



**HAL**  
open science

# Identification des facteurs de pathogénicité de la bactérie *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et de mortalités chez les poissons marins

Alexandra Rahmani

► **To cite this version:**

Alexandra Rahmani. Identification des facteurs de pathogénicité de la bactérie *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et de mortalités chez les poissons marins. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0059 . tel-02969604

**HAL Id: tel-02969604**

**<https://theses.hal.science/tel-02969604v1>**

Submitted on 16 Oct 2020

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : Microbiologie

Par

**Alexandra RAHMANI**

**Identification des facteurs de pathogénicité de la bactérie *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et de mortalités chez les poissons marins**

Thèse présentée et soutenue à Plouzané le 4 novembre 2019

Unité de recherche : Laboratoire des sciences de l'environnement marin, LEMAR – UMR 6539

## Rapporteurs avant soutenance :

**Delphine DESTOUMIEUX GARZON**

Directrice de recherche CNRS,  
Université de Montpellier

**Annick JACQ**

Directrice de recherche CNRS,  
Université Paris Sud

## Composition du Jury :

**Gwenaëlle LE BLAY**

Présidente du jury

**Delphine DESTOUMIEUX GARZON**

Rapporteur

**Annick JACQ**

Rapporteur

**Annemie DECOSTERE**

Examineur

**Sébastien DUPERRON**

Examineur

**Christine PAILLARD**

Co-directrice de thèse

**Vianney PICHEREAU**

Directeur de thèse

## Invité :

**François DELAVAT**

Co-encadrant de thèse

**Professeur des Universités**

Université de Bretagne Occidentale

**Directrice de recherches**

CNRS, Université de Montpellier

**Directrice de recherches**

CNRS, Université Paris Sud

**Professeur des Universités**

Ghent University, Belgium

**Professeur des Universités**

Muséum National d'Histoire Naturelle

**Directrice de recherches**

CNRS, Université de Bretagne Occidentale

**Professeur des Universités**

Université de Bretagne Occidentale

**Maître de conférences**

Université de Nantes



# REMERCIEMENTS

*Il convient d'abord de remercier l'Université de Bretagne Occidentale, le projet européen VIVALDI H2020 et l'Interdisciplinary graduate School for the BLUE planet, ISBLUE, pour avoir d'une part financé cette thèse et d'autre part permis les mobilités internationales ayant permis de développer une précieuse collaboration avec nos confrères de la Ghent University (Belgique).*

*Je remercie l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Merci à Delphine DESTOUMIEUX GARZON et Annick JACQ d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Annemie DECOSTERE, Sébastien DUPERRON et Gwenaëlle LE BLAY LALIBERTE d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.*

*J'adresse également un grand merci à Alain GIVAUDAN et Erwan CORRE, tous deux membres de mon comité de suivi individuel, pour m'avoir conseillée et guidée durant ces trois années. Vos précieux conseils m'ont aidée à construire ma réflexion et m'ont permis d'atteindre la plupart des objectifs fixés au cours de cette thèse.*

*Tout particulièrement, j'adresse un immense MERCI à mes directeurs de thèse Vianney PICHEREAU, Christine PAILLARD et à mon encadrant François DELAVAT. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et tous vos encouragements qui ont fait de cette thèse une expérience aussi enrichissante qu'agréable. Merci de m'avoir donnée la possibilité de laisser libre cours à mes idées pour tenter de comprendre les stratagèmes de *V. tapetis* au travers d'expériences m'ayant permis de diversifier mes compétences. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir initiée au monde de la recherche, j'ai bien conscience d'avoir eu une immense chance de vous avoir comme encadrants. Merci à toi Vianney pour ta patience, ta clarté, ta réactivité et ton calme à tout épreuve qui ont su m'apaiser et me motiver tant de fois au cours de ces trois dernières années. Merci à toi Christine pour ton dynamisme, ta joie de vivre et tes bons conseils qui m'ont guidée tout au long de cette thèse. Merci à toi François pour toutes ces heures passées à me former, à répondre à mes questions (même les plus bêtes) et à m'apprendre comment naviguer dans l'océan de la génétique bactérienne fait de nombreuses surprises.*

*Merci à Adeline, Nelly et Christophe pour m'avoir tant appris, pour m'avoir en quelque sorte appris à marcher dans le monde du laboratoire, sans vous aucune des expériences de cette thèse n'aurait été possibles. Merci pour votre bienveillance, votre patience et pour toutes ces petites questions du quotidien auxquelles vous avez su répondre si justement pour m'aider à avancer pas à pas. Merci à toi Eric, pour m'avoir aidée à mettre ne place toutes ces expériences avec des palourdes plus ou*



*moins coopératives et pour avoir toujours répondu présent pour me former et m'aider.*

*Merci à Gwenaëlle, Marc, Yann, Sophie et Manon pour m'avoir donné cette formidable opportunité d'enseigner et pour m'avoir guidée dans cette nouvelle fonction d'enseignant.*

*Merci à Anne-So et Gene pour votre bonne humeur et toute votre aide dans les méandres administratifs du monde universitaire !*

*Merci à tous mes collègues de Lab-Meeting du Lundi pour m'avoir si bien conseillée lors de mes présentations et permis de progresser chaque fois un peu plus.*

*Merci à toi Nelly d'avoir été un rayon de soleil chaque jour, au détour d'un bonjour. Merci à Leslie, Marine, Morgan, Clarisse et Mariana d'avoir été d'un soutien à toute épreuve, vous êtes des perles ! Enfin, merci à tous mes amis du labo pour m'avoir épaulée et tellement fait rire tout au long de ces 3 ans. Je ne pourrai jamais tous vous citer tellement vous êtes nombreux à être si précieux dans le quotidien et la bonne humeur du LEMAR. Alors merci à tous mes collègues doctorants, post-docs, techniciens, AI, IE, IR, chercheurs, MCF, c'est grâce à vous que la vie au quotidien dans ce labo est aussi agréable.*

*Merci à mes amies Aude, Sophie, Eloïse, Victoire et à toute ma belle-famille Finistérienne pour m'avoir écoutée parler de bactéries et de maladie de palourdes en ayant toujours l'air si intéressés.*

*Merci à ma famille, Maman, Papa, Nina, Henri, Hamid, Romain et Homa pour m'avoir toujours motivée et soutenue tout au long de cette thèse et pour votre amour sans faille.*

*Enfin, merci à toi Sylvain pour m'avoir fait découvrir la Bretagne, le monde de la mer, les dessous de cailloux si riches en vie, c'est grâce à toi que je me suis orientée vers le monde marin et bien sûr merci pour tout ton amour.*

# TABLE DES MATIÈRES

<u>LISTE DES ABREVIATIONS.....</u>	<u>I</u>
<u>LISTE DES FIGURES – INTRODUCTION ET DISCUSSION.....</u>	<u>II</u>
<u>LISTE DES TABLES – INTRODUCTION ET DISCUSSION.....</u>	<u>IV</u>
<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>1</u>
<b>I. LA PALOURDE JAPONAISE, PRINCIPALE VICTIME DE LA MALADIE DE L’ANNEAU BRUN .....</b>	<b>2</b>
1. LA PALOURDE JAPONAISE <i>RUDITAPES PHILIPPINARUM</i> .....	2
1.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LA MAB.....	10
1.3. LES SYMPTOMES DE LA MAB .....	11
1.4. CRITERES DE DIAGNOSTICS DE LA MAB.....	13
<b>II. <i>V. TAPETIS</i> : UN PATHOGENE AUX MULTIPLES HOTES.....</b>	<b>15</b>
2.1. PHYLOGENIE .....	15
2.2. ÉCOLOGIE DU GENRE <i>VIBRIO</i> .....	15
2.3. DIVERSITE DES SOUCHES DE <i>V. TAPETIS</i> .....	16
2.4. DESCRIPTION DES PRINCIPALES SOUCHES <i>V. TAPETIS SUBSP TAPETIS</i> .....	20
2.5. DESCRIPTION DES PRINCIPALES SOUCHES <i>V. TAPETIS SUBSP. BRITANNICUS SUBSP. NOV</i> .....	22
2.6. LE CAS PARTICULIER DE L’ESPECE <i>V. TAPETIS-LIKE</i> .....	25
2.7. METHODES DE DETECTIONS DU PATHOGENE.....	26
2.8. VIRULENCE CONNUE DES SOUCHES DE <i>V. TAPETIS</i> AU REGARD DE LA MAB .....	29
<b>III. INTERACTION HOTE-PATHOGENE.....</b>	<b>31</b>
3.1. APPROCHE ECO-PHYSIOLOGIQUE DE LA RELATION HOTE PATHOGENE.....	31
3.2. LES DIFFERENTES STRATEGIES D’INFECTION .....	33
3.3. IMPORTANCE DE LA COLONISATION ET DU SITE D’INFECTION DANS LE PROCESSUS INFECTIEUX.....	34
3.4. MODIFICATIONS HEMOCYTAIRES DANS LE CADRE DE LA MAB .....	35
3.5. REPONSE IMMUNITAIRE ET METABOLIQUE DE <i>R. PHILIPPINARUM</i> LORS DE L’INFECTION PAR <i>V. TAPETIS</i> .....	37
3.6. REPONSE MOLECULAIRE DE LA PALOURDE JAPONAISE : LES VOIES ALTEREES PAR LE PATHOGENE.....	41
<b>IV. FACTEURS DE PATHOGENICITE DE <i>V. TAPETIS</i> POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA MAB.....</b>	<b>44</b>
4.1. LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE IV .....	44
4.2. LA PROTEINE CHAPERONNE DJLA.....	49
4.3. LES PROTEINES EXTRACELLULAIRES OU ECP .....	50
4.4. LES TOXINES ASSOCIEES A L’ESPECE <i>V. TAPETIS</i> .....	52
4.5. LES BIOFILMS DE <i>V. TAPETIS</i> .....	53
4.6. LA VIRULENCE ASSOCIEE AU PH .....	55
<u>OBJECTIFS DE TRAVAIL.....</u>	<u>59</u>

<b><u>MATERIELS ET METHODES .....</u></b>	<b><u>61</u></b>
1. MILIEUX DE CULTURE .....	61
2. SOUCHES DE VIBRIO TAPETIS UTILISEES.....	61
3. TEST DE VIRULENCE DES SOUCHES DE <i>V. TAPETIS</i> IN VITRO VIS A VIS DE LA PALOURDE JAPONAISE.....	63
<b><u>AXE DE RECHERCHE I.....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>ÉTUDE DE LA VIRULENCE DE <i>VIBRIO TAPETIS</i> .....</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>CHAPITRE 1 .....</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b><u>QUELS SONT LES GENES IMPLIQUES DANS LA VIRULENCE DE <i>V. TAPETIS</i> ?.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
INTRODUCTION : .....	70
IDENTIFICATION DE GENES DE VIRULENCE CHEZ <i>V. TAPETIS</i> DANS LE CADRE DE LA MAB PAR UNE	
APPROCHE DE MUTAGENESE CIBLEE.....	71
RESUME DE L'ARTICLE .....	71
ARTICLE UNDER REVIEW POUR « APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY » DEPUIS LE	
26.07.2019.....	72
RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	116
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	118
<b><u>CHAPITRE 2 .....</u></b>	<b><u>119</u></b>
<b><u>EXISTE-T-IL DES MARQUEURS HOTES-SPECIFIQUES DE LA VIRULENCE DE <i>V. TAPETIS</i> ?</u></b>	<b><u>119</u></b>
INTRODUCTION .....	120
IDENTIFICATION DE MARQUEURS DE VIRULENCE HOTE-SPECIFIQUES CHEZ <i>V. TAPETIS</i> : ETUDE	
COMPARATIVE CHEZ LA PALOURDE JAPONAISE ET LA LIMANDE .....	121
RESUME DE L'ARTICLE .....	121
ARTICLE EN PREPARATION .....	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	151

