V. crassostreae* J2-9 colonisent le tissu conjonctif aussi appelé tissu de Leydig.

L'invasion de ce tissu a lieu tout particulièrement autour de la glande digestive, de l'intestin et de la gonade. Le tissu de Leydig a été peu étudié et peu de choses sont connues sur ses fonctions physiologiques. L'observation de coupes histologiques chez l'huître *Crassostrea virginica* a révélé que le glycogène est stocké tout particulièrement au niveau des tissus interstitiels de la gonade, de la glande digestive mais aussi par les cellules de Leydig concentrées au niveau de la glande digestive et la paroi intestinale (Cheng 1965). Le glycogène est un polymère de glucose qui est utilisé comme source d'énergie notamment au moment de la gamétogénèse. Le stockage maximum du glycogène est atteint durant le mois de mars et avril avant de décroître durant la gamétogénèse (Kennedy 1996). Par ailleurs, il a été montré que ce stock de glycogène dans les cellules de Leydig s'épuise suite à l'infection des diverticules de la glande digestive de *C. virginica* par le trématode *Bucephalus cuculus* (Cheng 1965). De manière intéressante, les zones du tissu interstitiel colonisées par les vibrios coïncident avec les zones de stockage connues du glycogène chez les huîtres. De plus, la réponse transcriptomique de l'huître à l'infection par des vibrios montre que les gènes de la catégorie remodelage de la matrice extracellulaire représentent 10,5% des gènes modulés spécifiquement suite à l'infection par les deux souches virulentes (Section B: figure 3). Plusieurs protéases sécrétées par des vibrios pathogènes ont une activité collagénase telles que PrtV chez *V. cholerae* et Vsp chez *V. tasmaniensis* LGP32 (Yu et al. 2000, Vanhove et al. 2015). Or, les génomes des deux vibrios pathogènes *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 contiennent de nombreuses protéases dont des collagénases (LGP32: VS_1567, J2-9: VCR9J2v1_720153). On peut supposer que les vibrios colonisent le tissu de Leydig et le dégradent pour l'utiliser comme substrat. Néanmoins, aucun dégât n'a été observé sur le tissu Leydig 8 heures après le début de l'infection. Seul le muscle adducteur est sévèrement impacté par les vibrios virulents. De plus, des colorations de PAS (Periodic Acid Schiff) et de trichrome de Masson ont été réalisées afin de colorer le glycogène et le collagène mais aucune différence n'a été observée entre les huîtres infectées et les huîtres contrôles. Ces résultats peuvent s'expliquer par le temps précoce auquel nous avons échantillonné. En effet, nous avons choisi de réaliser l'histologie au même temps que le RNAseq c'est à dire avant les premières mortalités. Le temps d'échantillonnage est peut-être trop précoce pour observer une dégradation de ce tissu. La dégradation du muscle adducteur prouve pourtant que les vibrios pathogènes sécrètent des effecteurs qui permettent la dégradation des tissus de l'huître. C'est pourquoi il serait intéressant de réaliser une cinétique avec des temps plus tardifs pour observer l'évolution de l'invasion des tissus par les vibrios. La dégradation du muscle adducteur et des tissus conjonctifs pourrait expliquer la mort de l'animal suite à l'infection par les vibrios du clade Splendidus.

Plusieurs espèces de vibrios pathogènes ont développé la capacité de coloniser les épithéliums. Néanmoins, ces tissus peuvent être un milieu hostile pour les bactéries car ils sécrètent de nombreux composés microbicides (Destoumieux-Garzon et al. 2014). Chez *C. gigas*, les épithéliums sont en contact avec une multitude de microorganismes présents dans l'eau de mer ou l'hémolymphe (Lokmer and Wegner 2015, Lokmer et al. 2016b). Il a été montré que plusieurs de ces épithéliums produisent des composés antimicrobiens tels que du lysosyme et des peptides antimicrobiens (Itoh and Takahashi 2007, Destoumieux-Garzon et al. 2014). Par exemple, les épithéliums de la branchie, du manteau et de l'intestin produisent le peptide antimicrobien *Cg-BPI* qui possède une activité contre les bactéries à Gram négatif (Zhang et al. 2011c). On retrouve également la défensine *Cg-Defm* au niveau de l'épithélium du manteau qui est active contre les bactéries à Gram positif (Schmitt et al. 2010). A l'inverse, le tissu conjonctif n'est pas un interface de contact avec les microorganismes et sa protection est assurée par la barrière physique que représente les épithéliums mais aussi par des hémocytes infiltrant. En ayant la capacité de lyser les hémocytes et de coloniser un tissu non immunitaire les vibrios pathogènes échappent au système immunitaire de *C. gigas*.

2.3 Dynamique d'infection

Si nous avons pu identifier un tropisme tissulaire pour les vibrios pathogènes, les voies d'infections restent inconnues, de même que la cinétique de la colonisation des tissus. Pour cela nous avons essayé de mettre au point des infections expérimentales par balnéation des huîtres avec *V. tasmaniensis* LGP32. Malheureusement, si les vibrios pénètrent massivement dans l'hémolymphe de l'huître (10^6 CFU/ml d'hémolymphe à 6h), ils n'induisent dans ces conditions aucune mortalité. A l'inverse l'injection des vibrios dans le muscle adducteur (procédure qui contourne les défenses épithéliales) permet d'induire de manière reproductible des mortalités, et dans ces conditions standardisées une dose létale de 7.5×10^7 CFU/huître a pu être établie pour les deux pathogènes. Cette charge n'étant pas atteinte expérimentalement lors d'infection par balnéation, il est vraisemblable que cela explique l'échec des infections par voies naturelles. Les vibrioses sont en effet des maladies doses-dépendantes (Schmid-Hempel and Frank 2007). Au-delà de la dose, il est possible que la virulence des bactéries ne soit pas induite dans les infections par balnéation. Nous avons donc également tenté d'induire la virulence des vibrios par des expériences de cohabitation entre huîtres donneuses injectées avec des vibrios et huîtres receveuses naïves. Là encore, aucune mortalité n'a été observée chez les receveuses (données non présentées). Toutefois, des travaux récents de l'équipe dans le cadre de l'ANR Decipher (coordonnée par G. Mitta) ont permis de montrer que lors d'infections mimant les conditions du milieu naturel, la colonisation des tissus de l'huître par les vibrios bénéficiait d'une immunosuppression des défenses de l'hôte par le virus OsHV-1 (de Lorgeril

et al., en prep). Ceci nous apporte un nouvel éclairage sur les vibrioses associées à cette maladie. Le suivi des vibrios dans de telles expérimentations sera précieux pour mieux comprendre leur rôle dans la maladie des huîtres. Nous pourrions également étudier le rôle des défenses épithéliales dans le contrôle des vibrioses qui jusque là a été négligé dans nos infections expérimentales.

Dans le cadre de ma thèse, des tentatives ont été faites pour suivre la route d'infection des vibrios par une technique d'imagerie intravitale mais cette technique s'est révélée trop peu sensible pour suivre les vibrios dans des protocoles de balnéation. C'est pourquoi nous pourrions utiliser une approche d'imagerie non invasive telle que l'IRM. Ce type d'imagerie a été utilisé sur l'huître *Saccostrea glomerata* pour étudier son anatomie et sa reproduction (Smith and Reddy 2012). Par ailleurs, le suivi de *E. coli* exprimant la bactérioferritine par IRM a également été réalisé chez la souris (Hill et al. 2011). Afin d'appliquer cette méthode chez l'huître *C. gigas*, il faudrait introduire un gène rapporteur comme la bactérioferritine fortement exprimé dans la bactérie. La colonisation de l'huître pourra être suivie car les tissus infectés apparaîtront contrastés. Cette technique non invasive qui devrait permettre de suivre la colonisation de l'huître par voies naturelles (en balnéation) serait également précieuse car elle permettrait d'associer à l'échelle individuelle la progression de la maladie au phénotype de résistance ou de susceptibilité.

Ainsi nous avons montré que l'inhibition de l'agrégation hémocytaire par les souches virulentes du clade Splendidus apparait déterminante pour la colonisation des tissus de l'huître. Ces vibrios peuvent alors envahir le tissu conjonctif au travers duquel ils semblent développer une infection systémique. En revanche, les voies d'infection des vibrios restent à caractériser.

3 Syndrome de mortalité des huîtres juvéniles : une infection polymicrobienne

Une limitation des travaux effectués dans cette thèse est son approche réductionniste. En effet, nous avons ici considéré les populations pathogènes de vibrios indépendamment des autres microorganismes associés à cette maladie. Or, il s'agit d'une maladie polymicrobienne qui associe non seulement plusieurs populations de vibrio du clade Splendidus mais également un herpes virus nommé *OsHV1- μ var* (Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b, Segarra et al. 2010, Lemire et al. 2014) (Bruto et al. 2017). Ceci doit nous amener à l'avenir à étendre notre étude des vibrios du clade Splendidus à celle des autres microorganismes en interaction qu'ils soient pathogènes ou commensaux. Le développement d'approches holistiques est ainsi aujourd'hui entrepris dans le cadre des projets de l'équipe MIMM et sera particulièrement important si l'on souhaite pouvoir

déterminer le poids relatif de ces différents microorganismes dans le syndrome de mortalité des huîtres juvéniles.

3.1 Interactions entre les populations pathogènes de vibrios

Un des apports majeurs de nos travaux a été de montrer que les mécanismes de cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 envers les hémocytes de l'huître sont des caractéristiques partagées à l'échelle des populations pathogènes et qu'elles reposent sur des mécanismes spécifiques à chacune d'elles. Sachant que ces populations créent des dommages aux mêmes types cellulaires (les hémocytes), une question se pose alors : y-a-t-il un effet additif de ces mécanismes dans la virulence ou ces souches sont-elles en compétition pour la même niche ? Les travaux de Bruto et collaborateurs sur un site ostréicole atlantique ont montré que la population *V. crassostreae* était associée exclusivement à l'huître et qu'elle était majoritaire par rapport à la population *V. tasmaniensis* lors d'un épisode infectieux (Bruto et al. 2017). Ceci pourrait traduire un avantage sélectif de cette population. Or nous avons montré ici la capacité des *V. crassostreae* à lyser tous types d'hémocytes, qu'ils soient phagocytés ou non, à l'inverse des *V. tasmaniensis* qui ne lysent que les phagocytes. Ceci pourrait conférer un avantage sélectif aux *V. crassostreae* dans la colonisation de l'huître par rapport aux spécialistes que sont les *V. tasmaniensis*. Comme le suggèrent le transcriptome de l'huître après injection des vibrios pathogènes, on peut en effet supposer que l'immunité des huîtres est plus fortement affectée par les *V. crassostreae* (33,3% des gènes affectés par J2-9 appartiennent à la catégorie immunité contre 6.3% pour LGP32) et que cela bénéficie à leur succès. Pour répondre à cette question, nous pourrions réaliser une expérimentation de « compétitive index » en infectant les huîtres par un mélange contenant 50% de LGP32 et 50% de J2-9. Ceci nous permettrait de trancher sur la capacité de fitness relative de chaque population. De plus, nous pourrions réaliser une infection expérimentale en injectant dans un premier temps, des billes de latex pour saturer la phagocytose puis dans un second temps, *V. crassostreae* J2-9 ou *V. tasmaniensis* LGP32. Les billes de latex pourraient protéger contre le spécialiste intracellulaire *V. tasmaniensis* LGP32 mais pas contre *V. crassostreae* J2-9.

3.2 Impact du microbiote sur la virulence des vibrios du clade Splendidus

L'hémolymphe et les épithéliums de l'intestin, de la branchie et du manteau de l'huître sont colonisés par un microbiote qui leur est spécifique (Lokmer and Wegner 2015, Lokmer et al. 2016b). Ce microbiote commensal pourrait agir de manière synergique ou antagoniste avec les vibrios

pathogènes associés à la maladie. En effet, ce microbiote peut potentiellement induire la virulence bactérienne par effet de quorum sensing notamment, il peut modifier les réponses immunitaires de l'hôte ou encore jouer un rôle de bouclier microbien par effet de compétition. Parmi les vibrios non pathogènes présents dans le microbiote des huîtres saines (Wendling et al. 2014), certains potentialisent la virulence de la souche *V. crassostreae* J2-9 étudiée dans cette thèse. C'est ce qu'ont montré les travaux de Lemire et al en 2014. En effet, l'injection de la souche virulente J2-9 dans les huîtres à une dose de 4×10^4 CFUs avec une souche non virulente *V. sp.* J2-8 pour atteindre 10^6 CFU total induit un taux de mortalité plus important que l'injection de J2-9 à 10^6 CFUs/huître. Ce résultat montre que des souches non virulentes peuvent faciliter la maladie (Lemire et al. 2014).

Plus récemment, les membres du projet DECIPHER ont entrepris, dans le cadre de la thèse d'Aude Lucasson, une étude barcoding sur des huîtres résistantes ou sensibles aux syndromes de mortalité. Leurs résultats montrent que la proportion de 7 genres bactériens augmente chez les familles sensibles notamment le genre *Vibrio*. Ces résultats suggèrent que d'autres genres bactériens pourraient également jouer participer au syndrome de mortalité des juvéniles (de Lorgeril et al., non publié). On peut également supposer que les vibrios pathogènes du clade Splendidus font partie des commensaux présents toute l'année et qu'ils expriment leur virulence suite à une perturbation de la physiologie ou de l'immunité de l'huître. On peut alors poser la question suivante : quel rôle joue le microbiote dans la virulence des populations pathogènes *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* ? Pour y répondre nous pourrions, dans un premier temps, déstructurer le microbiote et observer l'impact de cette déstructuration sur la virulence des vibrios du clade Splendidus en infection expérimentale par injection et par balnéation. Dans un second temps, il sera intéressant d'isoler et de tester la virulence des autres genres bactériens retrouvés en barcoding.

3.3 Coïnfection entre les vibrios du clade Splendidus et le virus OsHV1- μ var chez l'huître *C. gigas*

Une littérature désormais abondante montre que le virus OsHV1 et son variant μ var sont des pathogènes majeurs des huîtres juvéniles *C. gigas* systématiquement détectés lors des épisodes de mortalités depuis 1991 et 2008 respectivement (Renault et al. 1995, Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011, Azema et al. 2015, Azema et al. 2017). De manière remarquable, la stimulation de l'immunité antivirale des huîtres par injection d'un ARN double brin synthétique (poly I:C) a un effet protecteur sur les huîtres contre le virus en infection expérimentale (Green and Montagnani 2013) mais il diminue également significativement le syndrome de mortalités des juvéniles dans l'environnement durant les épisodes infectieux (Lafont et al en révision). En parallèle, une étude de

Petton *et al.* a montré qu'un traitement des huîtres aux antibiotiques réduit les mortalités. Les auteurs observent également que la colonisation de l'huître par des bactéries du genre *Vibrio* se produit après le début de la réplication virale (Petton *et al.* 2015b). L'ensemble de ces études montrent que le virus OsHV1- μ var n'est pas responsable à lui seul des mortalités mais qu'il existe vraisemblablement une coopération entre le virus OSHV-1 et les bactéries associées à la maladie. Ce constat nous permet d'émettre l'hypothèse que le virus est l'élément déclencheur permettant aux vibrios de coloniser les tissus de l'huître et en induire la mort. Cette hypothèse a récemment pu être démontrée dans le cadre du projet ANR Decipher (de Lorgeril *et al.*, en préparation). Les conclusions de ces travaux montrent en effet que le virus induit un affaiblissement du système immunitaire (répression de la réponse antibactérienne) qui pourrait permettre à des bactéries opportunistes tels que les vibrios du clade Splendidus d'envahir les tissus de l'huître et induire leur mort par septicémie. Cette immunosuppression pourrait résulter d'effets délétères du virus sur les hémocytes (Segarra *et al.* 2016, Martenot *et al.* 2017). Dans d'autres modèles, des études ont montré que des infections virales pouvaient affecter la réponse antibactérienne. Par exemple, il a été montré que les cellules infectées par le virus de la grippe influenza H3N2 produisent de l'IFN- β qui induit une baisse de la capacité de phagocytose des macrophages et une baisse de l'expression du récepteur CD36, impliqué dans la phagocytose de la bactérie *Streptococcus pneumoniae* (Cooper *et al.* 2016). Or, ce pathogène est responsable de pneumonie secondaire chez les patients ayant eu la grippe (McCullers 2006).