<u>AXE DE RECHERCHE II.....</u>	<u>153</u>
<u>ÉTUDE DE L'INTERACTION HOTE-PATHOGENE .....</u>	<u>153</u>
<u>CHAPITRE 3 .....</u>	<u>155</u>
<u>QUELS SONT LES GENES EXPRIMÉS LORS DE L'INFECTION CHEZ L'HOTE ?.....</u>	<u>155</u>
INTRODUCTION .....	156
UNE ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DE FLUIDES EXTRA-PALLEAUX REVELE DES ALTERATIONS DU SYSTEME IMMUNITAIRE ET DU CYTOSQUELETTE DANS LA PREMIERE SEMAINE DE LA MAB .....	157
RESUME DE L'ARTICLE .....	157
ARTICLE ACCEPTE ET PUBLIE DANS « FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY ».....	158
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	195
<u>CHAPITRE 4 .....</u>	<u>197</u>
<u>QUELLES SONT LES MODULATIONS AU SEIN DE L'ANIMAL ASSOCIEES AU PH ET A LA TEMPERATURE LORS DE L'INFECTION ?.....</u>	<u>197</u>
INTRODUCTION .....	198
MODIFICATION DU PH DES FLUIDES EXTRA-PALLEAUX ET DE L'HEMOLYMPHE LORS DE LA MALADIE DE L'ANNEAU BRUN CHEZ LA PALOURDE JAPONAISE <i>R. PHILIPPINARUM</i> .....	199
RESUME DE L'ARTICLE .....	199
ARTICLE UNDER REVIEW POUR « JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY » DEPUIS LE 13.09.2019	200
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	239
<u>DISCUSSION GENERALE .....</u>	<u>241</u>
<u>CONCLUSION .....</u>	<u>255</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE - PARTIES INTRODUCTION ET DISCUSSION.....</u>	<u>256</u>



# Liste des abréviations

*Dans l'ordre alphabétique*

**CFU** : Colony Forming Unit

**Cm** : Chloramphénicol

**DAP** : *2,6-diaminopimelic acid*

**DO** : Densité Optique

**EMSF** : Eau de Mer Stérile Filtrée

**FEP** : Fluides extra-palléaux

**Fragment UD** : Fragment Up-Down

**Km** : Kanamycine

**LB** : Luria Broth

**LBS** : Luria Broth Salt

**MAB** : Maladie de l'Anneau Brun

**Rpm** : rotation per minute (tours par minute)

**TDH** : Test d'Adhérence des Hémocytes

**TSA** : Tryptic Soy Agar

**TSB** : Tryptic Soy Broth

**UFC** : Unité Formant Colonie

**WT** : Wild Type

## Liste des figures – Introduction et Discussion

Figure 1 : Les voies d'introduction de <i>Ruditapes philippinarum</i> en Europe (Chiesa et al., 2017).....	3
Figure 2 : Vue schématique de l'anatomie de <i>Ruditapes philippinarum</i> , branchies et manteau partiellement disséquées. D'après Richard (2015). U = umbo; C = charnière; D = dents cardinales; L = ligament; Ma = manteau; Re = rectum ; A = anus ; Se = siphon exhalant ; Si = siphon inhalant ; Mu pos = muscle adducteur postérieur ; Mu ant = muscle adducteur antérieur ; Co = cœur ; C.P. = cavité péricardique ; N = néphrostome ; R = rein ; Int = intestin ; GD = glande digestive ; Br = branchies ; Go = gonade ; Pa = palpes labiaux ; B = bouche ; Pi = pied.....	5
Figure 3: Coupe transversale de la palourde japonaise <i>R. philippinarum</i> (Jeffroy, 2011; C. Paillard, 2004a; Trinkler, 2009). L = ligament ; Ma = manteau ; Br = branchies.....	5
Figure 4 : Cycle d'élevage de la palourde (d'après IFREMER 1988).....	7
Figure 5 : Approche écologique de l'interaction hôte – pathogène – environnement (Paillard, 2016).....	9
Figure 6: Répartition de la MAB avec et sans isolement de <i>V. tapetis</i> sur les côtes atlantiques et méditerranéennes (modifié d'après Paillard 2004a).....	10
Figure 7 :Classification des stades de dépôts de conchyoline (CDS) à partir de l'observation du dépôt brun caractéristique de la MAB, (Paillard and Maes, 1994) .....	12
Figure 8 : Les différents stades de réparation coquillière de la palourde <i>R. philippinarum</i> victime de la MAB (Trinkler, 2009; Trinkler et al., 2011) .....	13
Figure 9 : Répartition des souches de <i>V. tapetis</i> dans le monde en fonction de l'hôte infecté.....	19
Figure 10 : Mise en évidence des deux clusters au sein de l'espèce <i>V. tapetis</i> sur la base la concaténation des séquences nucléotidiques des gènes <i>atpA</i> , <i>fstZ</i> , <i>gapA</i> , <i>pyrH</i> , <i>recA</i> , <i>rpoA</i> , <i>rpoD</i> and <i>topA</i> . a : isolation en France, b : isolation en Espagne, c : isolation au Royaume-Uni et d : isolation en Irlande. Modifié d'après Balboa and Romalde (2013). .....	23
Figure 11 : Synthèse de la MAB d'un point de vue écologique (localisation des animaux dans le sédiment), physiologique (localisation du pathogène dans l'animal) et épidémiologique (évolution de la concentration en <i>V. tapetis</i> dans l'animal lors de la septicémie, le développement de la MAB ou la réparation coquillière). A : <i>Vibrio tapetis</i> dans les tissus (violet); C: <i>V. tapetis</i> dans les fluides palléaux et extra palléaux (rouge); B: <i>V. tapetis</i> dans les compartiments internes et externes ( violet et rouge). Réparation coquillière en vert (Paillard, 2016). .....	31

Figure 12 : Cycle de vie des souches de <i>V. tapetis</i> pathogènes de palourdes. Flèches noires : dissémination, Flèches bleues : modes de transmission, Flèches rouges : mortalités associées aux palourdes mortes remontant à la surface du sédiment (Paillard, 2016).....	32
Figure 13 : Les stratégies de colonisation du pathogène de palourdes, <i>V. tapetis</i> , d'après Paillard 2004a.....	33
Figure 14: Schéma des diverses étapes d'altération des cellules hémocytaires de <i>R. philippinarum</i> suite au contact avec le pathogène <i>V. tapetis</i> (rouge). (Paillard, 2004a).....	36
Figure 15 : Les 3 voies d'activation du système du complément en réponse à une infection par un pathogène dans le cadre de la réponse due au système immunitaire inné, d'après Parham and Janeway, (2015).....	39
Figure 16 : Description du système de sécrétion de type IV chez <i>A. tumefasciens</i> , Alvarez-Martinez and Christie (2009).....	45
Figure 17 : Organisation des systèmes de sécrétion de type IV. Alignement de différents systèmes de sécrétion illustrant la conservation de l'organisation entre les systèmes conjugatifs ou le système de transfert de l'ADN-T d' <i>Agrobacterium tumefasciens</i> , (Foulongne et al., 2002). ....	46
Figure 18 : Processus dans lesquels sont impliqués les différents T4SS (transport d'ADN durant la conjugaison et l'infection d' <i>A. tumefasciens</i> , transport d'effecteurs par de nombreuses bactéries pathogènes). Les cadres rouge représentent les systèmes de pathogènes dont l'organisation des gènes est décrit dans la figure 17 (modifié d'après Waksman 2019). ....	47
Figure 19 : Organisation du T4SS chez la plupart des souches de <i>V. tapetis</i> extraites de bivalves. Les flèches indiquent chaque CDS du cluster selon leur fonction. Flèches orange et cyan : protéines de fonction inconnue. Flèches violettes : VirB4 et VirB1. Flèches rose foncé : VirB2. Flèche verte : VirB6, VirB8, VirB9, VirB10. Traduit de l'anglais d'après Dias et al., (2018).....	48
Figure 20 : Description des souches testées et de leur hôte associé, d'après Rodrigues et al. 2015 .....	53
Figure 21 : Principales caractéristiques des biofilms formés par <i>V. tapetis</i> LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015 .....	53
Figure 22 : Étapes de formations du biofilm chez les deux souches <i>V. tapetis</i> LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015 .....	54
Figure 23 : Schéma de la composition des biofilms des souches <i>V. tapetis</i> LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015 .....	54
Figure 24 : Schéma de la formation de la coquille chez la palourde japonaise <i>R. philippinarum</i> .....	57
Figure 25 : Schéma hypothétique de l'infection par <i>Vibrio tapetis</i> et de l'intervention du pathogène dans la biominéralisation de la coquille. En rose : la bactérie infiltrant les fluides extra-palléaux périphériques et centraux. En bleu, le pathogène infiltrant les tissus en cas de lésions tissulaires.....	57



Figure 26 : Schéma récapitulatif du test d'adhésion <i>in vitro</i> .....	65
Figure 27 : cartographie des plasmides pAR001 (portant les séquences Up-DOWN du gène <i>ompU</i> ) et pAR002 (portant les séquences UD du gène <i>gbpA</i> ).....	117
Figure 28 : Modèle globale de la MAB et de l'interaction hôte-pathogène dans les FEPs.....	249

## Liste des tables – Introduction et Discussion

Tableau 1: Phylogénie de la palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i> et de la palourde européenne <i>Ruditapes decussatus</i> .....	2
Tableau 2: Principales espèces de bivalves où la bactérie <i>V. tapetis</i> a été retrouvée (modifié d'après Dias et al., 2018; Maes and Paillard, 1992; Paillard, 2004a) ...	11
Tableau 3 : Les trois phases de la MAB décrit par Paillard and Maes (1994) et Paillard, (2017).....	12
Tableau 4: Phylogénie de la bactérie marine <i>Vibrio tapetis</i> .....	15
Tableau 5 : Liste des souches de <i>V. tapetis</i> isolées dans le monde de 1988 à 2017	17
Tableau 6 : Pourcentages de similarités des profils obtenus par REP PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) et ERIC PCR (Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus ) réalisées par Lopez et al. (2011).....	22
Tableau 7 : Pourcentages de similarités en analyse multilocus sur les souches <i>V. tapetis</i> CECT4600 et NRP45, (Paillard et al., 2008a).....	25
Tableau 8 : Limite de détection des techniques de mise en évidence de <i>V. tapetis</i> , d'après Paillard 2004; Paillard et al. 2006; Bidault et al. 2015 .....	28
Tableau 9 : Virulence connue des souches de <i>V. tapetis</i> vis à vis de la palourde japonaise <i>R. philippinarum</i> . POS : positif, NEG : négatif, ND : non déterminé. Synthèse des données récoltées d'après Bidault et al. (2015b); Dias et al. (2018). .....	30
Tableau 10: Effet des différentes fractions de <i>V. tapetis</i> sur la viabilité des hémocytes de <i>R. philippinarum</i> , d'après Allam and Ford 2006.....	50
Tableau 11 : Milieux de cultures de base utilisés durant cette thèse.....	61
Tableau 12 : Liste des souches de <i>V. tapetis</i> utilisées durant cette thèse .....	62

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

La présente partie est une synthèse bibliographique permettant de décrire les différents acteurs de la maladie de l'anneau brun, la dynamique de l'infection et enfin les facteurs de pathogénicité potentiellement impliqués dans la maladie.

# I. La palourde japonaise, principale victime de la maladie de l'anneau brun

La maladie de l'anneau brun ou MAB (Paillard et al., 1989) est due à l'infection par la bactérie marine *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996a) nommée dans un premier temps VP1 (Paillard et al., 1989) et touche principalement les palourdes telles que la palourde japonaise *R. philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). La MAB touche plusieurs espèces de bivalves avec une prévalence largement majoritaire chez la palourde japonaise. Elle se caractérise par un dépôt brun sur la face interne de la coquille, entre le bord externe de celle-ci et la ligne palléale d'où l'appellation « maladie de l'anneau brun ». Ce dépôt est dû à l'accumulation d'un composé organique, nommé conchyoline, impliqué dans la biominéralisation de la coquille. Bien que la maladie de l'anneau brun soit décrite chez les bivalves, l'agent pathogène qui en est responsable a été précédemment isolé chez différentes espèces de poissons à travers le monde et principalement en Europe. Cette partie décrit la biologie de la palourde japonaise ainsi que les circonstances de son importation en Europe en lien avec l'apparition de la MAB au cours de la fin du 20<sup>ème</sup> siècle.

## 1. La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*

### 1.1.1 Phylogénie

Les palourdes sont des mollusques bivalves faisant partis de la famille des *Veneridae* (Rafinesque, 1815). La palourde japonaise fait partie du genre *Ruditapes* (Chiamenti, 1900) et de l'espèce *R. philippinarum* (Adams and Reeve, 1850).

Tableau 1: Phylogénie de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et de la palourde européenne *Ruditapes decussatus*

	Palourde européenne	Palourde japonaise
<b>Règne</b>	Eucaryote, Animal	
<b>Phylum</b>	Mollusca (Margulis and Schwartz, 1997)	
<b>Classe</b>	Bivalvia (Linnaeus, 1758)	
<b>Famille</b>	Veneridae (Rafinesque, 1815)	
<b>Genre</b>	<i>Ruditapes</i> (Chiamenti, 1900)	
<b>Espèce</b>	<i>R. decussatus</i> (Linnaeus, 1758)	<i>R. philippinarum</i> (Adams and Reeve, 1850)

### 1.1.2 Histoire de la palourde japonaise en Europe

La palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) provient des côtes indo pacifique et fut importée accidentellement sur les côtes nord-américaines dans les années 1930 lors de l'introduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (C. Paillard, 2004a). La palourde japonaise a été introduite à de multiples reprises en Europe entre les années 70 et 80.

Chiesa et al., (2017), ont retracé les différentes voies d'introduction de *R. philippinarum* en Europe compte tenu de ces informations et des données bibliographiques disponibles, en proposant une vision schématique, représentées dans la figure ci-dessous.

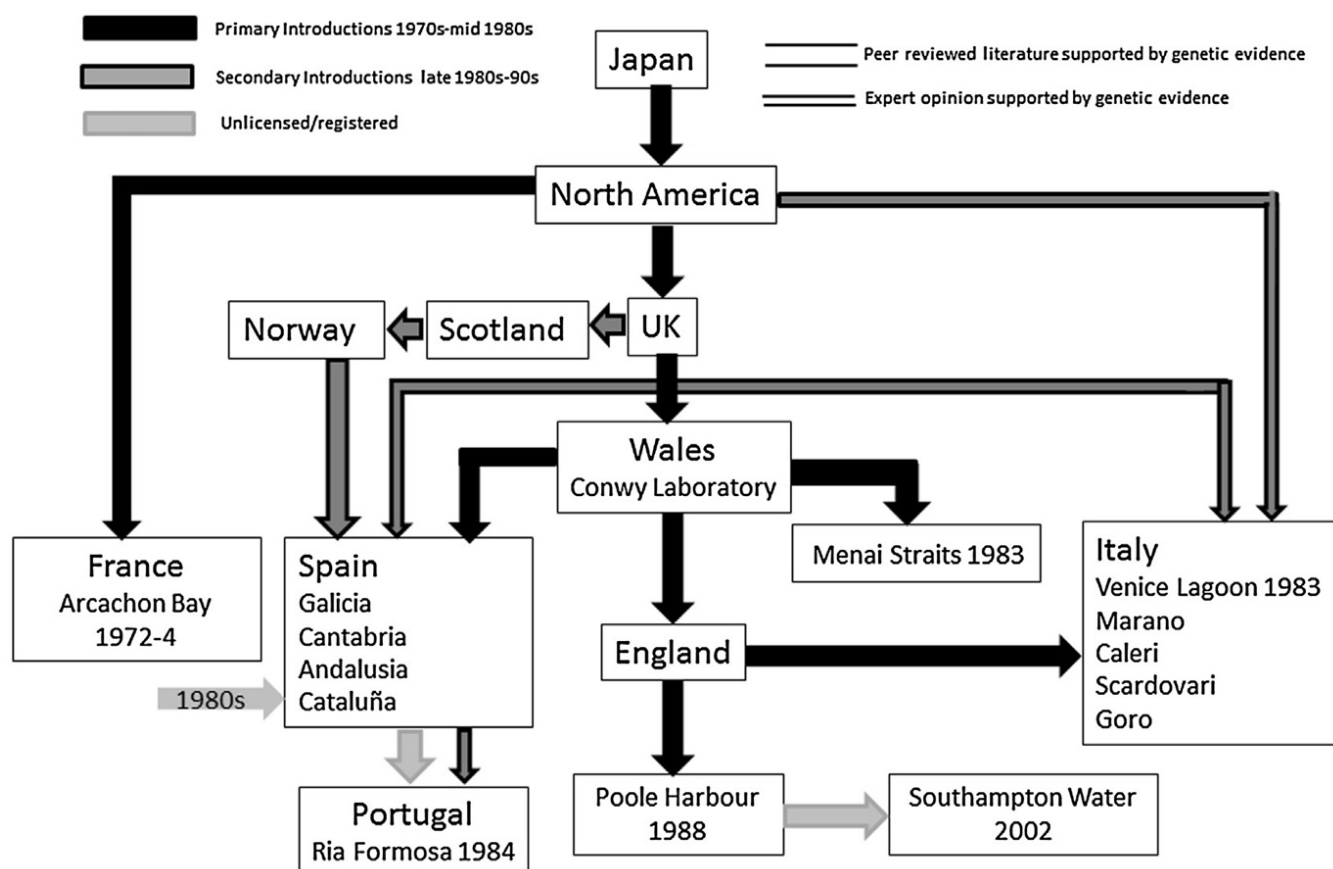


Figure 1 : Les voies d'introduction de *Ruditapes philippinarum* en Europe (Chiesa et al., 2017)

Comme le montre la figure 1 cette espèce fût volontairement introduite sur les côtes atlantiques européennes et en méditerranée pour la pêche et l'aquaculture et plus précisément, en France en 1972 (Robert and Deltreil, 1990) et au Royaume Uni en 1980 (Humphreys et al., 2015). Elle fut introduite plus tardivement en Italie depuis les

côtes américaines mais également en Espagne ou encore en Norvège durant les années 80s via la France et le Royaume-Uni (Chiesa et al., 2017).

Compte tenu de ces multiples voies d'introduction de l'espèce en Europe, Chiesa et al. (2017) ont réalisé une analyse basée sur le gène codant la cytochrome oxydase I (COI) des palourdes de l'espèce *R. philippinarum*, natives des côtes indopacifiques et celles importées sur les côtes atlantiques. Ils ont permis d'évaluer la diversité génétique de l'espèce et de retracer son chemin d'importation sur les côtes européennes.

Ils ont révélé l'existence de 3 grands clusters, le premier (cluster A) contenant des palourdes issues du Japon, d'Europe et quelques palourdes de Chine tandis que les deux derniers (clusters B et C) contiennent, quasi-exclusivement, des palourdes provenant de Chine.

Ils ont également identifié, à partir des palourdes récoltées en Europe, 13 haplotypes, tous représentés dans le cluster A. Parmi eux, les haplotypes 1 à 3 sont majoritairement représentés. Cependant, parmi les palourdes issues des côtes britanniques, l'haplotype majoritaire est le n°4, ce qui peut être expliqué par un « effet de goulet » au niveau des côtes britanniques et par le fait que les conditions environnementales y sont différentes des autres pays Européens échantillonnés, la Grande Bretagne se trouvant bien plus au nord. De plus, la mise en évidence de 10 haplotypes rares du cluster A soutient l'hypothèse selon laquelle plusieurs introductions de palourdes japonaises, supplémentaires et non enregistrées, auraient été effectuées durant les dernières décennies.

De nos jours, la palourde japonaise est présente sur les côtes située entre les latitudes 25°N et 45°N (Dang, 2009).

### 1.1.3 Anatomie :

La palourde japonaise est un mollusque bivalve, c'est à dire un animal composé de deux valves entourant un corps mou. Les différentes parties anatomiques de l'animal sont représentées sur les deux schémas ci-dessous.