Explorer les mécanismes de la coopération OsHV-1 μ var/vibrio apparaît désormais comme une priorité. Il sera nécessaire à l'avenir nécessaire d'étudier les interactions huîtres/vibrios (colonisation, expression de la virulence...) sur des huîtres préalablement infectées avec le virus. Nous pourrions en particulier étudier les capacités immunologiques des hémocytes d'huîtres infectées par le virus en réponse aux *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis*. La capacité de phagocytose des vibrios par les hémocytes d'huître infectées par le virus pourra être suivie par cytométrie en flux. L'impact sur la cytotoxicité des *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 pourra être étudié *in vitro*. Afin de déterminer en quoi le virus modifie l'hôte huître et le rend permissif à la colonisation par les vibrios, il sera particulièrement intéressant de caractériser les déterminants qui permettent la colonisation de l'huître par les vibrios pathogènes dans les conditions infectées/non infectées par le virus. Une approche Tn-seq sur les vibrios dans les conditions huîtres non infectées par le virus et huître infectées par le virus nous permettra d'identifier des gènes impliqués dans la colonisation de l'huître. Ces travaux sont prévus dans le cadre de la thèse de Daniel Oyanedel-Trigo.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse nous avons pu identifier le tropisme tissulaire des vibrios du clade Splendidus ainsi que des mécanismes majeurs leur permettant de survivre aux défenses de leur hôte et d'exprimer leur virulence. Nous avons montré que les vibrios pathogènes du clade Splendidus possèdent des capacités cytotoxiques envers les hémocytes, les cellules immunitaires de *C. gigas*. L'activité cytotoxique des deux populations de vibrios pathogènes, *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae*, vis-à-vis des hémocytes est un déterminant majeur de leur virulence, bien qu'elle repose sur des mécanismes moléculaires distincts. L'ensemble de nos travaux montre que les hémocytes jouent un rôle primordial dans les capacités de défense de l'huître *C. gigas*, contrairement à d'autres invertébrés où les effecteurs solubles et les barrières épithéliales jouent un rôle plus important.

Néanmoins, nous manquons encore très largement d'une vision intégrée de ces systèmes biologiques. En effet, si ces populations pathogènes sont associées de manière récurrente aux mortalités, il nous est encore impossible de reproduire les mortalités d'huître expérimentalement lorsque celles-ci sont infectées par voie naturelle, c'est à dire par filtration d'eau de mer contenant des vibrios pathogènes. Ceci soulève de nombreuses questions. Quelles sont les routes d'infection des vibrios ? Pourquoi les barrières naturelles sont-elles franchies en milieu naturel et pas en milieu contrôlé ? En d'autres termes, de quelles modifications de leur hôte ces vibrios opportunistes profitent-ils dans le milieu naturel ?

Les récents résultats intégrant des protocoles de pathogénèse écologiquement réalistes et plus intégrés nous amènent à revoir notre vision des interactions huîtres/vibrios. En effet, ces résultats montrent que les vibrios sont capables de coloniser l'huître par baignade uniquement si l'huître est aussi infectée par le virus herpes *OsHV1- μ var* suggérant ainsi que l'infection virale permet la colonisation de l'huître par les vibrios et l'expression de leur virulence. Deux hypothèses permettant d'expliquer ce modèle de pathogénèse pourront être explorées. Tout d'abord, il est possible que le virus *OsHV1- μ var* induise une immunodépression en ciblant les hémocytes favorisant ainsi la colonisation par des vibrios pathogènes opportunistes qui feront alors face à un système immunitaire affaibli. A l'inverse, la pathologie pourrait s'expliquer par l'expression de la virulence du virus *OsHV1- μ var* et des vibrios du clade Splendidus de manière concomitante dans l'huître dont le système immunitaire ne pourrait contrôler à la fois le virus et les vibrios puisque l'ensemble de ces pathogènes semblent cibler des populations d'hémocytes. Par ailleurs, des résultats récents

montrent que d'autres genres bactériens sont favorisés après l'infection par le virus. Ceci pose alors la question du rôle que jouent ces autres microorganismes dans le syndrome de mortalité. A l'avenir, l'étude de ce pathosystème devra intégrer l'ensemble des microorganismes viraux et bactériens qui ont été associés aux mortalités. D'une part, il sera intéressant de caractériser l'impact de l'infection de l'huître par le virus *OsHV1- μ var* sur la virulence des vibrios pathogènes et d'autre part nous pourrons isoler les autres genres bactériens préalablement identifiés et déterminer leur implication dans le syndrome de mortalités des huîtres juvéniles.

CHAPITRE IV: MATERIELS & METHODES

CHAPITRE IV: MATERIELS & METHODES

1 Souches bactériennes, plasmides et milieux

1.1 Souches et plasmides

Les différents souches et plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans le tableau 3 et 4.

Tableau 3 | Souches bactériennes

Souches bactériennes	Description	Références
<i>V. crassostreae</i> J2-9		Lemire et al 2015
<i>V. crassostreae</i> J2-9 pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Non publié
<i>V. crassostreae</i> J2-9 $\Delta R5-7$	Délétion du gène VRSK9J2v1_730268	Lemire et al 2015
<i>V. crassostreae</i> J2-9 $\Delta R5-7$ pMRB-HC <i>mcherry</i>	Exprime la protéine mCherry	
<i>V. crassostreae</i> LGP8 pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Faury et al 2004
<i>V. crassostreae</i> J5-4		Lemire et al 2015
<i>V. crassostreae</i> 5-20		Lemire et al 2015
<i>V. sp.</i> J2-8		Lemire et al 2015
<i>V. sp.</i> J2-8 pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Non publié
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32		Gay et al 2004
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 pMRB-HC <i>mcherry</i>	Exprime la protéine mCherry	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta copA$	Délétion du gène VS_0768	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta copA$ /pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta copA$ /pMRB-HC <i>mcherry</i>	Exprime la protéine mCherry	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta copA$ / pMRB-LC <i>copA</i>	Complémentation avec le gène VS_0768	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta cusAB$	Délétion des gènes VS_II0516 et VS_II0515	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta cusAB$		Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta cusAB$ /pMRB-LC <i>cusAB</i>		Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta sodA$	Délétion du gène VS_2918	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta sodA$ /pMRB-HC <i>gfp</i>	Exprime la protéine GFP	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta sodA$ / pMRB-LC <i>sodA</i>	Complémentation avec le gène VS_2918, le gène est porté par un plasmide avec un faible nombre de copies par cellule	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 $\Delta sodA$ / pMRB-HC <i>sodA</i>	Complémentation avec le gène VS_2918 le gène est porté par un plasmide avec un grand nombre de copies par cellule	Vanhove et al 2016

<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 Δ ahpC	Délétion du gène VS_2126	Non publié
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 Δ ahpC: Δ tsa	Délétion des gènes VS_2126 et VS_0593	Non publié
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 Δ phospholipase	Délétion du gène VS_II0149	Non publié
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32 Δ pvtV/inhA	Délétion du gène VS_II1062	Non publié
<i>V. tasmaniensis</i> J0-13		Lemire et al 2015
<i>V. tasmaniensis</i> J5-13		Lemire et al 2015
<i>V. tasmaniensis</i> J5-9		Lemire et al 2015
<i>V. tasmaniensis</i> LMG20012T	Souche de référence des <i>V. tasmaniensis</i>	Vanhove et al 2016
<i>V. tasmaniensis</i> LMG20012T- pMRB-HC <i>gfp</i>		Vanhove et al 2016
<i>E. coli</i> β 2163	RP4-2-Tc::Mu dapA::(erm-pir) [Km ^R Em ^R]	Le Roux et al 2007

Tableau 4 I Plasmides

Nom du plasmides	Description	Référence
pMRB-HC <i>gfp</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>high copy</i>	Le Roux et al 2007
pMRB-LC <i>gfp</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>low copy</i>	Le Roux et al 2007
pMRB-HC <i>mcherry</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>high copy</i>	Vanhove et al 2016
pMRB-LC <i>copA</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>low copy</i>	Vanhove et al 2016
pMRB-HC <i>cusAB</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>high copy</i>	Vanhove et al 2016
pMRB-LC <i>sodA</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>low copy</i>	Vanhove et al 2016
pMRB-HC <i>sodA</i>	<i>oriV_{R6Kv}</i> ; <i>oriT_{RP4}</i> ; <i>oriV_{MRB}</i> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB resistant</i> , [CM ^R], <i>high copy</i>	Vanhove et al 2016

de bacto agar sont ajoutés avant stérilisation à l'autoclave. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'hydroxyde de sodium. Le LB NaCl 0,5 M est un milieu riche salin utilisé pour la culture des vibrios marins.

Milieu EPS NaCl 0.5M

L'EPS NaCl 0.5 M contient 15g de bacto peptone, 30g de chlorure de sodium et 15g de bacto agar pour 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,2 à l'aide d'hydroxyde de sodium. L'EPS NaCl 0.5 M est un milieu pauvre utilisé pour phénotyper la résistance aux métaux des mutants LGP32 $\Delta copA$ et $\Delta cusAB$.

Eau de mer stérile (Edmf)

L'eau de mer est prélevée à la station de Palavas de l'Ifremer. Elle est ensuite filtrée sur 0,2 μm avant d'être autoclavée. Pour finir, elle est filtrée à nouveau sur 0,2 μm pour enlever les cristaux de sel formés pendant la stérilisation. L'eau de mer stérile est utilisée pour laver les vibrios mais également comme milieu pour les hémocytes lors des expérimentations de phénotypage *in vitro*.

Plasma d'huître stérile

L'hémolymphe est prélevée à partir d'huîtres adultes triploïdes. Elle est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 1500g pour enlever les cellules. Le surnageant est prélevé et filtré sur 0,2 μm pour retirer les bactéries. Le plasma est utilisé pour opsoniser les vibrios lors des expérimentations de phénotypage *in vitro*.

2 Culture bactérienne, mutagénèse et conjugaison

2.1 Souches bactériennes

Les souches virulentes *V. tasmaniensis* LGP32 (Gay et al. 2004b) et *V. crassostreae* J2-9 ainsi que la souche *V. sp.* J2-8, le plus proche voisin phylogénétique non virulent de la population *V. crassostreae* (Lemire et al. 2014), ont été isolées à partir d'huîtres moribondes. La souche *V. tasmaniensis* LMG20 012T est la souche non virulente la plus proche phylogénétiquement de *V. tasmaniensis* LGP32 et est la souche de référence des *V. tasmaniensis*. Les souches de vibrio sont mises en culture dans du milieu Zobell ou du LB supplémenté avec 0,5 M NaCl sur agar ou en liquide à 20°C pendant 16h. La souche *E. coli* β 2163 est cultivée en LB pendant 16h à 37°C.

2.2 Mutagénèse

La mutagénèse a été réalisée par substitution des gènes tel que décrit par Lemire et al en 2015 (Lemire et al. 2014). Les mutants ont été faits à Roscoff par F. Le Roux et son équipe.

2.3 Souches fluorescentes

Afin de suivre en fluorescence les souches de vibrios et leurs mutants isogéniques, nous avons utilisé la souche *E. coli* β 2163 MRB (auxotrophe pour l'acide diaminopimélique, DAP) donneuse d'un plasmide high copy (pMRB-*gfp*) codant pour la GFP (green fluorescent protein) et porteur du gène *CmR* (résistance au chloramphénicol) (Le Roux et al. 2011). La conjugaison est réalisée sur une boîte LB 0,5 M NaCl et 50 mM d'acide diaminopimélique (nécessaire à *E. coli* β 2163). Après une nuit de contact à 20°C, les bactéries sont reprises dans 500 μ l de LB 0,5M NaCl. 20 μ l de cette suspension est étalée sur une boîte LB 0,5M NaCl contenant 10 μ g/ml de chloramphénicol afin de sélectionner uniquement les *vibrios* contenant le plasmide, qui confère cette résistance.

2.4 Préparation des vibrios pour les expérimentations de phénotypage

Les cultures de 16 h (phase stationnaire) à 20°C des diverses souches de *Vibrio* dans 25 ml de milieu Zobell ou LB NaCl ont été lavées 1 fois par centrifugation à 1500g pendant 15 min puis ajustées à une densité (DO₆₀₀) de 2,5 équivalente à 2,7.10⁹ colonies (CFU) par millilitre en eau de mer filtrée sur 0.2 μ m et autoclavée (Edmf). Pour les contacts avec les hémocytes *in vitro*, les cultures bactériennes ont été centrifugées 1 fois à 1500g pendant 15 min puis elles ont été reprises dans du plasma pour opsonisation pendant 30 minutes. Elles ont ensuite été centrifugées à 1500g pendant 15 min puis reprises dans 5 ml d'Edmf ou de surnageant de culture over night préalablement filtré sur 0,2 μ m. La densité optique (DO₆₀₀) a été ajustée à 1 équivalent à 1.5.10⁹ CFU par ml en Edmf.

2.5 Phylogénie des souches J0-13, J5-13 et J5-9

L'ADN des souches de *V. tasmaniensis* J0-13, J5-13 et J5-9 a été extrait par dépôt de 10 μ l de culture de chaque souche a été déposé sur du papier CloneSaver FTA™ Card (GE Healthcare Life Sciences). Le papier est laissé à sécher en condition stérile pendant 1 h avant de prélever des petits disques de papier FTA au niveau de la zone de dépôt. Les échantillons d'ADN sur papier FTA sont placés dans des microtubes pour subir 2 lavages successifs avec 100 μ l de tampon Tris-EDTA 1X (Sigma). Afin d'être séché, les disques sont incubés pendant 10 minutes à 56°C. L'analyse

phylogénétique est basée sur l'alignement concaténé de séquences d'acides nucléiques partielles sur les gènes *gyrB*, *topA*, *hsp60* et *mreB*. Le gène *gyrB* a déjà été séquencé par F. Le Roux. Une PCR a été réalisée sur les gènes *mreB*, *topA*, *hsp60* à partir de l'ADN des trois souches. Les mélanges réactionnels et les programmes PCR sont indiqués dans le tableau 5 (Tableau 5). Les produits de PCR ont été séquencés par l'entreprise GATC Biotech. L'arbre a été construit selon la méthode de Neighbor Joining basé sur les alignements de séquences en utilisant Muscle (2204 sites). La longueur des branches est à l'échelle et est proportionnelle au nombre de changements de nucléotide. Le nombre indiqué à chaque nœud représente la valeur du pourcentage donnée par l'analyse bootstrap de 1000 répliqués.

Tableau 5 | Programmes et mélanges réactionnel des PCR

Gènes	Mélange 1 réaction (24µl)	Programme PCR
<i>topA</i>	MgCl ₂ : 2 µl dNTP: 0.5 µl Amorce sens: 1 µl Amorce antisens: 1µl Taq polymérase: 0.125 µl 5X Buffer: 5 µl H2O: 15.3 µl	35 cycles Pré-dénaturation: 94°C, 2 min Dénaturation: 94°C, 30 sec Hybridation: 50°C, 1 min Elongation: 72°C, 1 min Elongation finale: 72°C, 1 min
<i>mreB</i>	MgCl ₂ : 2 µl dNTP: 0.5 µl Amorce sens: 1 µl Amorce antisens: 1µl Taq polymérase: 0.125 µl 5X Buffer: 5 µl H2O: 15.3 µl	35 cycles Pré-dénaturation: 94°C, 5 min Dénaturation: 94°C, 30 sec Hybridation: 53°C, 1 min Elongation: 72°C, 45 sec Elongation finale: 72°C, 7min
<i>hsp60</i>	MgCl ₂ : 1.77 µl dNTP: 0.5 µl Amorce sens: 0.2 µl Amorce antisens: 0.2 µl Taq polymérase: 0.2 µl 1X Buffer: 5 µl H2O: 16.1 µl	35 cycles Pré-dénaturation: 95°C, 3 min Dénaturation: 95°C, 30 sec Hybridation: 37°C, 30 sec Elongation: 72°C, 1 min Elongation finale: 72°C, 5 min

3 Huîtres, infection expérimentale et prélèvement d'hémolymphe.

3.1 Matériel biologique

Les naissains de 3 familles d'huîtres diploïdes *C. gigas* (nommé dans le projet DECIPHER#1, 14 et 15) ont été produits à l'écloserie de l'Ifremer à Argenton en France dans le cadre du projet

DECIPHER. Une famille supplémentaire nommée NSI (naissains standardisé de l'Ifremer) a été utilisée pour les infections expérimentales. Ces huîtres juvéniles diploïdes sont produites en France à Bouin à la Station de l'Ifremer. Les familles sont maintenues en stabulation à 15°C jusqu'aux infections expérimentales. L'ensemble des familles ont été testées en infection expérimentale. La famille 14 a été utilisée pour l'expérimentation RNAseq. Les huîtres utilisées pour les expérimentations de phénotypage *in vitro* sont des *C. gigas* adultes triploïdes achetées au centre d'aide par le travail de Maguelone (Palavas Hérault). Au laboratoire, elles sont maintenues dans des bacs contenant 15 litres d'eau de mer avec un apport en oxygène à une température de 15°C.

3.2 Mise en culture des hémocytes

L'hémolymphe, contenant les hémocytes, a été ponctionnée dans le muscle adducteur postérieur, à l'aide d'une seringue 2ml et d'une aiguille 23G (1.2 x 40mm). Les hémocytes sont délicats à manipuler car la réaction d'agrégation se déclenche rapidement. C'est pourquoi, le matériel a été refroidi au préalable sur glace (seringue, aiguille et tube Falcon de 15 ml destiné à collecter l'hémolymphe). Après comptage des hémocytes sur lame de Kova, pour les tests *in vitro*, l'hémolymphe a été répartie dans les puits d'une plaque 96 puits noire à fond plat transparent (Greiner bio-one) de manière à obtenir une densité de $2 \cdot 10^5$ hémocytes par puits. Pour l'imagerie, l'hémolymphe est répartie dans une plaque 24 puits à fond plat transparent contenant une lamelle de verre de manière à obtenir une densité de $5 \cdot 10^5$ hémocytes par puits. Après adhésion des hémocytes (1 heure à température ambiante), la qualité de la monocouche cellulaire a été vérifiée au microscope inversée en contraste de phase.

4 Phénotypage des vibrios *in vitro*

4.1 Test de sensibilité aux métaux

Des disques de papier pour antibiogramme (dim: 6mm, marque: Dominique Dutscher) sont stérilisés à l'autoclave. Ensuite, les disques sont chargés en cuivre ou en zinc par trempage pendant 30 minutes dans une solution (stérilisée par filtration sur 0,2µm) de sulfate de cuivre (CuSO_4) 50 mM ou de sulfate de zinc (ZnSO_4) 50mM. Par la suite, le surplus de solution est enlevé et les pastilles sont réparties avec une pince stérile dans une boîte de pétri et elles sont séchées sous hotte pendant au moins deux heures. Une culture en phase stationnaire de vibrio est ajusté à une DO_{600} de 1 après avoir été lavée 2 fois en eau de mer stérile par centrifugation successive à 1500g pendant 15 min. La culture est étalée (100µl) sur boîte de milieu agar EPS NaCl 0,5M. A l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés de cuivre ou de zinc sont prélevés et déposés sur la gélose en appuyant

légèrement afin qu'ils adhèrent. Les disques sont séparés au minimum de 30 mm les uns des autres et de 15 mm du bord. Les boîtes sont placées à 20°C le couvercle vers le bas. Après 5 jours d'incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré.

4.2 Quantification de la cytotoxicité *in vitro*

La lyse des hémocytes par les vibrios est mesurée à l'aide de Sytox green (Molecular Probes), un agent intercalant qui devient fluorescent en présence d'ADN mais qui ne traverse pas les membranes des cellules vivantes. La mesure de la fluorescence permet ainsi de suivre la perméabilisation des membranes des cellules eucaryotes qui est en général associée à la mort cellulaire. Il est ainsi couramment utilisé comme indicateur de cytotoxicité. Pour mesurer l'activité cytotoxique des vibrios, des monocouches d'hémocytes sont préalablement incubées dans du 5µg/ml de Sytox green (dilué en Edmf) pendant 30 min. Pour déterminer si la cytotoxicité est dépendante de l'invasion cellulaire, la cytochalasine D (Sigma, 5µg/ml en Edmf) a été utilisée pour bloquer la phagocytose. De la même manière, les cellules ont été incubées avec du Z-VAD-FMK (InvivoGen, 10µg/ml en Edmf) pour déterminer si la cytotoxicité est dépendante des caspases. Les bactéries opsonisées en plasma sont ensuite ajoutées à une MOI de 50 bactéries pour 1 hémocyte (6.6 µl). Des puits sans bactéries sont prévus pour mesurer la lyse cellulaire spontanée indépendante des bactéries, ainsi que d'autres puits, où les hémocytes sont lysés par un détergent (triton 0,1% en Edmf) pour avoir une référence de 100% de lyse. Après centrifugation pendant 5 minutes à 400g à 20°C afin de synchroniser la phagocytose, le signal de la fluorescence du Sytox Green est mesuré en cinétique toutes les 30 minutes sur 15h à l'aide du lecteur de microplaque infinie M200 Tecan avec une longueur d'onde d'excitation de 480 nm et la lumière émise est mesurée à la longueur d'onde de 550 nm avec un gain fixe à 120. Les courbes de fluorescence obtenues sont ensuite transposées en pourcentage de lyse cellulaire, en utilisant la condition hémocytes en présence de triton comme équivalence de 100% de lyse cellulaire. Un test paramétrique RM-ANOVA à deux dimensions a été utilisé pour estimer la p-value afin de comparer les courbes de lyse cellulaire.

4.3 Test de survie intracellulaire

La croissance des vibrios a pu être mesurée dans des contacts hémocytes/vibrios grâce aux souches porteuses d'un plasmide high copy GFP générées dans cette étude. Après opsonisation, les bactéries GFP sont mises en contact avec les hémocytes en culture à une MOI de 50:1. La plaque est centrifugée 5 min à 400g à 20°C afin de synchroniser la phagocytose puis elle est incubée pendant 1 h à température ambiante. Les monocouches d'hémocytes sont ensuite lavées 3 fois avec de l'Edmf, afin d'éliminer le maximum de bactéries extracellulaires. Après lavage, la fluorescence des bactéries

est alors mesurée toutes les heures pendant 15 h au lecteur de microplaque infinie M200 Tecan avec une longueur d'onde d'excitation de 480 nm, une longueur d'onde d'émission de 520 nm et un gain fixe de 120. Des puits sans hémocytes contenant les bactéries aux mêmes concentrations que celles utilisées pour les contacts avec les hémocytes sont réalisés en parallèle pour suivre la croissance bactérienne seule en Edmf. Un test paramétrique RM-ANOVA à deux dimensions a été utilisé pour estimer la p-value afin de comparer la croissance des différentes souches.

4.4 Mesure de la production de ROS par les hémocytes *in vitro*

La production de peroxyde d'hydrogène est mesurée à l'aide du luminol (Sigma, luminol sodium salt) qui une fois oxydé va émettre de la luminescence. La mesure de la luminescence permet ainsi de suivre la production de ROS. Pour mesurer cette activité chez les hémocytes, des monocouches de cellules sont préalablement lavées 1 fois (200µl) en eau de mer après adhésion. Elles sont ensuite incubées dans du luminol 10 µM (dilué en Edmf) pendant 1 heure. Les particules de zymosan (MOI 50:1) ou la PMA (1 µM, Sigma) sont rapidement ajoutés aux hémocytes et la plaque est immédiatement placée dans le lecteur de plaque infinie M200 Tecan pour quantification de la luminescence toutes les 2 minutes pendant 2 heures avec un temps d'intégration de 1 seconde. Afin d'inhiber la production de ROS, 10 µM de chlorure de diphénylèneidonium est ajouté aux hémocytes avec le luminol 1 heure avant l'induction du burst oxydatif.

4.5 Microscopie photonique *in vitro*

Pour déterminer si l'augmentation de fluorescence mesurée au fluorimètre est bien révélatrice de la survie et de la croissance des bactéries phagocytées, des monocouches d'hémocytes ont été examinées au microscope à épifluorescence ou confocal au cours d'une cinétique similaire. Dans ce cas, les hémocytes sont mis en culture en suivant un protocole identique dans une plaque 24 puits (Costar), au fond desquels se trouve une lamelle de verre stérile. Tout au long de la cinétique (1, 3, et 5 h après contact), des lamelles sont transférées dans une nouvelle plaque contenant une solution de fixation de paraformaldéhyde 4% à pH 7 diluée en Edmf (PFA, Sigma). Après 15 min la solution de fixation remplacée par du PBS. Les cellules sont perméabilisées dans une solution de triton 0.01% (dilué en PBS) pendant 10 min à l'obscurité, puis 200µl d'une solution de PBS contenant du DAPI (0,25g/ml en PBS, Sigma) pour le marquage des acides nucléiques et du WGA-TRITC (0.5µg/ml en PBS, Sigma) pour marquer les membranes sont déposés dans les puits pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Après 3 lavages de PBS (500µl/puits), les lamelles sont prélevées dans les puits à l'aide d'une pince et d'une aiguille puis déposées sur 10µl de milieu de

montage (Dako) préalablement déposé sur une lame. Après une nuit de séchage à température ambiante dans une chambre noire, les lames ont été observées au microscope confocal Leica DM 2500 avec un objectif 63x ACS APO 13 ou au microscope à épifluorescence Zeiss Axioimager avec l'objectif Zeiss 63x Plan-Apo 1.4 oil au plateau Montpellier RIO Imaging.

5 Interaction huître/vibrio *in vivo*.

5.1 Infection expérimentale par injection

Les infections expérimentales ont été réalisées à 20°C et adaptées du protocole mis au point par Duperthuy et al (Duperthuy et al. 2010). Des huîtres juvéniles sont limées à hauteur du muscle adducteur ou anesthésiées selon le protocole de Suquet en 2009 (Marc Suquet 2009). Puis elles ont été disposées dans des bacs contenant 2 L d'eau de mer chacun et maintenus à 20°C (15 à 20 huîtres par bac et 2 ou 3 bacs par condition selon le nombre d'individus disponible). Pour les infections, 20µl de la suspension bactérienne ajustée à $3,7 \cdot 10^9$ CFU/ml en Edmf sont injectées dans le muscle adducteur des huîtres (1.5-2cm). Dans la condition contrôle, les huîtres sont injectées avec 20µl d'Edmf. Les mortalités ont été suivies sur 7 jours. La probabilité de survie a été calculée selon la méthode de Kaplan Meier et la p-value du test non paramétrique Log-Rank a été calculée.

5.2 Infection expérimentale par balnéation

Des cultures de *V.tasmaniensis* LGP32 et *V.tasmaniensis* LMG20 012T résistants au chloramphénicol sont utilisées pour inoculer les bacs dans lesquels sont effectuées les balnéations (volume final 20 L contenant 10^7 CFU/ml). Les huîtres (minimum 10 par lot) sont placées dans les bacs et l'expérience de balnéation est réalisée selon quatre conditions : balnéation pendant 6 heures et 24 heures soit avec la souche *V.tasmaniensis* LGP32 (T6h LGP32, T24h LGP32) soit avec la souche *V.tasmaniensis* LMG20 012T (T6h LMG20 012T, T24h LMG20 012T). L'hémolymphe des huîtres est ponctionnée (seringue 2,5 ml aiguille 23-G) au niveau de la cavité péricardique après avoir réalisé une encoche au niveau de la face dorsale de la coquille. Les prélèvements d'hémolymphe sont effectués sur les lots d'huîtres après 6 heures et 24 heures de balnéation avec la souche *V.tasmaniensis* LGP32 ou LMG20 012T. Après le prélèvement de chaque lot d'huître, les hémolymphe provenant d'au moins 10 huîtres sont regroupées dans un même tube. Les expériences de balnéation ont été reproduites trois fois avec deux lots d'huîtres indépendantes. Le dénombrement des *Vibrio tasmaniensis* LGP32 et LMG20 012T cultivables présents dans l'hémolymphe des huîtres s'effectue sur milieu sélectif avec Chloramphénicol (10µg/ml) après 48 heures d'incubation à 20°C. L'hémolymphe est étalée aux dilutions 10^{-1} et 10^{-2} (100 µl/boite) après

dilution successive au dixième avec de l'eau de mer. Une analyse statistique a été réalisée avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunn's.

5.3 Microscopie confocale *in vivo*

Une infection expérimentale a été réalisée selon la procédure décrite précédemment. Des groupes d'huîtres juvéniles (4-5cm) ont été injectés avec 40µl de suspension de vibrios exprimant la GFP ou la mCherry. De la protéine R5-7 fusionnée à la GFP (diluée en Hepes/NaCl) a été produite et purifiée par Yannick Labreuche et ses collaborateurs à Roscoff (France). Lorsque cela a été nécessaire, les vibrios ont été injectés avec de la protéine R5-7 (diluée dans du tampon Hepes, concentration finale de 4.5µg/µl) ou du tampon Hepes/NaCl utilisé comme contrôle. L'hémolymphe de 12 individus est prélevée à 2 heures, 4 heures et 8 heures après l'injection. Le prélèvement est fait à l'aide d'une seringue préalablement refroidie sur glace contenant 200µl de paraformaldéhyde 4% eau de mer. Une fois fixée, 200 µl d'hémolymphe sont centrifugés avec la centrifugeuse Cyto-TEK (Miles Scientific) à 600rpm pendant 10 minutes. Un marqueur de paraffine est utilisé pour encadrer la zone où se trouve l'échantillon. Les lames sont conservées dans l'obscurité à 4°C. Le lendemain, les cellules sont perméabilisées dans une solution (100µl/lame) de triton 0.01% (dilué en PBS) pendant 10 min à l'obscurité, puis une solution de PBS (50µl/lame) contenant du DAPI (0,025µg/ml en PBS, Sigma) et de la phalloïdine-TRITC (0.5µg/ml, Sigma) ou de la phalloïdine-iFluor 647 (0.5µg/ml, Abcam) est utilisée pour le marquage des acides nucléiques et l'actine filamenteuse pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages dans des bains de PBS, les lames sont séchées puis 10µl de milieu de montage (Dako) sont déposés sur la zone de l'échantillon sur la lame avant de réaliser le montage avec une lamelle. Après une nuit de séchage à température ambiante dans une chambre noire, les lames ont été observées au microscope confocal Leica DM 2500 avec un objectif 63x ACS APO 13 au plateau Montpellier RIO Imaging.

5.4 Microscopie Bi photonique *in vivo*.

Une infection expérimentale a été réalisée sur des huîtres juvéniles d'une taille égale à 1 cm. Les huîtres ont été injectées avec 7.5×10^7 CFU de vibrios préalablement lavés une fois. Les huîtres sont placées individuellement dans un bac de 200 ml d'eau de mer avec une aération. Du bleu Evans est ajouté à une concentration finale de 1%. Les huîtres sont incubées pendant 16h. Ensuite les huîtres sont retirées de leur coquille très délicatement en les ouvrant à l'aide d'un scalpel par la charnière. Elles sont placées dans des fluorodish (World Precision Instrument, Inc.) avec un fond en verre contenant 100 µl d'eau de mer stérile. De l'agar low melting (Sigma) 0,7% eau de mer stérile est ajouté (température inférieure à 30°C) tout autour de l'animal qui est maintenu au centre. Une

lamelle ronde est placée sur l'huître pour la maintenir à plat avant que l'agar ne se solidifie. Une fois l'agar rigidifié, les huîtres ont été observées au microscope multi photonique droit Zeiss 880 laser Coherent Chameleon ultra II de la plateforme MRI au campus Lavalette à Montpellier (Figure 32).

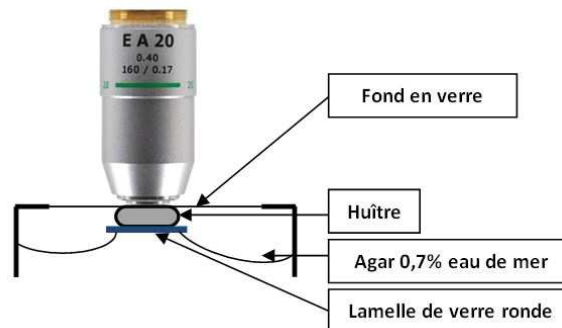


Figure 32 | Schéma représentant le montage pour l'imagerie intravivale

L'huître est maintenue en milieu aqueux à l'aide d'agar low melting eau de mer 0.7%. La fluorodish est retournée pour pouvoir observer l'huître au travers de la partie en verre de la boîte.

5.5 Microscopie électronique à transmission *in vivo*

Des groupes d'huîtres juvéniles (4-5cm) ont été injectés avec 1.5×10^8 CFU vibrios sans lavage. Un groupe contrôle a été injecté avec un volume équivalent (40 μ l) de LB NaCl 0.5 M. Après 2h et 8h d'infection, l'hémolymphe de 7 huîtres a été prélevée, mélangée et fixée avec une solution de fixation (4% paraformaldéhyde et 2.5% glutaraldehyde en eau de mer) pendant 1 heure à température ambiante. L'hémolymphe fixée est centrifugée à 1000g pendant 10 minutes pour concentrer le nombre de cellules. Le culot est resuspendu dans 2 ml de la solution de fixation et conservé à 4°C pendant la nuit. La fixation est terminée par une incubation dans 1% de tétroxyde d'osmium pendant 1 heure à température ambiante dans le noir. L'excès de fixateur est éliminé durant la déshydratation des échantillons dans une succession de bains de solution aqueuse contenant une quantité de plus en plus importante d'éthanol puis dans un bain d'acétone absolu. Pour finir, les échantillons fixés sont inclus dans une résine époxy (EmBed 812). Les sections (70nm d'épaisseur) sont marquées avec de l'uranyl d'acétate et observées avec le microscope électronique à transmission Tecnai F20 FEI 200KV de la plateforme MRI à Montpellier.

5.6 Histologie

Des groupes de 10 huîtres (1,5 cm) ont été injectés avec $7,5 \times 10^7$ CFU des deux souches virulentes exprimant la GFP et des groupes de 5 huîtres ont été injectés avec avec $7,5 \times 10^7$ CFU des deux souches non virulentes exprimant la GFP selon le protocole d'infection expérimentale. Deux huîtres injectées avec un volume d'eau de mer équivalent (20 μ l) et deux huîtres naïves ont été

utilisées comme contrôles. Les huîtres ont toutes été prélevées et décoquillées (en laissant la coquille inférieure pour préserver les tissus) 8 heures après l'injection puis fixées dans une solution de Davidson eau de mer (30% eau de mer stérile, 20% formaldéhyde, 10% Glycérol, 30% éthanol à 95%) pendant 36 heures à température ambiante. Après fixation, chaque individu a ensuite été transposé dans des tubes contenant 100 ml d'éthanol à 70%. Les échantillons ont ensuite été envoyés à la société Histalim à Montpellier en France. La coquille a été retirée puis les tissus ont été déshydratés et inclus dans de la paraffine avec automate d'inclusion. Les coupes longitudinales ont été réalisées avec un microtome. Les tissus ont été marqués avec de l'hématoxyline II et de l'éosine. Une solution tampon de révélation d'antigène Tris-EDTA pH 8,9 a été utilisée et la GFP des vibrios a été marquée avec un anticorps primaire (Anti-GFP ; Abcam, ab290) dilué au 1/5000e pendant 32 minutes à température ambiante. La révélation a été faite avec la phosphatase alcaline en rouge (PA-Red ; kit Ultraview red ; Roche). Les sections ont été scannées avec le scanner de lame Hamamatsu NANOZOOMER. Les hémocytes ont été observés au microscope avec l'objectif Zeiss 100x 1.4 oil à la plateforme MRI de Montpellier en France.