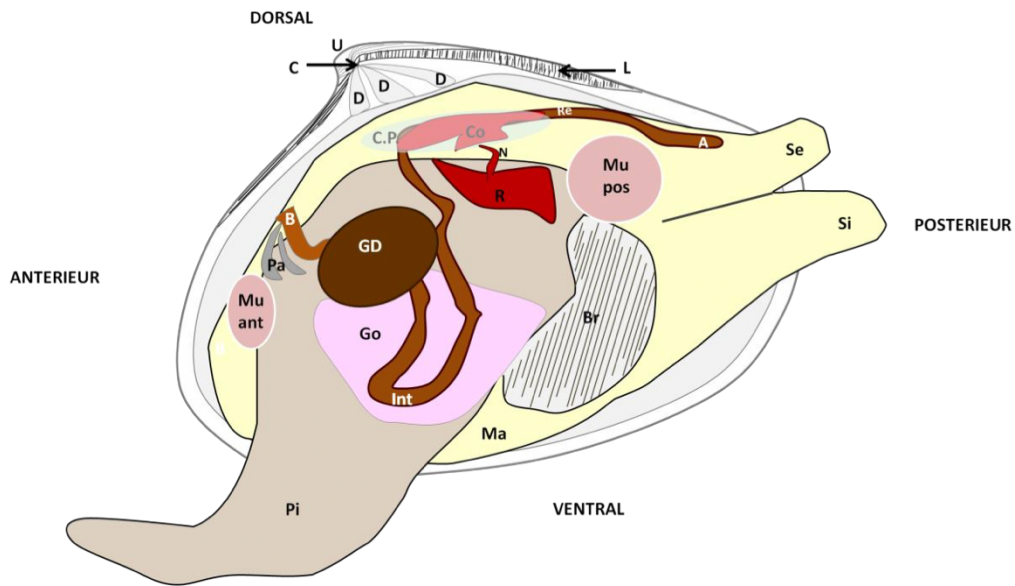


Figure 2 : Vue schématique de l'anatomie de *Ruditapes philippinarum*, branchies et manteau partiellement disséquées. D'après Richard (2015). U = umbo; C = charnière; D = dents cardinales; L = ligament; Ma = manteau; Re = rectum ; A = anus ; Se = siphon exhalant ; Si = siphon inhalant ; Mu pos = muscle adducteur postérieur ; Mu ant = muscle adducteur antérieur ; Co = cœur ; C.P. = cavité péricardique ; N = néphrostome ; R = rein ; Int = intestin ; GD = glande digestive ; Br = branchies ; Go = gonade ; Pa = palpes labiaux ; B = bouche ; Pi = pied.

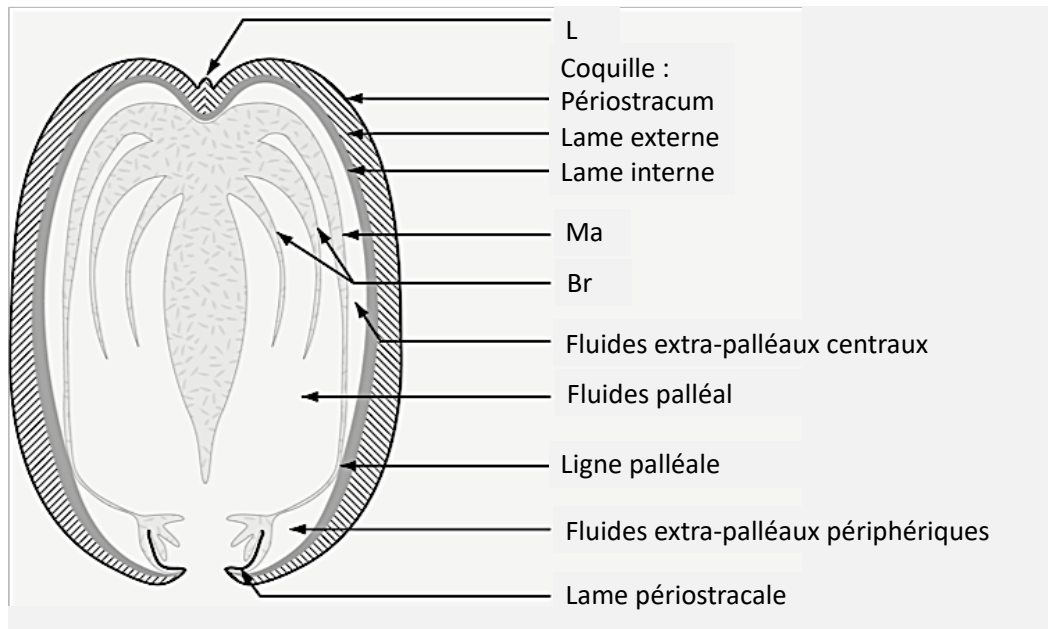


Figure 3: Coupe transversale de la palourde japonaise *R. philippinarum* (Jeffroy, 2011; C. Paillard, 2004a; Trinkler, 2009). L = ligament ; Ma = manteau ; Br = branchies

Les siphons (inhalant et exhalant), permettent de faire entrer et sortir l'eau de mer pour en filtrer les composants et permettre à la palourde de se nourrir. Les branchies

permettent d'une part la captation de l'oxygène pour que la palourde puisse respirer et d'autre part le guidage de la nourriture vers les palpes labiaux afin qu'ils puissent rejoindre le système digestif. Celui-ci est constitué d'une bouche, d'une glande digestive permettant l'assimilation des nutriments et d'un intestin se terminant par un anus permettant le rejet des fèces dans l'eau de mer ou leur dépôt sur le sédiment.

La locomotion de l'animal s'effectue grâce au pied, lui permettant de se déplacer sur le sédiment. Les valves ont également la capacité de s'ouvrir (pour laisser sortir les siphons) et de se refermer grâce aux muscles adducteurs antérieur et postérieur.

Le cœur de l'animal formé d'un ventricule et de deux oreillettes, intervient dans un système circulatoire semi ouvert permettant la circulation de l'hémolymphe et des cellules immunitaires dans les tissus.

Les gonades de l'animal sont situées autour de la glande digestive et forment un tissu diffus.

L'animal possède une coquille robuste, capable de protéger le corps mou, formée grâce aux sécrétions du manteau et de la lame périostracale.

Le manteau, participant à la formation de la coquille, est constitué de deux lobes et de quatre bourrelets à la périphérie délimitant plusieurs compartiments : les fluides extra palléaux périphériques et centraux (riches en cellules immunitaires) ainsi que la cavité palléale. (Allam and Paillard, 1998; Jeffroy, 2011; Paillard and Le Pennec, 1993).

### *1.1.4 Alimentation et habitat*

La palourde japonaise est un animal vivant sur les fonds marins (benthique), qui creuse le sédiment pour y vivre (fouisseur, sur quelques centimètres de profondeur) et se nourrit de matière en suspension (suspensivore, matière organique particulières). Elle se nourrit également par filtration de microphytobenthos et de phytoplancton (Flye-Sainte-Marie, 2007).

Elle est retrouvée dans des eaux dont la température varie de 10° à 30°C avec un optimum situé entre 20° et 24°C (P. Gouletquer et al., 1989a; Solidoro et al., 2000). Elle supporte des salinités quasiment nulles lors d'ondées pendant les basses mers de vives eaux, bien que son optimum de salinité soit situé entre 12 ‰ et 32 ‰ (Jeffroy, 2011).

Elle se situe principalement dans la zone intertidale (sur l'estran) bien qu'elle puisse également se retrouver en zone subtidale. Elle vit dans un sédiment très variable allant de la vase aux graviers vaseux, sables grossiers et sables fins (Jeffroy, 2011).

### 1.1.5 Reproduction

La palourde est un animal gonochorique. Deux pontes ont lieu dans l'année (fin de printemps et fin d'été) ou une seule ponte estivale en fonction des conditions d'alimentation printanières et estivales (Barnabé, 2018).

Les gamètes sont secrétées par le siphons exhalant et la fécondation a lieu dans le milieu extérieur (Jones et al., 1993). Les larves passent les premiers stades de leur vie dans le plancton pour ensuite devenir des organismes benthiques, le cycle de vie de *R. philippinarum* étant alors appelé méroplanctonique (Jeffroy, 2011). Elles sont ensuite réparties par les courants et se fixent le plus souvent sur des fonds sableux caractérisés par des particules de petites tailles. Après la métamorphose des larves en juvéniles, ces derniers sédimentent et passent d'un mode de vie planctonique à benthique (Calvez, 2002; Jeffroy, 2011; Jones et al., 1993; Flye-Sainte-Marie, 2007).

### 1.1.6 Vénériculture et consommation

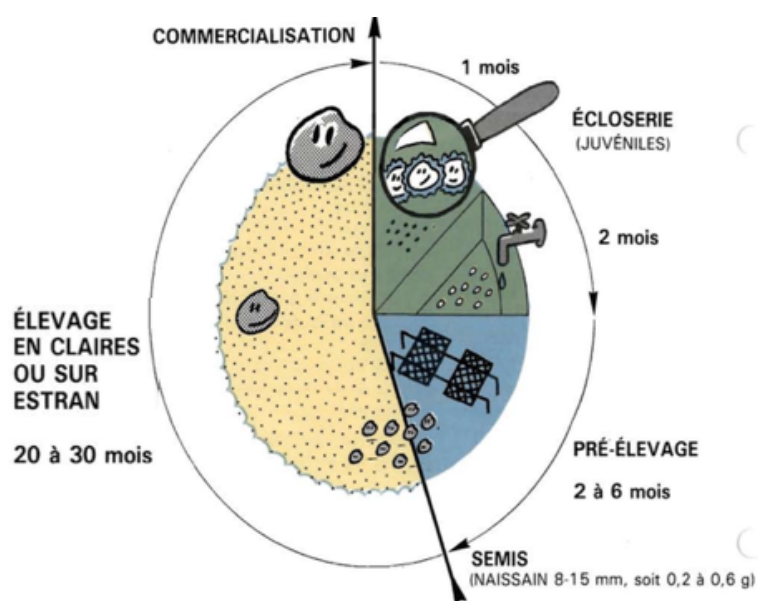


Figure 4 : Cycle d'élevage de la palourde (d'après IFREMER 1988)

Le calendrier d'élevage de la palourde diffère en fonction de la zone de vénériculture. Le cycle d'élevage en revanche, reste très proches dans les différents sites :

Les larves se développent sous forme planctonique durant 10 à 15 jours puis se déposent ensuite et se fixent sur des supports : c'est ce que l'on appelle le naissain. Durant 3 mois, celui-ci grandit dans des bassins dans une structure appelée écloserie.



Après cette période les palourdes sont semées (semis) dans la zone intertidale. La récolte et commercialisation des animaux s'effectue alors 18 à 24 mois après le semis (Comité national de la conchyliculture, 2013a).

La production de palourdes adultes vendues sous marquage sanitaire en 2012 était de 1020 tonnes en France (Agreste, 2012). La palourde est l'un des coquillages les plus énergétiques. Riche en fer, 100 g de chair (soit une trentaine de palourdes) correspond en effet à un apport de : 15,6 g de protéines, 1,5 g de glucides et 0,5 g de lipides, pour un total de 76,6 Kilo calories (Comité national de la conchyliculture, 2013b).

La production de bivalve en Europe s'élève à 598 millions de tonnes en 2017 (Wijsman et al., 2019). En France, la consommation de coquillages de la catégorie coques et palourdes s'élève à 2764 tonnes (Comité National de la Conchyliculture, année 2016).