6 Biologie moléculaire

6.1 Extraction d'ADN et quantification des vibrio par RT-PCR

L'ADN génomique a été extrait avec un kit à ADN Promega (Wizard SV Genomic DNA Purification System) à partir des échantillons prélevés pour le RNAseq de l'huître. La concentration en ADN a été mesurée avec un spectrophotomètre NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Les qPCR ont été réalisées avec un système Light Cycler 480 (Roche) en utilisant 40 ng/ μ l d'ADN. Les primers spécifiques des souches de vibrio ont été construits pour amplifier un gène monocopie spécifique d'un génome de vibrio. Ils ont été construits à l'aide du logiciel Primer 3 plus (<http://primer3plus.com/>). L'efficacité et la spécificité des amorces ont été vérifiées sur l'ADN extrait à partir de 6 souches de vibrios. Pour quantifier le nombre de copies de génome d'huître, les amorces BPI ont été utilisées. La charge en vibrio dans les tissus de l'huître a été calculée comme le nombre de génome de vibrio par rapport aux copies de génome d'huître.

6.2 PCR de vérification des mutants

La PCR (polymerase chain reaction) a été utilisée sur colonies bactériennes pour valider les mutants de la souche LGP32 à l'aide d'amorces spécifiques des gènes d'intérêt et externes à la zone de délétion. Chaque réaction a été réalisée en utilisant 5 μ l de tampon 5X (Promega), 0,5 μ l de dNTP à 10 mM, 3 μ l de MgCl₂ 25mM, 1 μ l d'amorce sens à 10 μ M, 1 μ l d'amorce antisens à 10 μ M, 0,13 μ l de

Taq polymérase (Promega), 13.4 μ l d'eau RNase/DNase free et 1 colonie bactérienne (volume final 24 μ l). Nous avons utilisé des amorces synthétisées par Eurogentec. Les cycles d'amplification ont été établis de la manière suivante : une dénaturation initiale (10 min à 95°C) puis 35 cycles comprenant une phase de dénaturation (1 min à 95°C), une phase d'hybridation des amorces et une phase d'élongation du brin d'ADN (72°C, 1 min pour 1000 paires de bases). Enfin, la PCR s'est terminée par une élongation finale (5 minutes à 72°C). Les produits d'amplification ont ensuite été analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1%, dans du TAE 1X (4,8g de tris, 1,14 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'EDTA 0,5M pH=8). Les échantillons repris en tampon de chargement 6X (12% Ficoll 400, 0.06 M EDTA, pH8, 0.6% de sulfate de sodium dodecyl, 0.15% bleu de bromphénol et 0.15% xylène cyanol), effectuent une migration à 100V pendant 30 minutes. Le marqueur de taille utilisé est SmartLadder MW-1700-10 (1kb-Eurogentec). Les fragments d'acides nucléiques ont été révélés sous UV après un bain de bromure d'éthidium (BET, 0,5 μ g/ml).

6.3 Expérimentations pour le séquençage ARN d'huître

Trois infections expérimentales indépendantes ont été réalisées sur des huîtres juvéniles de la famille 14 du projet DECIPHER. Les huîtres ont été injectées avec LGP32, LMG20 012T, J2-9, J2-8 et de l'eau de mer comme contrôle. Les huîtres non traitées ont aussi été collectées pour comparer leurs transcriptome avec la réponse de l'huître à l'anesthésie et l'injection d'eau de mer. Pour chaque infections expérimentales et chaque conditions, 30 huîtres ont été collectées 8 heures après l'injection, juste avant les premières mortalités. Ces échantillons ont été extraits de la coquille et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec le broyeur Retsh Mixter Mill MM400 avec une bille de métal préalablement refroidi dans l'azote comme l'ensemble du matériel. Les poudres d'huître ont été lysées dans 1,6 ml de Trizol (Life technologies Inc.)

Les ARN ont été extraits avec le kit Direct-Zol RNA miniprep de Proteogene selon le protocole du fournisseur. La concentration des ARN et leur pureté a été vérifiée avec le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Les Ulis, France) et leur intégrité a été analysée par électrophorèse à capillarité avec l'instrument BioAnalyser Agilent 2100. La construction de la librairie du RNAseq et le séquençage ont été réalisés par Fasteris Company (Canada). Les librairies de cDNA sont construites et séquencées par illumina Hiseq, en paired-end reads de 2 X 75 pb. Le traitement des données a été fait sur la plateforme locale Galaxy (Afgan et al. 2016). Les scores Phred ont été vérifiés en utilisant l'outil du kit Fasq-X (Blankenberg et al. 2010) et étaient supérieur à 26 sur 90% de la longueur de toutes les séquences. Tout les reads étaient ainsi gardés pour les analyses. L'alignement sur le génome de référence de *C. gigas* (assemblage version V9, (Zhang et al. 2012a)) a été fait avec RNASTar (Galaxy Version 2.4.0d-2, (Dobin et al. 2013)). Les fichiers HTseq count ainsi

obtenus ont été utilisés pour compter le nombre de reads qui s'hybrident par gène annoté (Galaxy Version v0.6.1) (Anders et al. 2015). Pour finir le différentiel d'expression des gènes a été analysé avec le package Deseq2 (Love et al. 2014) entre les huîtres. Les fold change d'expression de gène entre les huîtres injectées avec des vibrios et les huîtres injectées avec de l'eau de mer sont considérés significatifs quand la p-value ajustée (P_{adj}) de la procédure de test multiple Benjamini-Hochberg dont le FDR (False discovery rate) était supérieur à 0.05. Le même seuil a été appliqué au fold change de l'expression des gènes entre les huîtres injectées avec de l'eau de mer et les huîtres naïves contrôle.

Comme les peptides antimicrobiens de *C. gigas* ne sont pas présent dans le génome de référence, le comptage des reads pour les AMP a été obtenu par alignement en utilisant DIAMOND 0.7.9 (Buchfink et al. 2015). La base de donnée des AMP a été préparée en utilisant diamond makedb et les reads pour chaque échantillon et réplicat ont été comparés à la base de donnée utilisant diamond blastx. Les alignements étaient filtrés avec le meilleurs succès et la e-value <1e-6. Le comptage des reads pour chaque AMP a été normalisé contre le nombre total de séquences pour chaque échantillon.

6.4 Annotation fonctionnelle

Des comparaisons blastX contre la base de données NR ont été réalisées pour chaque ensemble de gènes avec un nombre maximum de cible de 20 et une e-value minimale de 0.001. Les fichiers résultats XML ont été chargés sur Blast2GO (Conesa et al. 2005) pour l'alignement GO et l'annotation avec la version b2g_sep13 de la base de données B2G. Les catégories fonctionnelles correspondent aux gènes significativement modulés (331 gènes) qui ont été classés grâce à la bibliographie. Une heatmap de la moyenne du Log₂ fold change des 3 expérimentations indépendantes a été générée avec le logiciel cluster 3.0.

6.5 Validation du séquençage ARN d'huître par qPCR

Le résultat du séquençage a été validé par RT-qPCR sur les mêmes échantillons utilisés pour le séquençage. Les ADNc ont été synthétisés en utilisant la M-MLV RT (Invitrogen Inc.) avec 1 µg d'ARN et 250 ng de random primers. La qPCR en temps réel a été faite sur 40 ng/µl d'ADNc à la plateforme de qPCR de Montpellier en utilisant le système Light Cycler 480 (Roche) et des amorces spécifiques des gènes. L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode 2- $\Delta\Delta C_q$ avec une normalisation grâce aux gènes rps6 (GenBank FP004478), C23 (GenBank HS119070) et EF1 (GenBank AB123066).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Abi-Khalil, C., D. S. Finkelstein, G. Conejero, J. Du Bois, D. Destoumieux-Garzon, and J. L. Rolland. 2017. The paralytic shellfish toxin, saxitoxin, enters the cytoplasm and induces apoptosis of oyster immune cells through a caspase-dependent pathway. *Aquatic Toxicology* **190**:133-141.
- Abi-Khalil, C., C. Lopez-Joven, E. Abadie, V. Savar, Z. Amzil, M. Laabir, and J. L. Rolland. 2016. Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic *Vibrios*. *Toxins (Basel)* **8**.
- Achard, M. E., S. L. Stafford, N. J. Bokil, J. Chartres, P. V. Bernhardt, M. A. Schembri, M. J. Sweet, and A. G. McEwan. 2012. Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J* **444**:51-57.
- Achard, M. E., J. J. Tree, J. A. Holden, K. R. Simpfendorfer, O. L. Wijburg, R. A. Strugnell, M. A. Schembri, M. J. Sweet, M. P. Jennings, and A. G. McEwan. 2010. The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is required for systemic virulence. *Infect Immun* **78**:2312-2319.
- Afgan, E., D. Baker, M. van den Beek, D. Blankenberg, D. Bouvier, M. Cech, J. Chilton, D. Clements, N. Coraor, C. Eberhard, B. Gruning, A. Guerler, J. Hillman-Jackson, G. Von Kuster, E. Rasche, N. Soranzo, N. Turaga, J. Taylor, A. Nekrutenko, and J. Goecks. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res* **44**:W3-W10.
- Aguirre-Guzman, G., F. Ascencio, and D. Saulnier. 2005. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Dis Aquat Organ* **67**:201-207.
- Aladaileh, S., S. V. Nair, D. Birch, and D. A. Raftos. 2007. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**:48-63.
- Alderman, D. J. 1979. Epizootiology of *Marteilia-Refringens* in Europe. *Marine Fisheries Review* **41**:67-69.
- Alm, R. A., G. Mayrhofer, I. Kotlarski, and P. A. Manning. 1991. Amino-Terminal Domain of the El-Tor Hemolysin of *Vibrio-Cholerae-O1* Is Expressed in Classical Strains and Is Cytotoxic. *Vaccine* **9**:588-594.
- Amaro, C., E. Sanjuan, B. Fouz, D. Pajuelo, C. T. Lee, L. I. Hor, and R. Barrera. 2015. The Fish Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2: Epidemiology, Phylogeny, and Virulence Factors Involved in Warm-Water Vibriosis. *Microbiology Spectrum* **3**.
- Anders, S., P. T. Pyl, and W. Huber. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**:166-169.
- Anderson, R. S., G. Ozbay, D. H. Kingsley, and M. A. Strauss. 2011. Oyster Hemocyte Mobilization and Increased Adhesion Activity after Beta-Glucan Administration. *Journal of Shellfish Research* **30**:635-641.
- Arivalagan, J., T. Yarra, B. Marie, V. A. Sleight, E. Duvernois-Berthet, M. S. Clark, A. Marie, and S. Berland. 2017. Insights from the Shell Proteome: Biomineralization to Adaptation. *Molecular Biology and Evolution* **34**:66-77.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart, and A. J. Davison. 2001. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* **82**:865-870.
- Atkinson, S. and P. Williams. 2016. *Yersinia* virulence factors - a sophisticated arsenal for combating host defences. *F1000Res* **5**.

- Azema, P., J. B. Lamy, P. Boudry, T. Renault, M. A. Travers, and L. Degremont. 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution* **49**.
- Azema, P., M. A. Travers, J. De Lorgeril, D. Tourbiez, and L. Degremont. 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Vet Res* **46**:139.

-B-

- Baba, K., H. Shirai, A. Terai, K. Kumagai, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1991. Similarity of the Tdh Gene-Bearing Plasmids of *Vibrio-Cholerae* Non-01 and *Vibrio-Parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis* **10**:61-70.
- Bachere, E., A. Barranger, R. Bruno, J. Rouxel, D. Menard, D. Piquemal, and F. Akcha. 2017. Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **142**:51-58.
- Bachere, E., D. Chagot, and H. Grizel. 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev Comp Immunol* **12**:549-559.
- Bachere, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, and B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* **198**:149-168.
- Bachere, E., D. Hervio, and E. Mialhe. 1991. Luminol-Dependent Chemiluminescence by Hemocytes of 2 Marine Bivalves, *Ostrea-Edulis* and *Crassostrea-Gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **11**:173-180.
- Bachere, E., R. D. Rosa, P. Schmitt, A. C. Poirier, N. Merou, G. M. Charriere, and D. Destoumieux-Garzon. 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol*.
- Baek, W. K., H. S. Lee, M. H. Oh, M. J. Koh, K. S. Kim, and S. H. Choi. 2009. Identification of the *Vibrio vulnificus* *ahpCl* gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *Journal of Microbiology* **47**:624-632.
- Baker-Austin, C., J. A. Trinanes, N. G. H. Taylor, R. Hartnell, A. Siitonen, and J. Martinez-Urtaza. 2013. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change* **3**:73-77.
- Bang, Y. J., Z. W. Lee, D. Kim, I. Jo, N. C. Ha, and S. H. Choi. 2016. OxyR2 Functions as a Three-state Redox Switch to Tightly Regulate Production of Prx2, a Peroxiredoxin of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Biological Chemistry* **291**:16038-16047.
- Banin, E., D. Vassilakos, E. Orr, R. J. Martinez, and E. Rosenberg. 2003. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Current Microbiology* **46**:418-422.
- Basso, P., M. Ragno, S. Elsen, E. Reboud, G. Golovkine, S. Bouillot, P. Huber, S. Lory, E. Faudry, and I. Attree. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Pore-Forming Exolysin and Type IV Pili Cooperate To Induce Host Cell Lysis. *MBio* **8**.
- Benitez, J. A. and A. J. Silva. 2016. *Vibrio cholerae* hemagglutinin(HA)/protease: An extracellular metalloprotease with multiple pathogenic activities. *Toxicon* **115**:55-62.
- Bergsbaken, T., S. L. Fink, and B. T. Cookson. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* **7**:99-109.
- Bertinato, J., E. Swist, L. J. Plouffe, S. P. Brooks, and R. L'Abbe M. 2008. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J* **409**:731-740.
- Bharati, K. and N. K. Ganguly. 2011. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J Med Res* **133**:179-187.

- Bina, J. E., D. Provenzano, C. Wang, X. R. Bina, and J. J. Mekalanos. 2006. Characterization of the *Vibrio cholerae* vexAB and vexCD efflux systems. *Arch Microbiol* **186**:171-181.
- Bina, X. R., D. Provenzano, N. Nguyen, and J. E. Bina. 2008. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* **76**:3595-3605.
- Binesse, J., C. Delsert, D. Saulnier, M. C. Champomier-Verges, M. Zagorec, H. Munier-Lehmann, D. Mazel, and F. Le Roux. 2008. Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:7108-7117.
- Biosca, E. G., H. Llorens, E. Garay, and C. Amaro. 1993. Presence of a capsule in *Vibrio vulnificus* biotype 2 and its relationship to virulence for eels. *Infect Immun* **61**:1611-1618.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* **5**:9-19.
- Bishop, A. L., B. Patimalla, and A. Camilli. 2014. *Vibrio cholerae*-Induced Inflammation in the Neonatal Mouse Cholera Model. *Infection and Immunity* **82**:2434-2447.
- Bittner, L. M., A. Kraus, S. Schakermann, and F. Narberhaus. 2017. The Copper Efflux Regulator CueR Is Subject to ATP-Dependent Proteolysis in *Escherichia coli*. *Front Mol Biosci* **4**:9.
- Blankenberg, D., G. Von Kuster, N. Coraor, G. Ananda, R. Lazarus, M. Mangan, A. Nekrutenko, and J. Taylor. 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 19**:Unit 19 10 11-21.
- Boardman, B. K. and K. J. F. Satchell. 2004. *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *Journal of Bacteriology* **186**:8137-8143.
- Borgstahl, G. E. O., H. E. Parge, M. J. Hickey, W. F. Beyer, R. A. Hallewell, and J. A. Tainer. 1992. The Structure of Human Mitochondrial Manganese Superoxide-Dismutase Reveals a Novel Tetrameric Interface of 2 4-Helix Bundles. *Cell* **71**:107-118.
- Botella, H., P. Peyron, F. Levillain, R. Poincloux, Y. Poquet, I. Brandli, C. Wang, L. Tailleux, S. Tilleul, G. M. Charriere, S. J. Waddell, M. Foti, G. Lugo-Villarino, Q. Gao, I. Maridonneau-Parini, P. D. Butcher, P. R. Castagnoli, B. Gicquel, C. de Chastellier, and O. Neyrolles. 2011. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* **10**:248-259.
- Botella, H., G. Stadthagen, G. Lugo-Villarino, C. de Chastellier, and O. Neyrolles. 2012. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol* **20**:106-112.
- Braymer, J. J. and D. P. Giedroc. 2014. Recent developments in copper and zinc homeostasis in bacterial pathogens. *Curr Opin Chem Biol* **19**:59-66.
- Brennan, M. A. and B. T. Cookson. 2000. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**:31-40.
- Brenz, Y., D. Ohnezeit, H. C. Winther-Larsen, and M. Hagedorn. 2017. Nramp1 and NrampB Contribute to Resistance against *Francisella* in *Dictyostelium*. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:282.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**:1532-1535.
- Brooks, J. F., M. C. Gyllborg, D. C. Cronin, S. J. Quillin, C. A. Mallama, R. Foxall, C. Whistler, A. L. Goodman, and M. J. Mandel. 2014. Global discovery of colonization determinants in the squid symbiont *Vibrio fischeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**:17284-17289.
- Brooks, T. M., D. Unterweger, V. Bachmann, B. Kostiuik, and S. Pukatzki. 2013. Lytic Activity of the *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Toxin VgrG-3 Is Inhibited by the Antitoxin TsaB. *Journal of Biological Chemistry* **288**:7618-7625.
- Bruto, M., A. James, B. Petton, Y. Labreuche, S. Chenivresse, M. Alunno-Bruscia, M. F. Polz, and F. Le Roux. 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *Isme Journal* **11**:1043-1052.

- Buchfink, B., C. Xie, and D. H. Huson. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* **12**:59-60.
- Burioli, E. A. V., M. Prearo, and M. Houssin. 2017. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 mu Var isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology* **509**:239-251.

-C-

- Cardinaud, M., N. M. Dheilly, S. Huchette, D. Moraga, and C. Paillard. 2015. The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection. *Developmental and Comparative Immunology* **51**:287-297.
- Ceccarelli, D., N. A. Hasan, A. Huq, and R. R. Colwell. 2013. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- Chakraborty, K., S. Ghosh, H. Koley, A. K. Mukhopadhyay, T. Ramamurthy, D. R. Saha, D. Mukhopadhyay, S. Roychowdhury, T. Hamabata, Y. Takeda, and S. Das. 2008. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**:2520-2537.
- Chang, T. M., Y. C. Chuang, J. H. Su, and M. C. Chang. 1997. Cloning and sequence analysis of a novel hemolysin gene (vIly) from *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:3851-3857.
- Chen, C. L., S. Y. Fen, C. H. Chung, S. C. Yu, C. L. Chien, and H. C. Wong. 2016a. Functions of VPA1418 and VPA0305 Catalase Genes in Growth of *Vibrio parahaemolyticus* under Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:1859-1867.
- Chen, H., Z. Zhou, H. Wang, L. L. Wang, W. L. Wang, R. Liu, L. M. Qiu, and L. S. Song. 2016b. An invertebrate-specific and immune-responsive microRNA augments oyster haemocyte phagocytosis by targeting CgI kappa B2. *Scientific Reports* **6**.
- Chen, Y. C., M. C. Chang, Y. C. Chuang, and C. L. Jeang. 2004. Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Current Microbiology* **49**:175-179.
- Cheng, T. C. B. R. W. 1965. Relationships between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: Histopathology and Sites of Infection. *Chesapeake Science* **6**.
- Choi, H. M., V. A. Beck, and N. A. Pierce. 2014. Next-generation in situ hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability. *ACS Nano* **8**:4284-4294.
- Chung, C. H., S. Y. Fen, S. C. Yu, and H. C. Wong. 2016. Influence of oxyR on Growth, Biofilm Formation, and Mobility of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:788-796.
- Chung, C. H., T. Y. Ma, S. Y. Fen, and H. C. Wong. 2014. Activities of Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunits C1 and C2 of *Vibrio parahaemolyticus* against Different Peroxides. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:7398-7404.
- CNC. 2015. Comité de la conchyliculture. Les statistiques: la production Française.
- Cobbold, C., J. Coventry, S. Ponnambalam, and A. P. Monaco. 2003. The Menkes disease ATPase (ATP7A) is internalized via a Rac1-regulated, clathrin- and caveolae-independent pathway. *Hum Mol Genet* **12**:1523-1533.
- Comps, M., and Duthoit, J.L. 1976. Infection virale associée à la maladie des branchies de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *Académie des Sciences*.
- Comps, M., and Duthoit, J.L. 1979. Infection virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *Crassostrea gigas* (Th.). *Haliotis*.
- Conesa, A., S. Gotz, J. M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon, and M. Robles. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**:3674-3676.

- Cooper, G. E., Z. C. Pounce, J. C. Wallington, L. Y. Bastidas-Legarda, B. Nicholas, C. Chidomere, E. C. Robinson, K. Martin, A. S. Tocheva, M. Christodoulides, R. Djukanovic, T. M. A. Wilkinson, and K. J. Staples. 2016. Viral Inhibition of Bacterial Phagocytosis by Human Macrophages: Redundant Role of CD36. *PLoS One* **11**.
- Cordero, C. L., D. S. Kudryashov, E. Reisler, and K. J. F. Satchell. 2006. The actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin. *Journal of Biological Chemistry* **281**:32366-32374.
- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory, and I. Stainier. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:1315-+.
- Costa, T. R. D., C. Felisberto-Rodrigues, A. Meir, M. S. Prevost, A. Redzej, M. Trokter, and G. Waksman. 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature reviews Microbiology* **13**:343-359.
- Culotta, V. C., L. W. Klomp, J. Strain, R. L. Casareno, B. Krems, and J. D. Gitlin. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* **272**:23469-23472.

-D-

- Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* **154**:171-177.
- Davison, A. J., B. L. Trus, N. Q. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff, and T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* **86**:41-53.
- de Kantzow, M., P. Hick, J. A. Becker, and R. J. Whittington. 2016. Effect of water temperature on mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with microvariant ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1 mu Var). *Aquaculture Environment Interactions* **8**:419-428.
- de Lorgeril, J., R. Zenagui, R. D. Rosa, D. Piquemal, and E. Bachere. 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PLoS One* **6**:e23142.
- de Souza Santos, M. and K. Orth. 2014. Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *MBio* **5**:e01506-01514.
- de Souza Santos, M., D. Salomon, and K. Orth. 2017. T3SS effector VopL inhibits the host ROS response, promoting the intracellular survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS Pathog* **13**:e1006438.
- Degremont, L. 2013. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **416**:129-134.
- Delgado-Rizo, V., M. A. Martinez-Guzman, L. Iniguez-Gutierrez, A. Garcia-Orozco, A. Alvarado-Navarro, and M. Fafutis-Morris. 2017. Neutrophil extracellular Traps and its implications in inflammation: An Overview. *Frontiers in Immunology* **8**.
- Destoumieux-Garzon, D., M. Duperthuy, A. S. Vanhove, P. Schmitt, and S. N. Wai. 2014. Resistance to Antimicrobial Peptides in *Vibrios*. *Antibiotics (Basel)* **3**:540-563.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15-21.
- Dolores, J. S., S. Agarwal, M. Egerer, and K. J. F. Satchell. 2015. *Vibrio cholerae* MARTX toxin heterologous translocation of beta-lactamase and roles of individual effector domains on cytoskeleton dynamics. *Molecular Microbiology* **95**:590-604.
- Donaghy, L., E. Kraffe, N. Le Goic, C. Lambert, A. K. Volety, and P. Soudant. 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS One* **7**.

- Dubert, J., J. A. Aranda-Burgos, J. Ojea, J. L. Barja, and S. Prado. 2017. Mortality event involving larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in a hatchery: isolation of the pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus*. *Journal of Fish Diseases* **40**:1185-1193.
- Dubert, J., D. R. Nelson, E. J. Spinard, L. Kessner, M. Gomez-Chiarri, F. Costa, S. Prado, and J. L. Barja. 2016. Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. *J Invertebr Pathol* **133**:27-33.
- Duperthuy, M., J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, A. Givaudan, D. Mazel, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* **12**:951-963.
- Duperthuy, M., P. Schmitt, E. Garzon, A. Caro, R. D. Rosa, F. Le Roux, N. Lautredou-Audouy, P. Got, B. Romestand, J. de Lorgeril, S. Kieffer-Jaquinod, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:2993-2998.
- Duperthuy, M., A. E. Sjostrom, D. Sabharwal, F. Damghani, B. E. Uhlin, and S. N. Wai. 2013. Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **9**:e1003620.
- Durand, E., E. Derrez, G. Audoly, S. Spinelli, M. Ortiz-Lombardia, D. Raoult, E. Cascales, and C. Cambillau. 2012. Crystal Structure of the VgrG1 Actin Cross-linking Domain of the *Vibrio cholerae* Type VI Secretion System. *Journal of Biological Chemistry* **287**.

-E-

- El-Malah, S. S., Z. Q. Yang, M. Z. Hu, Q. C. Li, Z. M. Pan, and X. N. Jiao. 2014. *Vibrio parahaemolyticus* strengthens their virulence through modulation of cellular reactive oxygen species in vitro. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**.
- Elluri, S., C. Enow, S. Vdovikova, P. K. Rompikuntal, M. Dongre, S. Carlsson, A. Pal, B. E. Uhlin, and S. N. Wai. 2014. Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains. *PLoS One* **9**.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**:495-516.
- Escoubas, J. M., L. Briant, C. Montagnani, S. Hez, C. Devaux, and P. Roch. 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *Febs Letters* **453**:293-298.
- Estes, R. M., C. S. Friedman, R. A. Elston, and R. P. Herwig. 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **58**:223-230.

-F-

- Fallarino, A., S. R. Attridge, P. A. Manning, and T. Focareta. 2002. Cloning and characterization of a novel haemolysin in *Vibrio cholerae* O1 that does not directly contribute to the virulence of the organism. *Microbiology* **148**:2181-2189.
- Fang, F. C. 2011. Antimicrobial Actions of Reactive Oxygen Species. *MBio* **2**.
- FAO. 2012. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Faury, N., D. Saulnier, F. L. Thompson, M. Gay, J. Swings, and F. Le Roux. 2004. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**:2137-2140.
- Festa, R. A. and D. J. Thiele. 2011. Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* **21**:R877-883.

- Figueroa-Arredondo, P., J. E. Heuser, N. S. Akopyants, J. H. Morisaki, S. Giono-Cerezo, F. Enriquez-Rincon, and D. E. Berg. 2001. Cell vacuolation caused by *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infection and Immunity* **69**:1613-1624.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* **73**:1907-1916.
- Fiore, A. E., J. M. Michalski, R. G. Russell, C. L. Sears, and J. B. Kaper. 1997. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* **65**:3112-3117.
- Fisher, C. R., E. E. Wyckoff, E. D. Peng, and S. M. Payne. 2016. Identification and Characterization of a Putative Manganese Export Protein in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **198**:2810-2817.
- Flannagan, R. S., G. Cosio, and S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology* **7**:355-366.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouille, and S. Grinstein. 2012. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, Vol 7* **7**:61-98.
- Fleury, E., A. Huvet, C. Lelong, J. de Lorgeril, V. Boulo, Y. Gueguen, E. Bachere, A. Tanguy, D. Moraga, C. Fabioux, P. Lindeque, J. Shaw, R. Reinhardt, P. Prunet, G. Davey, S. Lapegue, C. Sauvage, C. Corporeau, J. Moal, F. Gavory, P. Wincker, F. Moreews, C. Klopp, M. Mathieu, P. Boudry, and P. Favrel. 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **10**:341.
- Folz, R. J. and J. D. Crapo. 1994. Extracellular-Superoxide Dismutase (Sod3) - Tissue-Specific Expression, Genomic Characterization, and Computer-Assisted Sequence-Analysis of the Human Ec-Sod Gene (Vol 22, Pg 162, 1994). *Genomics* **23**:723-723.
- Forbes, J. R. and P. Gros. 2003. Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* **102**:1884-1892.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing, and D. H. Nies. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:3804-3812.
- Frans, I., C. W. Michiels, P. Bossier, K. A. Willems, B. Lievens, and H. Rediers. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* **34**:643-661.
- Freeman, S. A. and S. Grinstein. 2014. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev* **262**:193-215.
- Fuhrmann, M., B. Petton, V. Quillien, N. Faury, B. Morga, and F. Pernet. 2016. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture Environment Interactions* **8**:543-552.
- Fullner, K. J. and J. J. Mekalanos. 2000. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J* **19**:5315-5323.

-G-

- Gabbianelli, R., C. Signoretti, I. Marta, A. Battistoni, and L. Nicolini. 2004. *Vibrio cholerae* periplasmic superoxide dismutase: isolation of the gene and overexpression of the protein. *Journal of Biotechnology* **109**:123-130.
- Gadwal, S., K. V. Korotkov, J. R. Delarosa, W. G. J. Hol, and M. Sandkvist. 2014. Functional and Structural Characterization of *Vibrio cholerae* Extracellular Serine Protease B, VesB. *Journal of Biological Chemistry* **289**:8288-8298.
- Galtsoff, P. S. 1964. *The american oyster Crassostrea virginica* Gmelin. Washington, D.C.: US Department of Interior.
- Garnier, M., Y. Labreuche, and J. L. Nicolas. 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**:358-365.

- Gay, M., F. C. J. Berthe, and F. Le Roux. 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **59**:49-56.
- Gay, M., T. Renault, A. M. Pons, and F. Le Roux. 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**:65-74.
- Gerdol, M., P. Venier, and A. Pallavicini. 2015. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1 q gene family in *Bivalvia*. *Developmental and Comparative Immunology* **49**:59-71.
- German, N., D. Doyscher, and C. Rensing. 2013. Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* **8**:1257-1264.
- Glerum, D. M. and A. Tzagoloff. 1997. Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett* **412**:410-414.
- Goarant, C., Y. Reynaud, D. Ansquer, S. de Decker, D. Saulnier, and F. le Roux. 2006. Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Syst Appl Microbiol* **29**:570-580.
- Gold, B., H. Deng, R. Bryk, D. Vargas, D. Eliezer, J. Roberts, X. Jiang, and C. Nathan. 2008. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nature Chemical Biology* **4**:609-616.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, G. Desserre, J. de Lorgeril, B. Romestand, and E. Bachere. 2007a. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **31**:332-339.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugnieri, F. Roquet, J. M. Escoubas, F. Vandenbulcke, O. Levy, L. Saune, P. Bulet, and E. Bachere. 2007b. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:17759-17764.
- Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M. C. Lebart, Y. Gueguen, and E. Bachere. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* **338**:1089-1097.
- Goudenege, D., M. A. Travers, A. Lemire, B. Petton, P. Haffner, Y. Labreuche, D. Tourbiez, S. Mangenot, A. Calteau, D. Mazel, J. L. Nicolas, A. Jacq, and F. Le roux. 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environmental Microbiology* **17**:4189-4199.
- Graf, M., M. Mardirossian, F. Nguyen, A. C. Seefeldt, G. Guichard, M. Scocchi, C. A. Innis, and D. N. Wilson. 2017. Proline-rich antimicrobial peptides targeting protein synthesis. *Nat Prod Rep* **34**:702-711.
- Gratacap, R. L. and R. T. Wheeler. 2014. Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions. *Dev Comp Immunol* **46**:108-115.
- Green, E. R. and J. Meccas. 2016. *Bacterial Secretion Systems: An Overview*. *Microbiology Spectrum* **4**.
- Green, T. J. and C. Montagnani. 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 mu var). *Fish & Shellfish Immunology* **35**:382-388.
- Green, T. J., D. Raftos, P. Speck, and C. Montagnani. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* **96**:2471-2482.
- Gueguen, Y., J. P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A. L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere, and J. M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**:139-145.
- Gueguen, Y., A. Herpin, A. Aumelas, J. Garnier, J. Fievet, J. M. Escoubas, P. Bulet, M. Gonzalez, C. Lelong, P. Favrel, and E. Bachere. 2006. Characterization of a defensin from the oyster

- Crassostrea gigas - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **281**:313-323.
- Gueguen, Y., B. Romestand, J. Fievet, P. Schmitt, D. Destoumieux-Garzon, F. Vandenbulcke, P. Bulet, and E. Bachere. 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology* **46**:516-522.