### 1.1.7 Principaux prédateurs :

En France, les principaux prédateurs de la palourde sont d'une part les oiseaux et poissons et d'autre part le crabe vert. Tandis que le goéland et la mouette consomment les palourdes remontées à la surface de l'eau, l'huitrier pie plonge son bec dans les trous, lorsque la mer se retire, et coupe le ligament en pénétrant dans la palourde par les siphons. Parmi les poissons, nous retrouverons comme prédateurs les plies (dont la présence est fréquente dans le Finistère et les côtes du Nord de la France) ou encore les vieilles ou la daurade plutôt remarquées dans le bassin d'Arcachon. Le crabe vert *Carcinus maenas* (Linnaeus, 1758), quant à lui, se nourrit essentiellement de lamelibranches avec une période de prédation maximale de mai à septembre, la nuit, à marée haute (IFREMER, 1988). Lors de mortalités hivernales et pré-printanières dues à la bactérie pathogène *Vibrio tapetis*, les palourdes japonaises mortes ou moribondes remontent à la surface du sédiment et sont consommées plus facilement par les poissons, favorisant peut-être la dissémination du pathogène via les fèces des poissons ayant consommés ces palourdes (Paillard and Maes, 1994 ; Paillard, 2016).

### 1.1.8 Sensibilité aux pathogènes

La niche écologique des invertébrés marins des zones côtières est riche en biodiversité. Le système hôte – pathogène – environnement repose sur le principe que les variations de paramètres environnementaux, tels que le pH, la température

ou encore la salinité, influent sur le développement et la physiologie des organismes marins mais également peuvent induire des susceptibilités aux pathogènes rencontrés dans ces environnements (bactéries, virus ou parasites). Ce système tripartite nécessite à la fois un environnement propice au développement de la maladie mais également une bonne adaptation du pathogène et une sensibilité de l'hôte dans ces conditions. C'est à l'interface de ce système que la maladie se développe alors comme le schématise la figure ci-dessous (Jeffroy, 2011; Paillard, 2016).

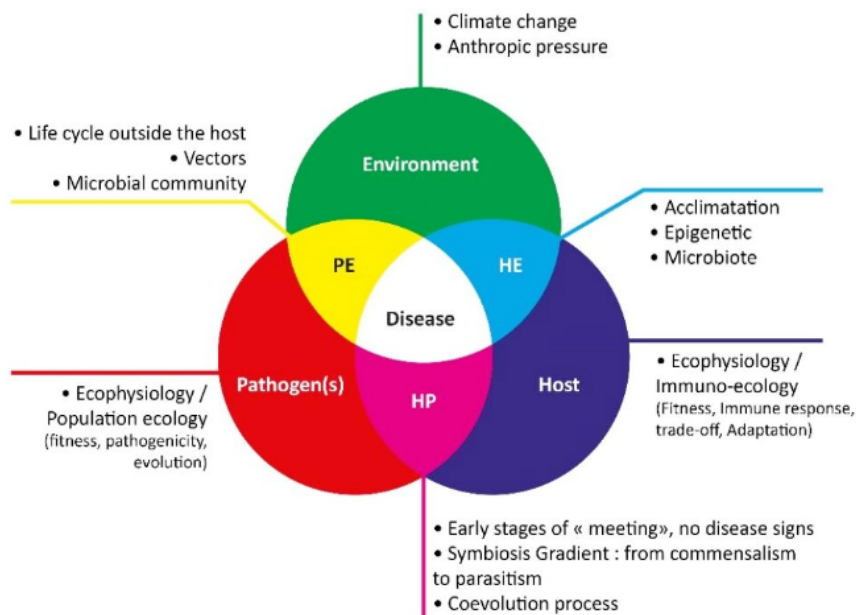


Figure 5 : Approche écologique de l'interaction hôte – pathogène – environnement (Paillard, 2016)

Les maladies provoquent des modifications de la physiologie des animaux comme des diminutions de la croissance coquillière mais aussi des baisses de la production aquacole. Chez les organismes marins, elles proviennent de différents agents pathogènes. Celles jusqu'à lors recensées chez la palourde japonaise proviennent de différents microorganismes. Les deux principaux pathogènes de cet invertébré marin sont, un parasite eucaryote, *Perkinsus* induisant des perkinsose (Navas et al., 1992), et une bactérie, *Vibrio tapetis* induisant une vibriose caractéristique nommée Maladie de l'Anneau Brun ou MAB et ayant entraîné de fortes baisses de production en France à la fin des années 80 (Paillard et al., 1989). En France, la production de palourde en 2017 s'élevait à 703 tonnes contre 33 500 en Italie, principal producteur européen et 4 178 000 tonnes en chine, principal producteur mondial (Source FAO fisheries statistics [www.fao.org](http://www.fao.org), 2017).

## 1.2. Répartition géographique de la MAB

La MAB est une maladie dite « d'eaux froides » en raison de conditions environnementales particulières dans lesquelles le pathogène se développe et infecte son hôte. En effet, des températures proches de 14°C et des salinités de l'ordre de 2% sont des facteurs favorisant le développement de la MAB tandis que des températures proches de 21°C associées à des salinités de l'ordre de 4% sont des facteurs inhibant la MAB en rendant plus efficace le système immunitaire de la palourde (*C. Paillard, 2004a; Reid et al., 2003; Rodrigues et al., 2015*). Les palourdes européennes *R. decussatus* ainsi que les palourdes japonaises *R. philippinarum* issues des États-Unis présentent des prévalences de MAB moins importantes (20% et 40%) que la palourde japonaise *R. philippinarum* issue des côtes européennes (60 à 100%) (*C. Paillard, 2004b*).

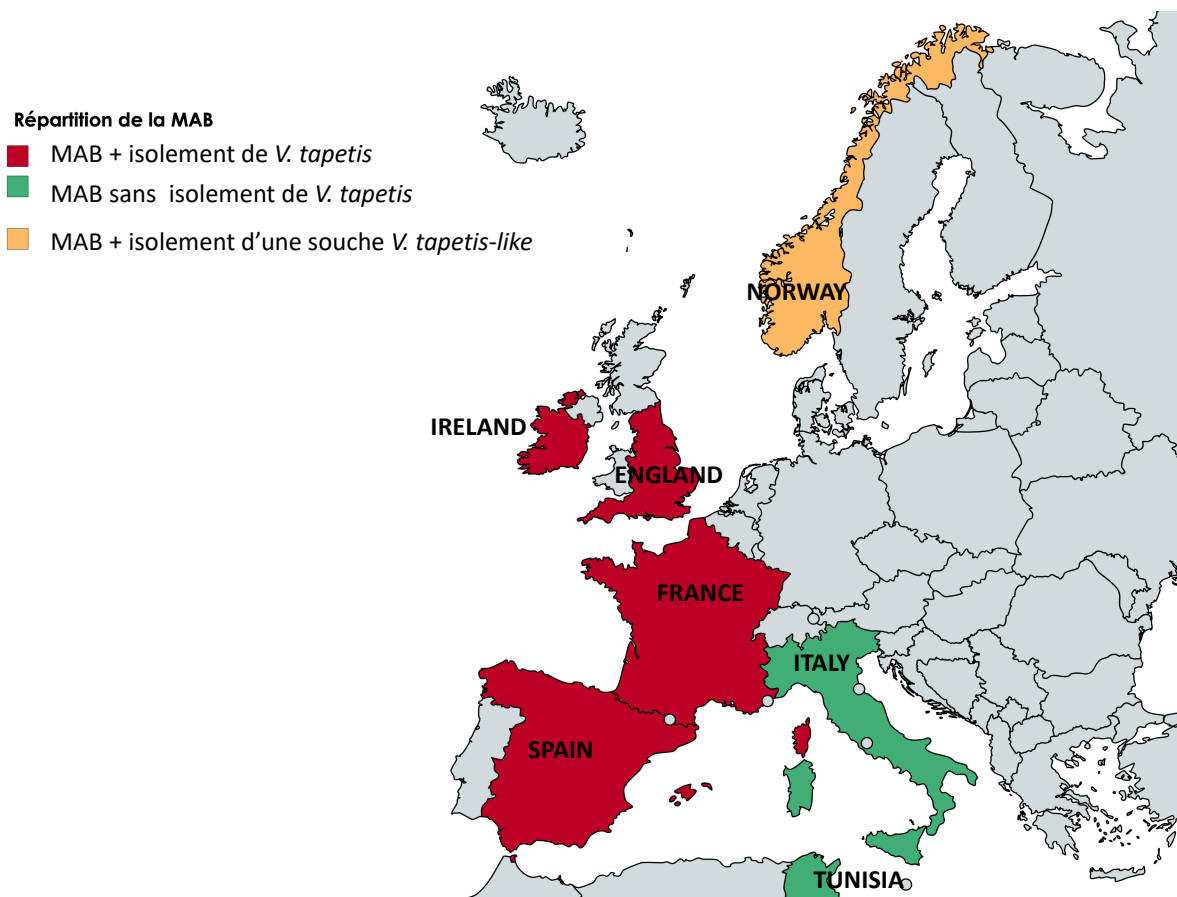


Figure 6: Répartition de la MAB avec et sans isolement de *V. tapetis* sur les côtes atlantiques et méditerranéennes (modifié d'après Paillard 2004a).

La maladie de l'anneau brun a été décrite chez différentes espèces de bivalves en

Europe. Dans la majorité des cas, la MAB est associée à *V. tapetis* (Fig. 6). En Italie (Paillard et al., 1994) et en Tunisie (El Bour et al., 2012) de rares cas de MAB ont été décrits sans isolation de l'espèce *V. tapetis*. En Norvège, le cas particulier d'une souche *V. tapetis like* a été décrit par Paillard et al. (2008) chez l'espèce *R. philippinarum* avec une souche n'appartenant pas à l'espèce *V. tapetis* bien qu'en étant très proche. Le tableau ci-dessous répertorie les espèces de bivalves chez lesquelles la MAB a déjà été décrite ainsi que le lieu et l'année du premier isolement de *V. tapetis* chez ces espèces.

Tableau 2: Principales espèces de bivalves où la bactérie *V. tapetis* a été retrouvée (modifié d'après Dias et al., 2018; Maes and Paillard, 1992; Paillard, 2004a)

Espèces	Nom vernaculaire	MAB	Lieu et date du premier isolement de <i>V. tapetis</i> chez l'espèce
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Palourde japonaise	Oui	Landeda (France), 1988
<i>Ruditapes decussatus</i>	Palourde européenne	Oui	Galice (Espagne), 1992
<i>Venerupis aurea</i>	Palourde	Oui	Quiberon (France), 1990
<i>Dosinia exoleta</i>	Palourde	Oui	Glénan (France), 2003
<i>Polittapes rhomboides</i>	Palourde	Oui	Glénan (France), 2008
<i>Cerastoderma edule</i>	Coque	Non	Quiberon (France), 1990

La maladie de l'anneau brun est ainsi principalement développée sur les côtes Nord européennes et touche majoritairement l'espèce *Ruditapes philippinarum*. Elle est associée à la bactérie *V. tapetis* avec des souches dont la pathogénicité est plus importante chez les isolats datant de la période d'apparition de la maladie à la fin des années 80s.