-H-

- Hada, H. S., P. A. West, J. V. Lee, J. Stemmler, and R. R. Colwell. 1984. *Vibrio-Tubiashii* Sp-Nov, a Pathogen of Bivalve Mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**:1-4.
- Hankins, J. V., J. A. Madsen, D. K. Giles, B. M. Childers, K. E. Klose, J. S. Brodbelt, and M. S. Trent. 2011. Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Molecular Microbiology* **81**:1313-1329.
- Hasegawa, H., E. J. Lind, M. A. Boin, and C. C. Hase. 2008. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:4101-4110.
- He, X. C., Y. Zhang, F. Yu, and Z. N. Yu. 2011. A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish & Shellfish Immunology* **31**:1247-1250.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Y. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter, and C. M. Fraser. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
- Henderson, D. P. and S. M. Payne. 1994. *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infect Immun* **62**:5120-5125.
- Henderson, J. C., C. D. Fage, J. R. Cannon, J. S. Brodbelt, A. T. Keatinge-Clay, and M. S. Trent. 2014. Antimicrobial peptide resistance of *Vibrio cholerae* results from an LPS modification pathway related to nonribosomal peptide synthetases. *ACS Chem Biol* **9**:2382-2392.
- Hill, P. J., J. Stritzker, M. Scadeng, U. Geissinger, D. Haddad, T. C. Basse-Lusebrink, U. Gbureck, P. Jakob, and A. A. Szalay. 2011. Magnetic resonance imaging of tumors colonized with bacterial ferritin-expressing *Escherichia coli*. *PLoS One* **6**:e25409.
- Hine, P. M. 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* **9**:367-385.
- Hirono, I., T. Masuda, and T. Aoki. 1996. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis* **21**:173-182.
- Hiyoshi, H., T. Kodama, K. Saito, K. Gotoh, S. Matsuda, Y. Akeda, T. Honda, and T. Iida. 2011. VopV, an F-Actin-Binding Type III Secretion Effector, Is Required for *Vibrio parahaemolyticus*-Induced Enterotoxicity. *Cell Host & Microbe* **10**:401-409.
- Hodgkinson, V. and M. J. Petris. 2012. Copper Homeostasis at the Host-Pathogen Interface. *Journal of Biological Chemistry* **287**:13549-13555.
- Huang, B., L. Zhang, Y. Du, F. Xu, L. Li, and G. Zhang. 2017. Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates. *Sci Rep* **7**:8217.
- Hwang, W., N. Y. Lee, J. Kim, M. A. Lee, K. S. Kim, K. H. Lee, and S. J. Park. 2011. Functional Characterization of EpsC, a Component of the Type II Secretion System, in the Pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* **79**:4068-4080.

-I-

- Ichinose, Y., K. Yamamoto, N. Nakasone, M. J. Tanabe, T. Takeda, T. Miwatani, and M. Iwanaga. 1987. Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* **55**:1090-1093.
- Iizuka, M., T. Nagasaki, K. G. Takahashi, M. Osada, and N. Itoh. 2014. Involvement of Pacific oyster CgPGRP-S1S in bacterial recognition, agglutination and granulocyte degranulation. *Dev Comp Immunol* **43**:30-34.
- Imlay, J. A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry* **77**:755-776.
- Imlay, J. A. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews Microbiology* **11**:443-454.
- In-Hye, K., J. S. Kim, and J. K. Lee. 2007. The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**:1399-1402.
- Ishihara, M., A. Kawanishi, H. Watanabe, K. Tomochika, S. Miyoshi, and S. Shinoda. 2002. Purification of a serine protease of *Vibrio parahaemolyticus* and its characterization. *Microbiol Immunol* **46**:298-303.
- Itoh, N., R. Kamitaka, K. G. Takahashi, and M. Osada. 2010a. Identification and characterization of multiple beta-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**:445-454.
- Itoh, N., R. Kamitaka, K. G. Takahashi, and M. Osada. 2010b. Identification and characterization of multiple beta-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **34**:445-454.
- Itoh, N. and K. G. Takahashi. 2007. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **148**:160-166.
- Itoh, N. and K. G. Takahashi. 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **150**:409-417.

-J-

- Jemaa, M., N. Morin, P. Cavelier, J. Cau, J. M. Strub, and C. Delsert. 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *J Exp Biol* **217**:3067-3077.
- Jia, Z. H., T. Zhang, S. Jiang, M. Q. Wang, Q. Cheng, M. Z. Sun, L. L. Wang, and L. S. Song. 2015. An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Developmental and Comparative Immunology* **53**:253-264.
- Jiang, S., Z. H. Jia, T. Zhang, L. L. Wang, L. M. Qiu, J. S. Sun, and L. S. Song. 2016. Functional characterisation of phagocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peerj* **4**.
- Jo, P. G., Y. K. Choi, and C. Y. Choi. 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **147**:460-469.
- Jones, M. K. and J. D. Oliver. 2009. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun* **77**:1723-1733.
- Jorgensen, I. and E. A. Miao. 2015. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunological Reviews* **265**:130-142.

-K-

- Kambe, T., T. Tsuji, A. Hashimoto, and N. Itsumura. 2015. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* **95**:749-784.
- Kaper, J. B., J. G. Morris, and M. M. Levine. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews* **8**:48-86.
- Kawasaki, T. and T. Kawai. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* **5**:461.
- Kennedy, V. S. N. R. I. E. a. E. A. F. 1996. The eastern oyster *Crassostrea virginica*. A Marineland Sea Grant Book, College Park, Maryland.
- Kim, E. H., D. H. Nies, M. M. McEvoy, and C. Rensing. 2011. Switch or Funnel: How RND-Type Transport Systems Control Periplasmic Metal Homeostasis. *Journal of Bacteriology* **193**:2381-2387.
- Kim, J. S., M. H. Sung, D. H. Kho, and J. K. Lee. 2005. Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *Journal of Bacteriology* **187**:5984-5995.
- Kim, S., Y. J. Bang, D. Kim, J. G. Lim, M. H. Oh, and S. H. Choi. 2014. Distinct characteristics of OxyR2, a new OxyR-type regulator, ensuring expression of Peroxiredoxin 2 detoxifying low levels of hydrogen peroxide in *Vibrio vulnificus*. *Molecular Microbiology* **93**:992-1009.
- Kim, S. K., J. Y. Yang, and J. Cha. 2002. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* **283**:277-286.
- Kim, Y. R., B. U. Kim, S. Y. Kim, C. M. Kim, H. S. Na, J. T. Koh, H. E. Choy, J. H. Rhee, and S. E. Lee. 2010. Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytolysin-hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity (vol 399, pg 607, 2010). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **403**:491-492.
- Kimoto, R., T. Funahashi, N. Yamamoto, S. Miyoshi, S. Narimatsu, and S. Yamamoto. 2001. Identification and characterization of the *sodA* genes encoding manganese superoxide dismutases in *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol* **45**:135-142.
- Kimura, T. and T. Kambe. 2016. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci* **17**:336.
- Kitaoka, M., S. T. Miyata, D. Unterweger, and S. Pukatzki. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol* **60**:397-407.
- Knowles, G., J. Handlinger, B. Jones, and N. Moltschanivskyj. 2014. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. *J Invertebr Pathol* **121**:78-84.
- Kono, H. and K. L. Rock. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* **8**:279-289.
- Koo, B. S., J. H. Lee, S. C. Kim, H. Y. Yoon, K. A. Kim, K. B. Kwon, H. R. Kim, J. W. Park, and B. H. Park. 2007. Phospholipase A as a potent virulence factor of *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Molecular Medicine* **20**:913-918.
- Kreger, A. S., A. W. Bernheimer, L. A. Etkin, and L. W. Daniel. 1987. Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infection and Immunity* **55**:3209-3212.
- Kudryashov, D. S., Z. A. O. Durer, A. J. Ytterberg, M. R. Sawaya, I. Pashkov, K. Prochazkova, T. O. Yeates, R. R. O. Loo, J. A. Loo, K. J. F. Satchell, and E. Reisler. 2008. Connecting actin monomers by iso-peptide bond is a toxicity mechanism of the *Vibrio cholerae* MARTX toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:18537-18542.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology* **30**:16-34.

- Labreuche, Y., F. Le Roux, J. Henry, C. Zatylny, A. Huvet, C. Lambert, P. Soudant, D. Mazel, and J. L. Nicolas. 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* **29**:753-758.
- Labreuche, Y., P. Soudant, M. Goncalves, C. Lambert, and J. L. Nicolas. 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **30**:367-379.
- Ladomersky, E., A. Khan, V. Shanbhag, J. S. Cavet, J. Chan, G. A. Weisman, and M. J. Petris. 2017. Host and Pathogen Copper-Transporting P-Type ATPases Function Antagonistically during *Salmonella* Infection. *Infect Immun* **85**.
- Ladomersky, E. and M. J. Petris. 2015. Copper tolerance and virulence in bacteria. *Metallomics* **7**:957-964.
- Lambeth, J. D. 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* **4**:181-189.
- Le Deuff, R. M. and T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology* **80**:1317-1322.
- Le Roux, F. 2016. Diagnosis of vibriosis in the era of genomics: lessons from invertebrates. *Rev Sci Tech* **35**:259-269.
- Le Roux, F., J. Binesse, D. Saulnier, and D. Mazel. 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:777-784.
- Le Roux, F., B. M. Davis, and M. K. Waldor. 2011. Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Res* **39**:1004-1013.
- Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J. L. Nicolas, and F. Berthe. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources* **15**:251-258.
- Le Roux, F., M. Zouine, N. Chakroun, J. Binesse, D. Saulnier, C. Bouchier, N. Zidane, L. Ma, C. Rusniok, A. Lajus, C. Buchrieser, C. Medigue, M. F. Polz, and D. Mazel. 2009. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental Microbiology* **11**:1959-1970.
- Lee, C. Y., M. F. Cheng, M. S. Yu, and M. J. Pan. 2002a. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fems Microbiology Letters* **209**:31-37.
- Lee, J., M. M. Pena, Y. Nose, and D. J. Thiele. 2002b. Biochemical characterization of the human copper transporter *Ctr1*. *J Biol Chem* **277**:4380-4387.
- Lee, J. H., S. H. Ahn, S. H. Kim, Y. H. Choi, K. J. Park, and I. S. Kong. 2002c. Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhIA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem Biophys Res Commun* **298**:269-276.
- Lee, W. L., J. M. Grimes, and R. C. Robinson. 2015. *Yersinia* effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**:248-255.
- Lemire, A., D. Goudenege, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche, and F. Le Roux. 2014. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J*.
- Li, H., H. Zhang, S. Jiang, W. L. Wang, L. S. Xin, H. Wang, L. L. Wang, and L. S. Song. 2015. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system. *Fish & Shellfish Immunology* **44**:566-575.
- Li, L., X. Y. Mou, and D. R. Nelson. 2013. Characterization of Plp, a phosphatidylcholine-specific phospholipase and hemolysin of *Vibrio anguillarum*. *Bmc Microbiology* **13**.

- Li, Y., X. Song, W. Wang, L. Wang, Q. Yi, S. Jiang, Z. Jia, X. Du, L. Qiu, and L. Song. 2017. The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **71**:59-69.
- Linhartova, I., L. Bumba, J. Masin, M. Basler, R. Osicka, J. Kamanova, K. Prochazkova, I. Adkins, J. Hejnova-Holubova, L. Sadilkova, J. Morova, and P. Sebo. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **34**:1076-1112.
- Linkous, D. A. and J. D. Oliver. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* **174**:207-214.
- Litwin, C. M., T. W. Rayback, and J. Skinner. 1996. Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect Immun* **64**:2834-2838.
- Liu, M., M. Y. Yan, L. Z. Liu, and S. Chen. 2013. Characterization of a novel zinc transporter ZnuA acquired by *Vibrio parahaemolyticus* through horizontal gene transfer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- Liu, P. C. and K. K. Lee. 1999. Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* **28**:428-430.
- Lo, H. R., J. H. Lin, Y. H. Chen, C. L. Chen, C. P. Shao, Y. C. Lai, and L. I. Hor. 2011. RTX Toxin Enhances the Survival of *Vibrio vulnificus* During Infection by Protecting the Organism From Phagocytosis. *Journal of Infectious Diseases* **203**:1866-1874.
- Loker, E. S., C. M. Adema, S. M. Zhang, and T. B. Kepler. 2004. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev* **198**:10-24.
- Lokmer, A., M. A. Goedknecht, D. W. Thielges, D. Fiorentino, S. Kuenzel, J. F. Baines, and K. M. Wegner. 2016a. Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Lokmer, A., S. Kuenzel, J. F. Baines, and K. M. Wegner. 2016b. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology* **18**:970-987.
- Lokmer, A. and K. M. Wegner. 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *Isme Journal* **9**:670-682.
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**:550.
- Lutsenko, S., N. L. Barnes, M. Y. Bartee, and O. Y. Dmitriev. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* **87**:1011-1046.

-M-

- Ma, A. T., S. McAuley, S. Pukatzki, and J. J. Mekalanos. 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell Host & Microbe* **5**:234-243.
- Ma, L., A. Terwilliger, and A. W. Maresso. 2015. Iron and zinc exploitation during bacterial pathogenesis. *Metallomics* **7**:1541-1554.
- Macomber, L. and J. A. Imlay. 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:8344-8349.
- Makino, K., K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**:743-749.
- Mandel, M. J. and A. K. Dunn. 2016. Impact and Influence of the Natural *Vibrio*-Squid Symbiosis in Understanding Bacterial-Animal Interactions. *Frontiers in Microbiology* **7**:1982.
- Marc Suquet, G. d. K., Ricardo Gonzalez Araya, Isabelle Queau, Luc Lebrun, Pierrick Le Souchu and Christian Mingant. 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **22**.

- Martenot, C., O. Gervais, B. Chollet, M. Houssin, and T. Renault. 2017. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *PLoS One* **12**.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaille, J. P. Malas, and M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* **160**:25-31.
- Mathur, J., B. M. Davis, and M. K. Waldor. 2007. Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigma(E) regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Molecular Microbiology* **63**:848-858.
- Mathur, J. and M. K. Waldor. 2004. The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**:3577-3583.
- Matson, J. S., H. J. Yoo, K. Hakansson, and V. J. Dirita. 2010. Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J Bacteriol* **192**:2044-2052.
- Matsumoto, T., A. M. Nakamura, and K. G. Takahashi. 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **145**:325-330.
- McCaffrey, R. L. and L. A. H. Allen. 2006. Pivotal Advance: *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology* **80**:1224-1230.
- McCullers, J. A. 2006. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* **19**:571-582.
- Meno, Y., M. K. Waldor, J. J. Mekalanos, and K. Amako. 1998. Morphological and physical characterization of the capsular layer of *Vibrio cholerae* O139. *Archives of Microbiology* **170**:339-344.
- Mersni-Achour, R., N. Imbert-Auvray, V. Huet, Y. Ben Cheikh, N. Fauray, I. Doghri, S. Rouatbi, S. Bordenave, M. A. Travers, D. Saulnier, and I. Fruitier-Arnaudin. 2014. First description of French *V-tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *Journal of Invertebrate Pathology* **123**:49-59.
- Metzger, L. C., S. Stutzmann, T. Scignari, C. Van der Henst, N. Matthey, and M. Blokesch. 2016. Independent Regulation of Type VI Secretion in *Vibrio cholerae* by TfoX and TfoY. *Cell Reports* **15**:951-958.
- Mey, A. R., E. E. Wyckoff, V. Kanukurthy, C. R. Fisher, and S. M. Payne. 2005. Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of fur in virulence. *Infect Immun* **73**:8167-8178.
- Miller, K. A., E. Hamilton, and M. Dziejman. 2012. The *Vibrio cholerae* trh Gene Is Coordinately Regulated In Vitro with Type III Secretion System Genes by VttR(A)/VttR(B) but Does Not Contribute to Caco2-BBE Cell Cytotoxicity. *Infection and Immunity* **80**:4444-4455.
- Millet, Y. A., D. Alvarez, S. Ringgaard, U. H. von Andrian, B. M. Davis, and M. K. Waldor. 2014. Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *Plos Pathogens* **10**.
- Mishra, S. and J. Imlay. 2012. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**:145-160.
- Miyata, S. T., M. Kitaoka, T. M. Brooks, S. B. McAuley, and S. Pukatzki. 2011. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* **79**:2941-2949.
- Miyoshi, S. 2013. Extracellular proteolytic enzymes produced by human pathogenic *Vibrio* species. *Frontiers in Microbiology* **4**.
- Miyoshi, S., Y. Nitanda, K. Fujii, K. Kawahara, T. Li, Y. Maehara, T. Ramamurthy, Y. Takeda, and S. Shinoda. 2008. Differential gene expression and extracellular secretion of the collagenolytic enzymes by the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. *Fems Microbiology Letters* **283**:176-181.
- Miyoshi, S. I., K. Sasahara, S. Akamatsu, M. M. Rahman, T. Katsu, K. I. Tomochika, and S. Shinoda. 1997. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Infection and Immunity* **65**:1830-1835.

- Mogensen, T. H. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews* **22**:240-+.
- Montagnani, C., J. C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo, and J. M. Escoubas. 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental and Comparative Immunology* **31**:1-11.
- Montagnani, C., C. Kappler, J. M. Reichhart, and J. M. Escoubas. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Febs Letters* **561**:75-82.
- Montagnani, C., Y. Labreuche, and J. M. Escoubas. 2008. Cg-I kappa B, a new member of the I kappa B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **32**:182-190.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe, and J. M. Escoubas. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *Febs Letters* **500**:64-70.
- Munson, G. P., D. L. Lam, F. W. Outten, and T. V. O'Halloran. 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**:5864-5871.

-N-

- Nagamune, K., K. Yamamoto, and T. Honda. 1995. Cloning and Sequencing of a Novel Hemolysis Gene of *Vibrio-Cholerae*. *Fems Microbiology Letters* **128**:265-269.
- Naka, A., K. Yamamoto, M. J. Albert, and T. Honda. 1995. *Vibrio cholerae* O139 produces a protease which is indistinguishable from the haemagglutinin/protease of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11**:87-90.
- Nakashige, T. G., B. Zhang, C. Krebs, and E. M. Nolan. 2015. Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nature Chemical Biology* **11**:765-+.
- Neyrolles, O., F. Wolschendorf, A. Mitra, and M. Niederweis. 2015. Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* **264**:249-263.
- Nishibuchi, M. and J. B. Kaper. 1995. Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio-Parahaemolyticus* - a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium. *Infection and Immunity* **63**:2093-2099.
- Nonaka, M. and F. Yoshizaki. 2004. Evolution of the complement system. *Molecular Immunology* **40**:897-902.
- Novoa, B., A. Romero, A. L. Alvarez, R. Moreira, P. Pereiro, M. M. Costa, S. Dios, A. Estepa, F. Parra, and A. Figueras. 2016. Antiviral Activity of Myticin C Peptide from Mussel: an Ancient Defense against Herpesviruses. *J Virol* **90**:7692-7702.
- Nyholm, S. V. and M. J. McFall-Ngai. 2004. The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nat Rev Microbiol* **2**:632-642.

-O-

- O'Boyle, N. and A. Boyd. 2014. Manipulation of intestinal epithelial cell function by the cell contact-dependent type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **3**.
- Oliver, J. D. 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiol Infect* **133**:383-391.

Osman, D., C. J. Patterson, K. Bailey, K. Fisher, N. J. Robinson, S. E. Rigby, and J. S. Cavet. 2013. The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1B)-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Mol Microbiol* **87**:466-477.

-P-

- Park, B. R., R. A. Zielke, I. H. Wierzbicki, K. C. Mitchell, J. H. Withey, and A. E. Sikora. 2015. A Metalloprotease Secreted by the Type II Secretion System Links *Vibrio cholerae* with Collagen. *Journal of Bacteriology* **197**:1051-1064.
- Park, M. S., P. G. Jo, Y. K. Choi, K. W. An, and C. Y. Choi. 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology Research* **5**:451-461.
- Pauletto, M., A. Segarra, C. Montagnani, V. Quillien, N. Faury, J. Le Grand, P. Miner, B. Petton, Y. Labreuche, E. Fleury, C. Fabioux, L. Bargelloni, T. Renault, and A. Huvet. 2017. Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *J Exp Biol*.
- Payne, S. M., A. R. Mey, and E. E. Wyckoff. 2016. *Vibrio* Iron Transport: Evolutionary Adaptation to Life in Multiple Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**:69-90.
- Pei, J. M. and N. V. Grishin. 2009. The Rho GTPase inactivation domain in *Vibrio cholerae* MARTX toxin has a circularly permuted papain-like thiol protease fold. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **77**:413-419.
- Pernet, F., J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Degremont, F. Lagarde, J. F. Pepin, and N. Keck. 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions* **2**:215-237.
- Pernet, F., F. Lagarde, N. Jeanne, G. Daigle, J. Barret, P. Le Gall, C. Quere, and R. D'Orbcastel E. 2014a. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS One* **9**:e88469.
- Pernet, F., F. Lagarde, P. Le Gall, and E. R. D'Orbcastel. 2014b. Associations between farming practices and disease mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a Mediterranean lagoon. *Aquaculture Environment Interactions* **5**:99-106.
- Petton, B., P. Boudry, M. Alunno-Bruscia, and F. Pernet. 2015a. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **6**:205-222.
- Petton, B., M. Bruto, A. James, Y. Labreuche, M. Alunno-Bruscia, and F. Le Roux. 2015b. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in Microbiology* **6**:686.
- Petton, B., F. Pernet, R. Robert, and P. Boudry. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **3**:257-273.
- Pha, K. and L. Navarro. 2016. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J Biol Chem* **7**:1-13.
- Phillips, K. E. and K. J. Satchell. 2017. *Vibrio vulnificus*: From Oyster Colonist to Human Pathogen. *Plos Pathogens* **13**:e1006053.
- Pichon, D., B. Cudennec, S. Huchette, C. Djediat, T. Renault, C. Paillard, and S. Auzoux-Bordenave. 2013. Characterization of abalone *Haliotis tuberculata*-*Vibrio harveyi* interactions in gill primary cultures. *Cytotechnology* **65**:759-772.
- Pila, E. A., J. T. Sullivan, X. Z. Wu, J. Fang, S. P. Rudko, M. A. Gordy, and P. C. Hanington. 2016. Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Dev Comp Immunol* **58**:119-128.

- Poirier, A. C., P. Schmitt, R. D. Rosa, A. S. Vanhove, S. Kieffer-Jaquinod, T. P. Rubio, G. M. Charriere, and D. Destoumieux-Garzon. 2014. Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity EVIDENCES IN CRASSOSTREA GIGAS. *Journal of Biological Chemistry* **289**:24821-24831.
- Pontel, L. B., M. E. Audero, M. Espariz, S. K. Checa, and F. C. Soncini. 2007. GoS controls the response to gold by the hierarchical induction of Salmonella-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol Microbiol* **66**:814-825.
- Porcheron, G., A. Garenaux, J. Proulx, M. Sabri, and C. M. Dozois. 2013. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:90.
- Pufahl, R. A., C. P. Singer, K. L. Peariso, S. J. Lin, P. J. Schmidt, C. J. Fahrni, V. C. Culotta, J. E. Penner-Hahn, and T. V. O'Halloran. 1997. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* **278**:853-856.

-Q-

- Qu, T., B. Y. Huang, L. L. Zhang, L. Li, F. Xu, W. Huang, C. Y. Li, Y. S. Du, and G. F. Zhang. 2014. Identification and Functional Characterization of Two Executioner Caspases in *Crassostrea gigas*. *PLoS One* **9**.

-R-

- Reikine, S., J. B. Nguyen, and Y. Modis. 2014. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology* **5**:342.
- Renault, T., A. L. Bouquet, J. T. Maurice, C. Lupo, and P. Blachier. 2014. Ostreid Herpesvirus 1 Infection among Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: Relevance of Water Temperature to Virus Replication and Circulation Prior to the Onset of Mortality. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:5419-5426.
- Renault, T., R. M. Le Deuff, N. Cochenec, B. Chollet, and P. Maffart. 1995. Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet Res* **26**:539-543.
- Richards, G. P., M. A. Watson, D. S. Needleman, K. M. Church, and C. C. Hase. 2015. Mortalities of Eastern and Pacific oyster Larvae caused by the pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **81**:292-297.
- Robb, C. T., E. A. Dyrinda, R. D. Gray, A. G. Rossi, and V. J. Smith. 2014. Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nat Commun* **5**:4627.
- Roberta Souza dos Reis, F. H. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host bacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens*.
- Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, and W. R. Montfort. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:2766-2771.
- Robinson, J. M. 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology* **130**:281-297.
- Romalde, J. L., A. L. Dieguez, A. Lasa, and S. Balboa. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in Microbiology* **4**.

- Rosa, R. D., A. Santini, J. Fievet, P. Bulet, D. Destoumieux-Garzon, and E. Bachere. 2011. Big Defensins, a Diverse Family of Antimicrobial Peptides That Follows Different Patterns of Expression in Hemocytes of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* **6**.
- Rowland, J. L. and M. Niederweis. 2013. A Multicopper Oxidase Is Required for Copper Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* **195**:3724-3733.

-S-

- Samain, J. F. 2011. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquatic Living Resources* **24**:227-236.
- Samain, J. F., L. Degremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Bedier, M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, M. Delaporte, K. Costil, S. Pouvreau, C. Lambert, V. Boulo, P. Soudant, J. L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, B. Gagnaire, F. Geret, I. Boutet, T. Burgeot, and P. Boudry. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**:227-243.
- Samain, J. F. M., H. 2008. Summer mortality Pacific oyster *Crassostrea gigas*: The Morest Project.
- Sansonetti, P. J. 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews Immunology* **4**:953-964.
- Santos, M. D., D. Salomon, and K. Orth. 2017. T3SS effector VopL inhibits the host ROS response, promoting the intracellular survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Plos Pathogens* **13**.
- Sarantis, H. and S. Grinstein. 2012. Subversion of Phagocytosis for Pathogen Survival. *Cell Host & Microbe* **12**:419-431.
- Satchell, K. J. F. 2009. Bacterial Martyrdom: Phagocytes Disabled by Type VI Secretion after Engulfing Bacteria. *Cell Host & Microbe* **5**:213-214.
- Satchell, K. J. F. 2015. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of Vibrios. *Microbiology Spectrum* **3**.
- Sathyamoorthy, V., J. S. Huntley, A. C. Hall, and R. H. Hall. 1997. Biochemical and physiological characteristics of HlyA, a pore-forming cytolysin of *Vibrio cholerae* serogroup O1. *Toxicon* **35**:515-527.
- Sawabe, T., K. Kita-Tsukamoto, and F. L. Thompson. 2007. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* **189**:7932-7936.
- Sawabe, T., Y. Ogura, Y. Matsumura, G. Feng, A. R. Amin, S. Mino, S. Nakagawa, R. Kumar, Y. Fukui, M. Satomi, R. Matsushima, F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, R. Christen, F. Maruyama, K. Kurokawa, and T. Hayashi. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonus* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* **4**:414.
- Schmid-Hempel, P. and S. A. Frank. 2007. Pathogenesis, virulence, and infective dose. *PLoS Pathog* **3**:1372-1373.
- Schmiel, D. H. and V. L. Miller. 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* **1**:1103-1112.
- Schmitt, P., J. de Lorgeril, Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, and E. Bachere. 2012a. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **37**:363-370.
- Schmitt, P., R. D. Rosa, M. Duperthuy, J. de Lorgeril, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2012b. The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Frontiers in Microbiology* **3**:160.
- Schmitt, P., M. Wilmes, M. Pugniere, A. Aumelas, E. Bachere, H. G. Sahl, T. Schneider, and D. Destoumieux-Garzon. 2010. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action OYSTER

- DEFENSINS INHIBIT PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS BY BINDING TO LIPID II. *Journal of Biological Chemistry* **285**:29208-29216.
- Schwan, W. R., P. Warrener, E. Keunz, C. K. Stover, and K. R. Folger. 2005. Mutations in the *cueA* gene encoding a copper homeostasis P-type ATPase reduce the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Int J Med Microbiol* **295**:237-242.
- Schwartzman, J. A. and E. G. Ruby. 2016. A conserved chemical dialog of mutualism: lessons from squid and vibrio. *Microbes Infect* **18**:1-10.
- Seaver, L. C. and J. A. Imlay. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**:7173-7181.
- Segarra, A., L. Baillon, N. Faury, D. Tourbiez, and T. Renault. 2016. Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *J Invertebr Pathol* **133**:59-65.
- Segarra, A., L. Baillon, D. Tourbiez, A. Benabdelmouna, N. Faury, N. Bourgougnon, and T. Renault. 2014. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* **45**:103.
- Segarra, A., J. F. Pepin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury, and T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* **153**:92-99.
- Seo, J. K., M. J. Lee, B. H. Nam, and N. G. Park. 2013. cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **35**:480-488.
- Seper, A., A. Hosseinzadeh, G. Gorkiewicz, S. Lichtenegger, S. Roier, D. R. Leitner, M. Rohm, A. Grutsch, J. Reidl, C. F. Urban, and S. Schild. 2013. *Vibrio cholerae* Evades Neutrophil Extracellular Traps by the Activity of Two Extracellular Nucleases. *Plos Pathogens* **9**.
- Sheng, Y., F. Fan, O. Jensen, Z. Zhong, B. Kan, H. Wang, and J. Zhu. 2015. Dual Zinc Transporter Systems in *Vibrio cholerae* Promote Competitive Advantages over Gut Microbiome. *Infect Immun* **83**:3902-3908.
- Shi, L., S. Miyoshi, K. W. Bi, M. Nakamura, M. Hiura, K. Tomochika, and S. Shinoda. 2000. Presence of hemolysin genes (*vmh*, *tdh* and *hlx*) in isolates of *Vibrio mimicus* determined by polymerase chain reaction. *Journal of Health Science* **46**:63-65.
- Shinoda, S., H. Matsuoka, T. Tsuchie, S. I. Miyoshi, S. Yamamoto, H. Taniguchi, and Y. Mizuguchi. 1991. Purification and Characterization of a Lecithin-Dependent Hemolysin from *Escherichia-Coli* Transformed by a *Vibrio-Parahaemolyticus* Gene. *Journal of General Microbiology* **137**:2705-2711.
- Siems, D. W., L. N. Kirpotina, M. A. Jutila, and M. T. Quinn. 2009. Inhibition of the human neutrophil NADPH oxidase by *Coxiella burnetii*. *Microbes and Infection* **11**:671-679.
- Sikora, A. E. 2013. Proteins Secreted via the Type II Secretion System: Smart Strategies of *Vibrio cholerae* to Maintain Fitness in Different Ecological Niches. *Plos Pathogens* **9**.
- Sikora, A. E., R. A. Zielke, D. A. Lawrence, P. C. Andrews, and M. Sandkvist. 2011. Proteomic Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretome Reveals New Proteins, Including Three Related Serine Proteases. *Journal of Biological Chemistry* **286**:16555-16566.
- Sirikharin, R., S. Taengchaiyaphum, P. Sanguanrut, T. D. Chi, R. Mavichak, P. Proespraiwong, B. Nuangsaeng, S. Thitamadee, T. W. Flegel, and K. Sritunyalucksana. 2015. Characterization and PCR Detection Of Binary, Pir-Like Toxins from *Vibrio parahaemolyticus* Isolates that Cause Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in Shrimp. *PLoS One* **10**.
- Skaar, E. P. 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* **6**:e1000949.
- Smith, P. T. and N. Reddy. 2012. Application of magnetic resonance imaging (MRI) to study the anatomy and reproductive condition of live Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould). *Aquaculture* **334**:191-198.
- Soldati, T. and O. Neyrolles. 2012. Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic* **13**:1042-1052.

- Song, E. J., S. J. Lee, H. S. Lim, J. S. Kim, K. K. Jang, S. H. Choi, and H. J. Han. 2016. *Vibrio vulnificus* VvhA induces autophagy-related cell death through the lipid raft-dependent c-Src/NOX signaling pathway. *Scientific Reports* **6**.
- Song, L. Q., Y. M. Huang, M. Zhao, Z. H. Wang, S. J. Wang, H. Sun, B. Kan, G. X. Meng, W. L. Liang, and Z. H. Ren. 2015. A critical role for hemolysin in *Vibrio fluvialis*-induced IL-beta secretion mediated by the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Songsunghong, W., M. C. Higgins, H. G. Rolan, J. L. Murphy, and J. Mecsas. 2010. ROS-inhibitory activity of YopE is required for full virulence of *Yersinia* in mice. *Cellular Microbiology* **12**:988-1001.
- Spinard, E. J., J. Dubert, D. R. Nelson, M. Gomez-Chiarri, and J. L. Barja. 2016. Draft Genome Sequence of the Emerging Bivalve Pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus*. *Genome Announc* **4**.
- Stafford, S. L., N. J. Bokil, M. E. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan, and M. J. Sweet. 2013. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep* **33**.
- Stern, A. M., A. J. Hay, Z. Liu, F. A. Desland, J. Zhang, Z. T. Zhong, and J. Zhu. 2012. The NorR Regulon Is Critical for *Vibrio cholerae* Resistance to Nitric Oxide and Sustained Colonization of the Intestines. *MBio* **3**.
- Stern, A. M. and J. Zhu. 2014. An Introduction to Nitric Oxide Sensing and Response in Bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 87 **87**:187-220.
- Stork, M., M. Di Lorenzo, S. Mourino, C. R. Osorio, M. L. Lemos, and J. H. Crosa. 2004. Two tonB systems function in iron transport in *Vibrio anguillarum*, but only one is essential for virulence. *Infect Immun* **72**:7326-7329.
- Sun, B. G., X. H. Zhang, X. X. Tang, S. S. Wang, Y. B. Zhong, J. X. Chen, and B. Austin. 2007. A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Bacteriology* **189**:2575-2579.
- Sun, Y., Z. Zho, L. L. Wang, C. Y. Yang, S. Jianga, and L. S. Song. 2014. The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **45**:291-299.

-T-

- Tainer, J. A., E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, and D. C. Richardson. 1982. Determination and Analysis of the 2a Structure of Copper, Zinc Superoxide-Dismutase. *Journal of Molecular Biology* **160**:181-217.
- Takeuchi, H., Y. Shibano, K. Morihara, J. Fukushima, S. Inami, B. Keil, A. M. Gilles, S. Kawamoto, and K. Okuda. 1992. Structural Gene and Complete Amino-Acid-Sequence of *Vibrio-Alginolyticus* Collagenase. *Biochemical Journal* **281**:703-708.
- Taniguchi, H., S. Kubomura, H. Hirano, K. Mizue, M. Ogawa, and Y. Mizuguchi. 1990. Cloning and characterization of a gene encoding a new thermostable hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fems Microbiology Letters* **55**:339-345.
- Tapia, L., M. Gonzalez-Aguero, M. F. Cisternas, M. Suazo, V. Cambiazo, R. Uauy, and M. Gonzalez. 2004. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels. *Biochem J* **378**:617-624.
- Tasumi, S. and G. R. Vasta. 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J Immunol* **179**:3086-3098.
- Taylor, D. L., X. R. Bina, and J. E. Bina. 2012. *Vibrio cholerae* VexH encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS One* **7**:e38208.