### 1.3. Les symptômes de la MAB

La conchyoline est une matrice organique composée de protéines et de polysaccharides, sécrétée par le manteau et liée aux cristaux de carbonate de calcium aragonitique pour former la coquille de la palourde. Durant la MAB, l'inhibition de la biominéralisation de la coquille entraîne l'accumulation de cette matrice organique brune, rendant observable la présence de ce dépôt brun caractéristique de la maladie (Paillard et al., 1994). Les trois phases de la MAB ont été décrites par Paillard et Maes (1994). La MAB se caractérise, d'une part selon les 7 stades de dépôt de conchyoline (CDS pour *conchioline deposit stages*) et d'autre part selon les 3 stades de réparation de la coquille (SRS pour *shell repair stages*), (tableau 3).

Phase	CDS	SRS
1	Stades 1 à 7	Stade 0
2	Stades 1 à 7	Stades 1 à 2.5
3	Stade 0	Stade 3

Tableau 3 : Les trois phases de la MAB décrit par Paillard and Maes (1994) et Paillard, (2017)

C'est durant la phase 2 que la concentration maximale en bactérie *V. tapetis* est atteinte (Paillard, 2016). Bien que des réductions de la croissance, caractérisées par la présence de déformations de la coquille, soient fréquemment observées chez les palourdes malades, les lésions tissulaires sont en revanche peu fréquentes et caractéristiques des stades avancés de la maladie. De plus, la diminution significative des réserves en glycogène chez les palourdes atteintes laisse supposer un effet dégénératif de la maladie sur l'activité métabolique des animaux malades (Beguier, 2005; P. Gouilletquer et al., 1989b; Paillard et al., 2004, 1989; Paillard, 1992).

Les stades de dépôts de conchyoline (CDS, Fig. 7) ont été décrits par Paillard and Maes (1994), dans le but de caractériser l'avancement de la maladie chez les palourdes atteintes selon la localisation et l'étendue du dépôt brun permettant de standardiser le suivi de la MAB dans tous les pays où elle a été rencontrée.

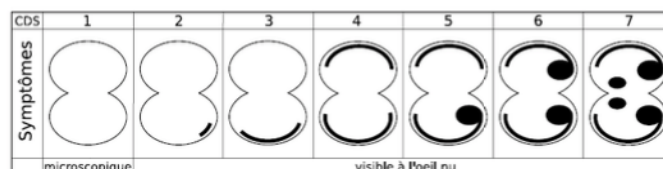


Figure 7 :Classification des stades de dépôts de conchyoline (CDS) à partir de l'observation du dépôt brun caractéristique de la MAB, (Paillard and Maes, 1994)

La réparation coquillière porte également le nom de « nacrization ». Lors de ce processus, la palourde recouvre le dépôt de conchyoline en sécrétant de la coquille. L'animal est alors considéré comme guéri lorsque l'intégralité du dépôt brun est recouvert (Paillard, 1992).

La réparation coquillière est également décrite en stades permettant de mesurer l'avancée de ce processus. Paillard (2004) a établi les 4 stades de réparation de la coquille (SRS) suivants, illustrés dans la figure 8 :

0. MAB sans réparation de la coquille
1. Apposition de concrétions calcifiées

2. Grandes plaques partiellement calcifiées
- 2.5 Guérison presque complète : bien que de grandes plaques soient calcifiées, de petits points noirs persistent.
3. Guérison complète.

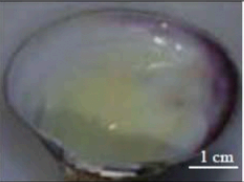
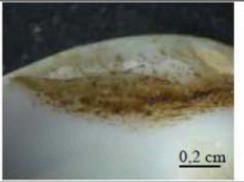
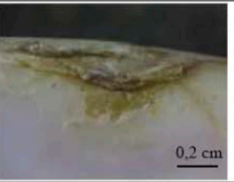
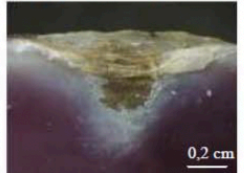
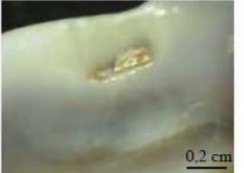
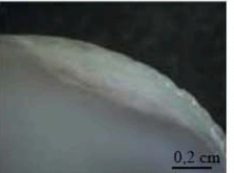
Shell Repair Stages (SRS)	Non-BRD-affected clam	SRS 0	SRS 1
Description	Homogenous inner layer	Brown deposit without repair	Brown deposit with points of repair
Figure			
Shell Repair Stages (SRS)	SRS 2	SRS 2.5	SRS 3
Description	Brown deposit with plates of repair	Almost total repair	Total repair
Figure			

Figure 8 : Les différents stades de réparation coquillière de la palourde *R. philippinarum* victime de la MAB (Trinkler, 2009; Trinkler et al., 2011)

#### 1.4. Critères de diagnostics de la MAB

Pour que le diagnostic de la MAB soit établi chez un nouvel organisme, trois critères majoritaires doivent être retrouvés chez les palourdes atteintes (C. Paillard, 2004b; Paillard, 2017)

1. Détection d'un dépôt brun après un examen microscopique : C'est le premier critère sans lequel la MAB ne peut être diagnostiquée.
2. Isolement du pathogène *Vibrio tapetis* (qui peut être difficile car celui-ci n'est pas une bactérie prédominante de la microflore hétérotrophe) ou test d'agglutination positif avec des anticorps anti-IS1 (*V. tapetis*)  
ou
3. Mise en évidence du pathogène par des méthodes immunologiques (IIF : Indirect Immuno Fluorescence ou ELISA) ou bien moléculaire (SSP-PCR : species specific primer PCR ou qPCR).

Si aucun dépôt brun n'a été mis en évidence, l'organisme étudié est considéré comme non infecté. Si l'organisme en question ne présente pas le critère 2 ou 3, celui-ci est considéré comme non porteur du pathogène.

## II. *V. tapetis* : un pathogène aux multiples hôtes

La Maladie de l'Anneau Brun ou MAB est une maladie microparasitaire due à la bactérie pathogène *Vibrio tapetis* affectant principalement la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Ce pathogène possède un spectre d'infection dépassant le cadre de la maladie de l'anneau brun avec une grande diversité d'hôtes infectés par la bactérie. Cette partie décrit l'espèce *V. tapetis* et rend compte de la diversité des souches associées à cette espèce.

### 2.1. Phylogénie

L'espèce *V. tapetis* a été isolée pour la première fois par Paillard and Maes, (1990) dans le cadre d'un programme européen FAR (1992-1996) coordonné par Le Pennec, Paillard et Maes (1989). Cette bactérie a été décrite en tant que nouvelle espèce par Borrego et al. (1996).

Tableau 4: Phylogénie de la bactérie marine *Vibrio tapetis*

<b>Règne</b>	Procaryote, Bactérie
<b>Phylum</b>	Protéobactérie
<b>Classe</b>	Gammaproteobactérie
<b>Famille</b>	Vibrionaceae
<b>Genre</b>	<i>Vibrio</i> (Pacini, 1854)
<b>Espèce</b>	<i>Vibrio tapetis</i> (Borrego et al., 1996a)

### 2.2. Écologie du genre *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries marines hétérotrophes pouvant être retrouvées dans un grand nombre d'habitats tels que dans le sédiment, sous forme libre planctonique dans la colonne d'eau ou sous forme de biofilms attachés à des surfaces (Asplund, 2013). Ils jouent un rôle important dans le recyclage des nutriments par la reminéralisation de la matière organique (Pruzzo et al., 2005). Parmi les espèces de *Vibrios* pathogènes, 12 sont actuellement connues pour être des pathogènes humains, les plus connues étant *Vibrio cholerae*, retrouvée principalement dans des eaux saumâtres ou douces, ainsi que *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus* plutôt localisées dans les aires marines côtières (Asplund, 2013). La consommation d'eau ou de produits de la mer infectés par une de ces trois espèces peut mener à de graves infections gastro-intestinales pouvant aller jusqu'à la mort.



Les bactéries du genre *Vibrio* sont également responsables d'épisodes infectieux voire même de mortalités chez de nombreuses espèces marines. Parmi eux, nous pouvons retrouver *V. tasmaniensis* LGP32, pathogène de l'huître *C. gigas*, ou *V. harveyi*, pathogène de l'ormeau.

### **2.3. Diversité des souches de *V. tapetis***

L'espèce *V. tapetis* possède un large spectre d'hôtes comprenant des mollusques bivalves mais également différentes espèces de poissons. Il est très intéressant que cette espèce soit capable d'infecter à la fois des hôtes invertébrés et des vertébrés, avec des souches présentant une spécificité d'hôtes. Le tableau 5 recense les souches de *V. tapetis* découvertes de 1988 à 2017, ainsi que leur hôte associé.

Tableau 5 : Liste des souches de *V. tapetis* isolées dans le monde de 1988 à 2017

<i>V. tapetis</i> isolées	Espèce	Subsp.	Année	Lieu	Hôte	Référence
CECT4600	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard and Maes 1995; Borrego et al. 1996
IS1 (VP1)	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1988	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Paillard and Maes, 1990; Maes and Paillard 1992b; Borrego et al. 1996
IS5	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
IS7	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
IS8	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Venerupis aurea</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
IS9	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Cerastoderma edule</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
RP 2.3.	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
RP 8.17	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
RP 9.7	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
RP 11.2	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
HRPR1	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
HRPR2	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
HRPR3	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
HRPR4	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
HRPR5	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR1	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR2	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR3	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR4	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR5	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
ERPR6	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2002	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
P21	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1993	France, Rade de Brest	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C. Paillard 2004a
P16B	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1995	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Allam, Paillard, and Ford 2002
GDE	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2003	France, Glénan	<i>Dosinia exoleta</i>	C. Paillard 2004a; Dias et al. 2018
GTR I	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2008	France, Glénan	<i>Politapes rhomboides</i>	Dias et al. 2018
RD 0202	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1992	Espagne, Galice	<i>Ruditapes decussatus</i>	Novoa et al. 1998
RD 0705	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1992	Espagne, Galice	<i>Ruditapes decussatus</i>	Novoa et al. 1998
RP 1703	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1992	Espagne, Galice	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Novoa et al. 1998
RP 6301	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1992	Espagne, Galice	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Novoa et al. 1998
a200	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Dicologlossa cuneata</i>	Lopez et al. 2011