- Terahara, K., K. G. Takahashi, A. Nakamura, M. Osada, M. Yoda, T. Hiroi, M. Hirasawa, and K. Mori. 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". *Dev Comp Immunol* **30**:667-683.
- Testa, J., L. W. Daniel, and A. S. Kreger. 1984. Extracellular phospholipase A2 and lysophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunity* **45**:458-463.
- Thompson, C. C., A. C. Vicente, R. C. Souza, A. T. Vasconcelos, T. Vesth, N. Alves, Jr., D. W. Ussery, T. Lida, and F. L. Thompson. 2009. Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evol Biol* **9**:258.
- Thompson, F. L., B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, and J. Swings. 2001. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol* **24**:520-538.
- Thompson, F. L., C. C. Thompson, A. C. Vicente, G. N. Theophilo, E. Hofer, and J. Swings. 2003. Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* **41**:1946-1950.
- Tirape, A., C. Bacque, R. Brizard, F. Vandembulcke, and V. Boulo. 2007. Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* **31**:859-873.
- Travers, M. A., R. M. Achour, P. Haffner, D. Tourbiez, A. L. Cassone, B. Morga, I. Doghri, C. Garcia, T. Renault, I. Fruitier-Arnaudin, and D. Saulnier. 2014. First description of French *V-tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *Journal of Invertebrate Pathology* **123**:38-48.
- Travers, M. A., D. Tourbiez, L. Parizadeh, P. Haffner, A. Kozic-Djellouli, M. Aboubaker, M. Koken, L. Degremont, and C. Lupo. 2017. Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* **48**.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley, and E. Leifson. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology* **90**:1036-1044.

-V-

- Vaitkevicius, K., P. K. Rompikuntal, B. Lindmark, R. Vaitkevicius, T. Y. Song, and S. N. Wai. 2008. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *Febs Journal* **275**:3167-3177.
- Van der Henst, C., T. Scignari, C. Maclachlan, and M. Blokesch. 2016. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Isme Journal* **10**:897-910.
- Van Zandt, K. E., F. B. Sow, W. C. Florence, B. S. Zwillig, A. R. Satoskar, L. S. Schlesinger, and W. P. Lafuse. 2008. The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology* **84**:689-700.
- Vanhove, A. S., M. Duperthuy, G. M. Charriere, F. Le Roux, D. Goudenege, B. Gourbal, S. Kieffer-Jaquinod, Y. Coute, S. N. Wai, and D. Destoumieux-Garzon. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental Microbiology* **17**:1152-1165.
- Vanhove, A. S., T. P. Rubio, A. N. Nguyen, A. Lemire, D. Roche, J. Nicod, A. Vergnes, A. C. Poirier, E. Disconzi, E. Bachere, F. Le Roux, A. Jacq, G. M. Charriere, and D. Destoumieux-Garzon. 2016. Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environmental Microbiology* **18**:875-888.
- Vidal-Dupiol, J., O. Ladriere, A. L. Meistertzheim, L. Foure, M. Adjeroud, and G. Mitta. 2011. Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *J Exp Biol* **214**:1533-1545.

-W-

- Wagner, D., J. Maser, B. Lai, Z. Cai, C. E. Barry, 3rd, K. Honer Zu Bentrup, D. G. Russell, and L. E. Bermudez. 2005a. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* **174**:1491-1500.
- Wagner, D., J. Maser, I. Moric, N. Boechat, S. Vogt, B. Gicquel, B. Lai, J. M. Reyrat, and L. Bermudez. 2005b. Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* Mramp. *Microbiology* **151**:323-332.
- Wang, D. and C. A. Fierke. 2013. The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics* **5**:372-383.
- Wang, H., S. S. Chen, J. Zhang, F. P. Rothenbacher, T. T. Jiang, B. A. Kan, Z. T. Zhong, and J. Zhu. 2012. Catalases Promote Resistance of Oxidative Stress in *Vibrio Cholerae*. *PLoS One* **7**.
- Wang, H., N. Naseer, Y. R. Chen, A. Y. Zhu, X. W. Kuai, N. Galagedera, Z. Liu, and J. Zhu. 2017a. OxyR2 Modulates OxyR1 Activity and *Vibrio cholerae* Oxidative Stress Response. *Infection and Immunity* **85**.
- Wang, L., X. Song, and L. Song. 2017b. The oyster immunity. *Dev Comp Immunol*.
- Wang, L., H. Zhang, D. Zhang, Z. Lv, Z. Liu, W. Wang, Z. Zhou, L. Qiu, H. Wang, J. Li, and L. Song. 2017c. The RNA-seq analysis suggests a potential multi-component complement system in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **76**:209-219.
- Wang, Q., Q. Liu, X. Cao, M. Yang, and Y. Zhang. 2008. Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence. *Arch Microbiol* **190**:595-603.
- Wang, R., Y. Zhong, X. Gu, J. Yuan, A. F. Saeed, and S. Wang. 2015. Corrigendum: The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology* **6**:437.
- Wang, W. L., T. Zhang, L. L. Wang, J. C. Xu, M. J. Li, A. G. Zhang, L. M. Qiu, and L. S. Song. 2016. A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **65**:182-190.
- Wang, Y., V. Hodgkinson, S. Zhu, G. A. Weisman, and M. J. Petris. 2011. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Adv Nutr* **2**:129-137.
- Ward, S. K., B. Abomoelak, E. A. Hoye, H. Steinberg, and A. M. Talaat. 2010. CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **77**:1096-1110.
- Waters, L. S., M. Sandoval, and G. Storz. 2011. The *Escherichia coli* MntR miniregulon includes genes encoding a small protein and an efflux pump required for manganese homeostasis. *J Bacteriol* **193**:5887-5897.
- Wendling, C. C., F. M. Batista, and K. M. Wegner. 2014. Persistence, Seasonal Dynamics and Pathogenic Potential of *Vibrio* Communities from Pacific Oyster Hemolymph. *PLoS One* **9**.
- White, C., J. Lee, T. Kambe, K. Fritsche, and M. J. Petris. 2009. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* **284**:33949-33956.
- Williams, S. L., R. V. Jensen, D. D. Kuhn, and A. M. Stevens. 2017. Analyzing the metabolic capabilities of a *Vibrio parahaemolyticus* strain that causes Early Mortality Syndrome in shrimp. *Aquaculture* **476**:44-48.
- Wolschendorf, F., D. Ackart, T. B. Shrestha, L. Hascall-Dove, S. Nolan, G. Lamichhane, Y. Wang, S. H. Bossmann, R. J. Basaraba, and M. Niederweis. 2011. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:1621-1626.
- Wright, A. C., L. M. Simpson, J. D. Oliver, and J. G. Morris, Jr. 1990. Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **58**:1769-1773.

Wu, Z. Y., P. Nybom, and K. E. Magnusson. 2000. Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cellular Microbiology* **2**:11-17.

-X-

Xia, X. Y., J. Larios-Valencia, Z. Liu, F. Xiang, B. A. Kan, H. Wang, and J. Zhu. 2017. OxyR-activated expression of Dps is important for *Vibrio cholerae* oxidative stress resistance and pathogenesis. *PLoS One* **12**.

Xiao, J. Z., L. Y. Liu, Y. Y. Ke, X. F. Li, Y. F. Liu, Y. J. Pan, S. L. Yan, and Y. J. Wang. 2017. Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports* **7**.

Xue, Q. G., M. E. Hellberg, K. L. Schey, N. Itoh, R. I. Eytan, R. K. Cooper, and J. F. La Peyre. 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *Bmc Evolutionary Biology* **10**.

-Y-

Yamaura, K., K. G. Takahashi, and T. Suzuki. 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**:168-175.

Yanagihara, I., K. Nakahira, T. Yamane, S. Kaieda, K. Mayanagi, D. Hamada, T. Fukui, K. Ohnishi, S. Kajiyama, T. Shimizu, M. Sato, T. Ikegami, M. Ikeguchi, T. Honda, and H. Hashimoto. 2010. Structure and Functional Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin. *Journal of Biological Chemistry* **285**:16267-16274.

Yang, C., L. Wang, Z. Jia, Q. Yi, Q. Xu, W. Wang, C. Gong, C. Liu, and L. Song. 2017. Two short peptidoglycan recognition proteins from *Crassostrea gigas* with similar structure exhibited different PAMP binding activity. *Dev Comp Immunol* **70**:9-18.

Yang, H., J. Chen, G. Yang, X. H. Zhang, Y. Li, and M. Wang. 2007. Characterization and pathogenicity of the zinc metalloprotease empA of *Vibrio anguillarum* expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **54**:244-248.

Yarbrough, M. L., Y. Li, L. N. Kinch, N. V. Grishin, H. L. Ball, and K. Orth. 2009. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS Disrupts Effector Binding and Downstream Signaling. *Science* **323**:269-272.

Yu, M. S. and C. Y. Lee. 1999. Expression and characterization of the prtV gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*. *Microbiology-Uk* **145**:143-150.

Yu, M. S., M. N. Yap, and C. Y. Lee. 2000. Metal content and biochemical analyses of a recombinant collagenase PrtV from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* **44**:805-813.

-Z-

Zhang, G. F., X. D. Fang, X. M. Guo, L. Li, R. B. Luo, F. Xu, P. C. Yang, L. L. Zhang, X. T. Wang, H. G. Qi, Z. Q. Xiong, H. Y. Que, Y. L. Xie, P. W. H. Holland, J. Paps, Y. B. Zhu, F. C. Wu, Y. X. Chen, J. F. Wang, C. F. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Y. Huang, Q. H. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. J. Liu, T. Domazet-Lošo, Y. S. Du, X. Q. Sun, S. D. Zhang, B. H. Liu, P. Z. Cheng, X. T. Jiang, J. Li, D. D. Fan, W. Wang, W. J. Fu, T. Wang, B. Wang, J. B. Zhang, Z. Y. Peng, Y. X. Li, N. Li, J. P. Wang, M. S. Chen, Y. He, F. J. Tan, X. R. Song, Q. M. Zheng, R. L. Huang, H. L. Yang, X. D. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. H. Luo, Z. C. She, Y. Ming, W. Huang, S. Zhang, B. Y. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. X. Ni, G. Y. Miao, J. Y. Wang, Q. Wang, C. E. W. Steinberg, H. Y. Wang, N. Li, L. M. Qian, G. J. Zhang, Y. R. Li, H. M. Yang, X. Liu,

- J. Wang, Y. Yin, and J. Wang. 2012a. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**:49-54.
- Zhang, L., A. M. Krachler, C. A. Broberg, Y. Li, H. Mirzaei, C. J. Gilpin, and K. Orth. 2012b. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* **1**:453-460.
- Zhang, L., L. Li, X. Guo, G. W. Litman, L. J. Dishaw, and G. Zhang. 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep* **5**:8693.
- Zhang, L., L. Li, and G. Zhang. 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol* **30**:653-660.
- Zhang, L., L. Li, and G. Zhang. 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev Comp Immunol* **35**:603-610.
- Zhang, R., R. Liu, L. S. Xin, H. Chen, C. H. Li, L. L. Wang, and L. S. Song. 2016. A CgIFNLP receptor from *Crassostrea gigas* and its activation of the related genes in human JAK/STAT signaling pathway. *Developmental and Comparative Immunology* **65**:98-106.
- Zhang, T., L. M. Qiu, Z. B. Sun, L. L. Wang, Z. Zhou, R. Liu, F. Yue, R. Sun, and L. S. Song. 2014a. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology* **45**:141-150.
- Zhang, X. H., P. G. Meaden, and B. Austin. 2001. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:3161-3167.
- Zhang, Y., X. He, F. Yu, Z. Xiang, J. Li, K. L. Thorpe, and Z. Yu. 2013. Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoS One* **8**:e76464.
- Zhang, Y., X. C. He, X. M. Li, D. K. Fu, J. H. Chen, and Z. N. Yu. 2011c. The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **30**:954-963.
- Zhang, Y., X. C. He, and Z. N. Yu. 2011d. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (I kappa B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **30**:1354-1361.
- Zhang, Y., F. Yu, J. Li, Y. Tong, and Z. Yu. 2014b. The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **40**:466-471.
- Zhang, Y. Q., Y. Zhang, H. Gao, L. Y. Zhang, Z. Yin, X. X. Huang, D. S. Zhou, H. Y. Yang, W. H. Yang, and L. Wang. 2017. *Vibrio parahaemolyticus* CalR down regulates the thermostable direct hemolysin (TDH) gene transcription and thereby inhibits hemolytic activity. *Gene* **613**:39-44.
- Zhao, J. F., A. H. Sun, P. Ruan, X. H. Zhao, M. Q. Lu, and J. Yan. 2009. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces apoptosis in HUVEC, SGC-7901 and SMMC-7721 cells via caspase-9/3-dependent pathway. *Microbial Pathogenesis* **46**:194-200.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider, and G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.

Résumé

Au sein du clade Splendidus, *Vibrio tasmaniensis* et *Vibrio crassostreae* sont deux populations de vibrios virulentes pour l'huître qui ont été associées au syndrome de mortalité des huîtres juvéniles. Nous nous sommes intéressés à la diversité des mécanismes d'interaction entre ces vibrios et leur hôte, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Dans un premier temps, nous avons précisé le processus de pathogénèse de la souche *V. tasmaniensis* LGP32 et montré qu'elle possédait une activité cytotoxique sur les cellules immunitaires de l'huître, les hémocytes, qui dépendait de sa phagocytose. Le transcriptome intracellulaire de LGP32 a révélé le rôle important des systèmes antioxydants et de l'efflux du cuivre dans la survie du vibrio à l'intérieur du phagosome. D'un point de vue fonctionnel, nous avons montré que ces mécanismes jouaient un rôle important au cours de la pathogénèse *in vivo*. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude comparative des interactions entre des souches représentatives des deux populations *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* et l'huître. Nous avons montré que les souches virulentes des deux populations étaient cytotoxiques pour les hémocytes mais que cette cytotoxicité était indépendante de la phagocytose chez les *V. crassostreae*, à l'inverse des *V. tasmaniensis*. Le transcriptome des huîtres a montré que les souches virulentes des deux populations réprimaient l'expression de gènes impliqués dans la réponse antibactérienne. Des réponses spécifiques à chaque souche virulente ont également été identifiées, révélant la diversité des interactions. *In vivo*, les souches virulentes se sont montrées capables de coloniser les tissus de l'huître, contrairement aux souches non virulentes contrôlées par les hémocytes. L'ensemble de nos travaux montre que, bien qu'il existe un degré de diversité et de spécificité des interactions entre différents vibrios du clade Splendidus et l'huître, les deux populations virulentes sont cytotoxiques pour les cellules immunitaires, et ce processus est essentiel pour leur succès infectieux. Ainsi, la capacité de dépasser les défenses hémocytaires est un phénotype conservé entre les populations virulentes du clade Splendidus. Les processus évolutifs ayant conduits à l'émergence de ces traits de virulence communs entre populations de vibrios pathogènes différentes méritent d'être explorés.

Abstract

In the Splendidus clade, *Vibrio tasmaniensis* and *Vibrio crassostreae* are two populations of virulent vibrio for oysters that are associated to "juvenile oyster mortality syndrome". Here we were interested in the diversity of interaction mechanisms between the vibrios and their host, the oyster *Crassostrea gigas*. First, we investigated the pathogenesis process of the strain *V. tasmaniensis* LGP32 and showed that it exerts a cytotoxic activity against oyster immune cells, the hemocytes, which depend on its entry into the cells through phagocytosis. Transcriptomic analysis of LGP32 response during intracellular stage revealed a crucial role for antioxidant systems and copper efflux in intraphagosomal survival of the bacteria. From a functional point of view, we showed that this virulence mechanisms of LGP32 play a major role in pathogenesis *in vivo*. Second, we realized a comparative study of the interaction mechanisms between representative strains of the two populations *V. tasmaniensis* and *V. crassostreae* with the oyster. Virulent strains from both populations were cytotoxic for hemocytes but this cytotoxicity was independent of phagocytosis in the case of *V. crassostreae*, in contrary to *V. tasmaniensis*. Transcriptomic analysis of the oyster responses during infection showed that virulent strains of both populations repressed the expression of genes involved in antibacterial responses. However, some specific responses were also identified for each virulent strain, highlighting some diversity of interactions. *In vivo*, virulent strains were able to colonize oyster tissues, in contrary to non-virulent strains, which were controlled by hemocytes. Our work show, although a certain degree of diversity and specificity exist in the interactions between different vibrios of the Splendidus clade and oysters, both virulent populations are cytotoxic for immune cells, and this process is essential for their infectious success. Thus, the capacity to overcome the hemocyte defenses is a conserved phenotype between distinct virulent populations of vibrios from the Splendidus clade. Hence, it would be of particular interest to determine the evolutionary processes that drove the emergence of common virulence traits in distinct populations of pathogens.