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

V. tapetis isolées	Espèce	Subsp.	Année	Lieu	Hôte	Référence
a201	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Dicologlossa cuneata</i>	Lopez et al. 2011
a204	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Dicologlossa cuneata</i>	Lopez et al. 2011
a255	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Dicologlossa cuneata</i>	Lopez et al. 2011
C0620701B	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2007	Espagne	<i>Umbrina cirrosa</i>	Balboa and Romalde 2013; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C0620701H	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2007	Espagne	<i>Umbrina cirrosa</i>	Balboa and Romalde 2013; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C0620701R	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2007	Espagne	<i>Umbrina cirrosa</i>	Balboa and Romalde 2013; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C 11.25	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Rodríguez et al. 2006; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C 17.20	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C23.27	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
C 23.28	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
CMJ 10.7	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Rodríguez et al. 2006; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
CMJ 19.27	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2005	Espagne	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
UK6	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1996	Grande Bretagne, Poole Harbour	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Allam, Paillard, and Auffret 2000
HH6087 (CECT 8161)	<i>V. tapetis</i>	<i>britannicus</i>	2002	Grande Bretagne, Glasgow	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Reid et al. 2003
127 (HE795150)	<i>V. tapetis</i>	<i>britannicus</i>	2005	Irlande	<i>Ruditapes philippinarum (naissain)</i>	Drummond et al. 2007; Balboa and Romalde 2013; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
102 (HE795149)	<i>V. tapetis</i>	<i>britannicus</i>	2005	Irlande	<i>Ruditapes philippinarum (naissain)</i>	Drummond et al. 2007; Balboa and Romalde 2013; Balboa, Bastardo, and Romalde 2014
LP2	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1999	Norvège, Bergen	<i>Symphodus melops</i>	Jensen et al. 2003
S2-2	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2009	Norvège	<i>Solea solea</i>	S Mortensen, 2009 (unpublished data), Bidault et al. 2015
2AU	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BB	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BW	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BT	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BA	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2AC	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BC	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BCT	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2AE	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BG	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BU	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
2BM	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
V. tap Tong	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2015	Belgique (Experimental environment)	<i>Solea solea</i>	Declercq et al. 2015
Sole 1-A	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2011 et 2013	Belgique (Norh sea)	<i>Solea solea</i>	Declercq et al. 2015
Sole 1-B	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2011 et 2013	Belgique (Norh sea)	<i>Solea solea</i>	Declercq et al. 2015

<i>V. tapetis</i> isolées	Espèce	Subsp.	Année	Lieu	Hôte	Référence
QL-9 (CECT 8851)	<i>V. tapetis</i>	<i>quintayensis</i>	2014	Chili (Quintay)	<i>Paralichthys adspersus</i>	Levican et al. 2017
QL-35	<i>V. tapetis</i>	<i>quintayensis</i>	2014	Chili (Quintay)	<i>Paralichthys adspersus</i>	Levican et al. 2017
QL-41	<i>V. tapetis</i>	<i>quintayensis</i>	2014	Chili (Quintay)	<i>Paralichthys adspersus</i>	Levican et al. 2017
QL-20	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2010	Chili (Quintay)	<i>Genypterus chilensis</i>	Levican et al. 2017
QL-47	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2010	Chili (Quintay)	<i>Genypterus chilensis</i>	Levican et al. 2017
QL-48	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2010	Chili (Quintay)	<i>Genypterus chilensis</i>	Levican et al. 2017
QL-50	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2010	Chili (Quintay)	<i>Genypterus chilensis</i>	Levican et al. 2017
FPC 1121	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2008	Japon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Matsuyama et al. 2010
NRP45	<i>V. tapetis-like</i>	-	2003	Norvège (Espevik)	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Paillard et al. 2008b

La bactérie *V. tapetis* a été isolée chez différentes espèces bivalves et poissons. La figure 9 représente la répartition géographique des souches isolées en fonction du type d'hôte duquel elles proviennent.

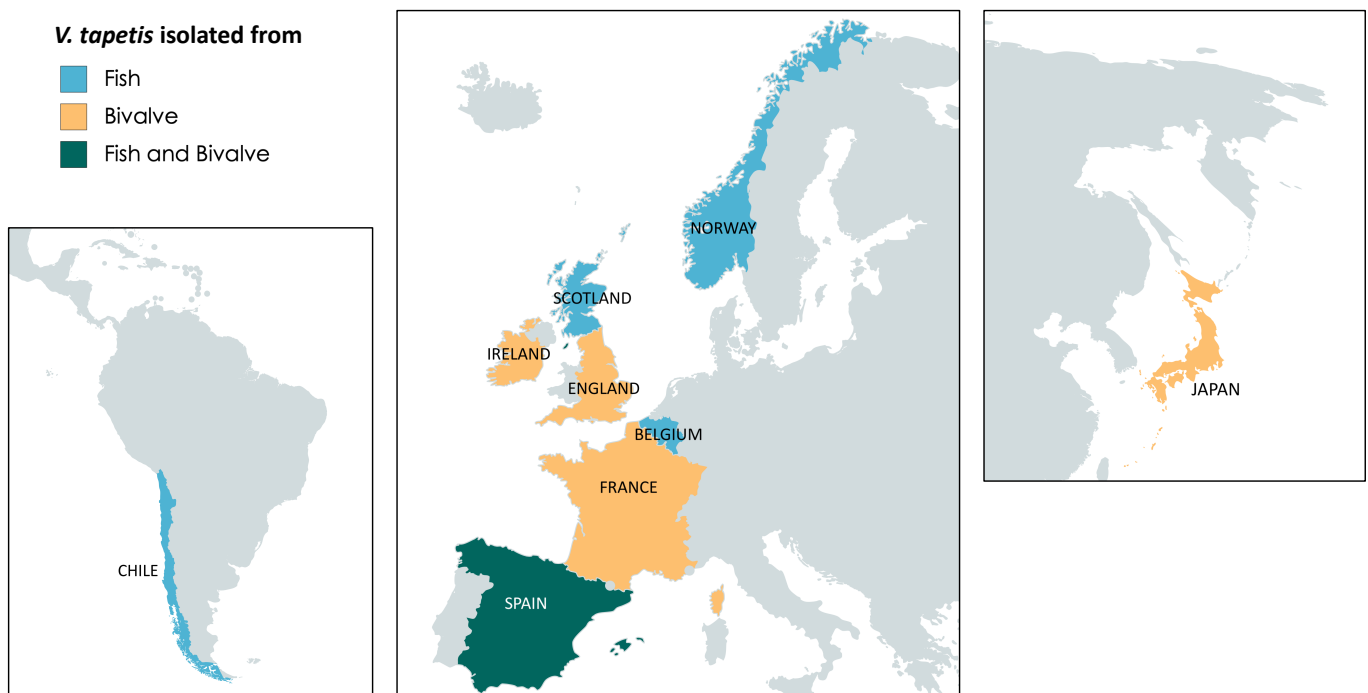


Figure 9 : Répartition des souches de *V. tapetis* dans le monde en fonction de l'hôte infecté

La plupart des souches isolées à ce jour l'ont été en Europe. Les isolats provenant du Japon et du Chili sont très récents (2008 et 2010-2014 respectivement). La diversité des souches connues de *V. tapetis* et leur répartition géographique sont des éléments essentiels de la compréhension des mécanismes de pathogénicité de l'espèce dans le cadre de la MAB.

### 2.4. Description des principales souches *V. tapetis subsp tapetis*

#### *CECT4600 : souche de référence de la MAB*

La souche de référence de *V. tapetis* est CECT4600<sup>T</sup> (43,2% GC) aussi connues sous l'appellation ATCC70075<sup>T</sup>, B1090<sup>T</sup> ou encore LMG19706<sup>T</sup> (Borrego et al., 1996a). Cette souche possède 2 chromosomes (de respectivement 3,8 et 1,8 Mb) et 1 plasmide (82kb, Erauso et al., 2011).

#### *Description morphologique*

Bactérie Gram-négative de la classe des Gammaprotéobactérie, elle fait partie de la famille des *Vibrionaceae*. Bacille incurvé de 1 à 1,5 µm de long et 0,5 µm de large, elle possède un flagelle polaire et ne sporule pas.

#### *Description biochimique*

L'espèce bactérienne *V. tapetis* pousse sur milieu marine agar (Difco), tryptone-soja agar (Oxoid) contenant 2% de NaCl et Milieu TCBS agar (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) en formant des colonies vertes. Les colonies formées sont circulaires, de forme régulière, translucides et non pigmentées au bout de 48H à 20°C ± 2°C. Aucun déplacement de type « swarming », n'est observé quels que soient les milieux testés, c'est à dire un mouvement rapide et coordonné d'une population bactérienne sur une surface semi-solide résultant d'une activité intercellulaire et de différenciation morphologique des cellules. Ces bactéries peuvent adopter un métabolisme du glucose fermentaire. La bactérie est catalase positive, oxydase positive et réduit les nitrates en nitrites. Elle est anaérobie facultative, chimioorganotrophe et sensible à l'agent Vibriostatique O/129 (150 µg) (Borrego et al., 1996a; Paillard and Maes, 1990).

D'après Borrego et al. 1996, les bactéries de l'espèce *V. tapetis* se peuvent être distinguées des autres types de Vibrions sur la base des propriétés biochimiques suivantes :

- Production d'indole
- Croissance à 4°C
- Absence de croissance à 30°C
- Absence de croissance sans NaCl
- Absence de croissance à 6% NaCl
- Absence de production d'Arginine déshydrolase
- Production de la Béta-galactosidase
- Hydrolyse la gélatine, la caséine, la lécithine et l'amidon
- Incapacité à utiliser le sucrose, le D-mannitol ou l'amygdaline

### **LP2 : souche pathogène du crénilabre *Symphodius***

Jusqu'à la fin des années 90, *V. tapetis* n'avait été retrouvé que dans les espèces de palourdes *R. philippinarum*, *R. decussatus*, *T. rhomboïdes* et *V. aurea* (Maes and Paillard, 1992). La première souche pathogène de poisson a été mise en évidence par Jensen et al. (2003). Isolée en Norvège en 1999, elle a été nommée LP2 et a été isolée du Crénilabre *Symphodus melops*. Ces auteurs ont caractérisé la souche LP2 selon ses conditions de cultures et caractéristiques phénotypiques ainsi que ses caractéristiques moléculaires. LP2 présentent les mêmes aspects phénotypiques que les souches précédemment identifiées de *V. tapetis* mise à part la capacité à utiliser le sucrose et le sorbitol. La souche LP2 est bien sensible au composé Vibriostatique O/129. La réalisation du test d'agglutination avec des anticorps anti CECT4600 a révélé une agglutination réduite et modérée, comparée au contrôle positif en présence de *V. tapetis* CECT4600. Cette souche est capable de croître de 4° à 20°C et pas à 30°C.

L'hybridation ADN-ADN entre LP2 et CECT4600 a révélé 76,8% d'hybridation (écarts type 4,5%) plaçant bien LP2 dans l'espèce *tapetis* (le critère pour appartenir à la même espèce étant une hybridation supérieure à 70%). (Jensen et al., 2003)

### **a200, a201, a204, a255 : souches pathogènes du céteau**

Le céteau est un poisson de la famille des *Soleidae* (Costello, 2001). C'est chez l'espèce *Dicoglossa cuneata* qu'ont été isolées, lors de deux épidémies au printemps 2005, 4 souches bactériennes à partir des ulcères portés par ces poissons (Lopez et al. 2011). Ces auteurs ont procédé à une caractérisation phénotypique, sérologique et moléculaire des 4 souches isolées. Ces souches n'utilisent pas le mannitol ou le sucrose et sont sensibles au composé Vibriostatique O/129. Elles sont capables de croître à 4°C et 20°C mais pas à 30°C.

Un « molecular fingerprint » ou analyse d'empreinte moléculaire a été réalisé par REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) et ERIC-PCR (Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus) sur les 4 souches isolées du céteau et sur 3 souches de *V. tapetis* appartenant aux trois groupes génétiques déjà définis (CECT4600, RD0202, HH6087). Avec les souches pathogènes de céteau, les résultats de l'expérience mettent en évidence un profil unique tandis que le pourcentage de similarité avec les souches de références montre des disparités, comme le montre le tableau ci-dessous :

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 6 : Pourcentages de similarités des profils obtenus par REP PCR (Repetitive Extragenic Palindromic) et ERIC PCR (Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus ) réalisées par Lopez et al. (2011)

Souches <i>V. tapetis</i>	% similarités REP PCR	% similarités ERIC PCR
a200, 201, 204, 255	100%	82%
RD0202	70%	<44%
CECT4600	61%	<44%
HH087	37%	<44%

L'appartenance de ces isolats à l'espèce *V. tapetis* a été déterminée grâce à une analyse multilocus réalisée d'une part sur le gène de l'ADNr16s des isolats présentant 100% d'hybridation avec celui de la souche CECT4600 et 99% avec celui de la souche HH6087. D'autre part, cette analyse a également été réalisée à partir des gènes de ménage *atpA*, *pyrH*, *rpoA*. Le dendrogramme obtenu confirme le clustering des souches pathogènes de céteau avec les autres souches de *V. tapetis*.

Les auteurs ont donc mis en évidence l'existence d'un nouveau groupe génétique composé de quatre souches de *V. tapetis* pathogènes du céteau *D. cuneata*.

En revanche, l'analyse sérologique a révélé des disparités entre les souches pathogènes de céteau et celles pathogènes de palourdes : aucune agglutination n'est observée avec les anticorps des souches communes de *V. tapetis* mettant bien en évidence l'existence de plusieurs sérotypes de *V. tapetis*. Enfin, les auteurs ont réalisé des tests de pathogénicités par infection expérimentale de la souche a255 par injection dans la cavité intrapéritonéale du céteau *D. cuneata*. Aucune mortalité, ni aucun symptôme de maladie, n'ont été observés durant la période d'infection expérimentale de 18 jours, soulignant le caractère potentiellement opportuniste de cette souche (Lopez et al., 2011).

### 2.5. Description des principales souches *V. tapetis subsp. britannicus subsp. nov*

#### *Description de la sous espèce : V. tapetis subsp. britannicus*

Grâce à une analyse multilocus des souches de *V. tapetis* déjà isolées, Balboa and Romalde (2013) ont mis en évidence une nouvelle sous espèces de *V. tapetis* nommée *V. tapetis subsp. britannicus subsp. nov*. Ces auteurs ont étudié les gènes ADNr16s, *atpA* (sous unité alpha de l'ATPase), *fstZ* (protéine de la division cellulaire), *gapA* (glycéraldéhyde 3-phosphate-déshydrogénase), *pyrH* (uridine monophosphate

kinase), *recA* (recombinase A), *rpoA* (sous unité alpha de l'ARN polymérase), *rpoD* (facteur sigmaD de l'ARN polymérase) et *topA* (topoisomérase I) de 30 souches de *V. tapetis* isolés des hôtes *R. philippinarum*, *V. aurea*, *C. edulis*, *S. melops*, *U. cirrosa*, *R. decussatus*, *D. cuneata* et *H. hippoglossus*. Leurs résultats montrent que l'espèce *V. tapetis* est un groupe monophylétique avec 99,6 à 100% de similarités de séquences d'ADNr16s entre les souches de *V. tapetis* contre moins de 97,8% avec les autres espèces de *Vibrio*.

La concaténation des séquences des gènes testés a révélé l'existence de deux clusters chez les souches de *V. tapetis* comme le montre la figure ci-dessous.

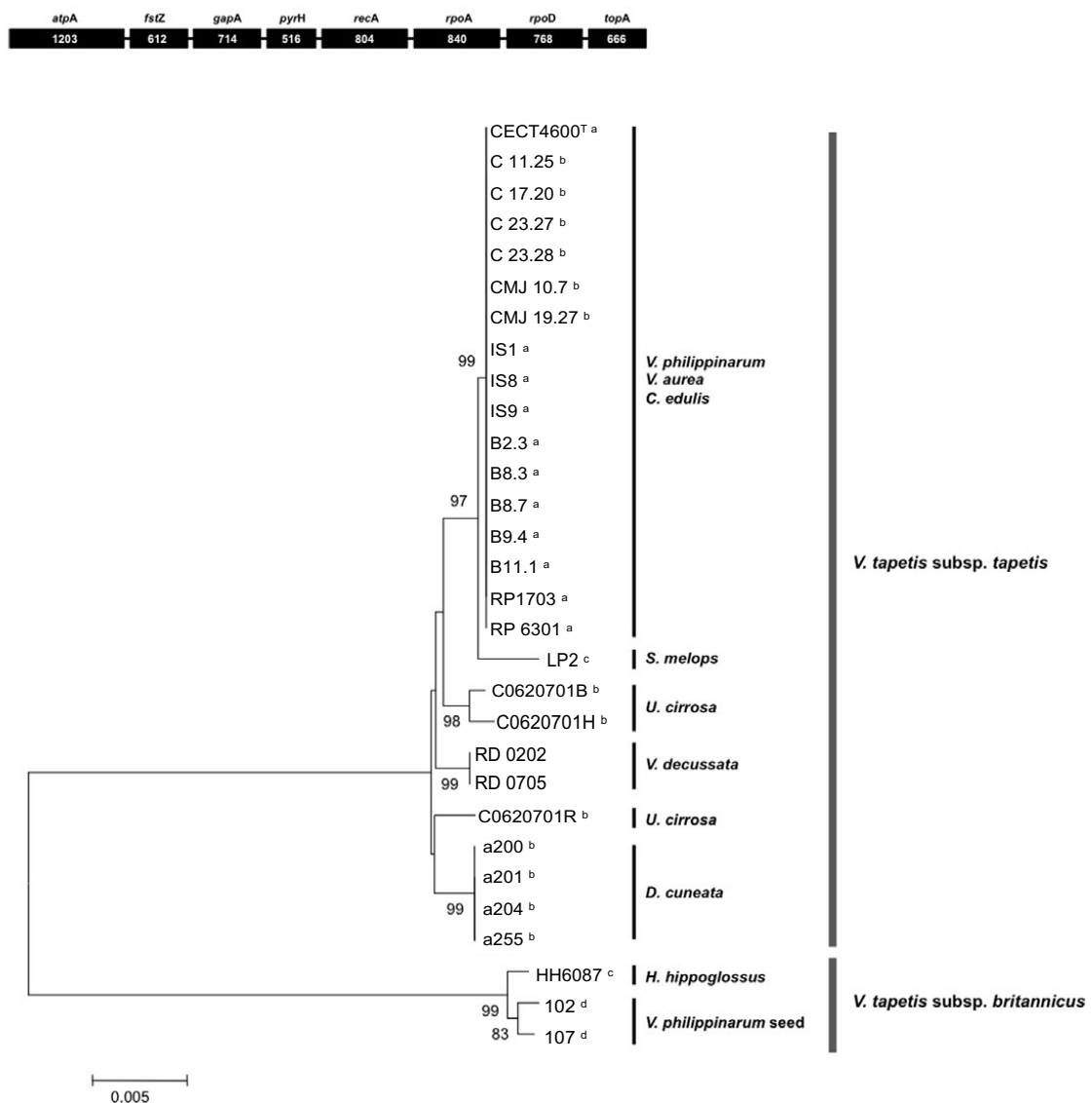


Figure 10 : Mise en évidence des deux clusters au sein de l'espèce *V. tapetis* sur la base la concaténation des séquences nucléotidiques des gènes *atpA*, *fstZ*, *gapA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *rpoD* and *topA*. a : isolation en France,



## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---

b : isolation en Espagne, c : isolation au Royaume-Uni et d : isolation en Irlande. Modifié d'après Balboa and Romalde (2013).

Le cluster 1 ou *V. tapetis subsp. tapetis* (98,2% de similarités entre les séquences du cluster) contient la majorité des souches tandis que le cluster 2 *V. tapetis subsp. britannicus* (99,1% de similarités entre les séquences du cluster) contient la souche isolée du flétan HH6087 et 2 souches découvertes chez *R. philippinarum*, toutes trois isolées au Royaume Uni. Les deux clusters ont 95% de similarités de séquences entre eux contre moins de 89,3% avec les autres bactéries du genre *Vibrio*.

Cette analyse met en évidence l'association entre la provenance géographique (i.e. France, Royaume-Uni, Espagne et Irlande) des souches de *V. tapetis* et la variabilité intra spécifique. De plus, la description phénotypique des souches de la sous espèce *britannicus* se différencie des sous espèces *tapetis* par leur capacité à utiliser le mannitol, l'arabinose et le citrate (Balboa and Romalde, 2013).

### ***HH6087 : souche de référence de la sous espèce britannicus, pathogène du flétan***

La souche HH6087, pathogène du flétan *Hipoglossus hippoglossus*, a été isolée en Grande Bretagne en 2002 (Reid et al., 2003). Ces auteurs ont effectué une analyse des caractéristiques phénotypique, sérologique et moléculaire de la souche par rapport à la souche de référence CECT4600. Il s'agit d'une bactérie à Gram négative, capable de croître en 48H. Le séquençage de l'ADNr16s de HH6087 a révélé 99,93% d'identité avec la séquence d'ADNr16s de la souche CECT4600.

Cette souche est oxydase et catalase positive, fermentent le glucose et est sensible au composé Vibriostatique O/129 mais diffèrent principalement de la souche de référence par sa capacité à utiliser le mannitol et par l'absence d'agglutination lors du test de séro-agglutination avec un anticorps anti-IS1 (*V. tapetis* IS1). Ce dernier point révèle des variations importantes dans les antigènes présents à la surface de la bactérie et surtout plusieurs sérotypes au sein de l'espèce *V. tapetis*. Enfin, HH6087 n'a pas pu induire de maladie chez le flétan, lors de l'inoculation en laboratoire, rendant la relation entre la bactérie et son hôte encore incertaine et probablement opportuniste comme définis plus tard chez les souches pathogènes du céteau (Reid et al., 2003; Lopez et al., 2011).

## 2.6. Le cas particulier de l'espèce *V. tapetis-like*

### *NRP45 : la souche V. tapetis-like*

La palourde japonaise fut introduite en Norvège en 1987 et disséminée dans plusieurs sites entre 1995 et 1996. En juin 2003 et 2004, les palourdes présentant des signes de MAB sont récoltées et les fluides extra-palléaux, tissus et hémolymphe des animaux malades ont été prélevés à la recherche de *V. tapetis*. Une souche appartenant au clade *V. tapetis* fut isolée et nommée NRP45 (Paillard et al., 2008a). La caractérisation phénotypique de cette souche révèle sa capacité à utiliser le mannitol.

Une analyse multilocus portant sur le pourcentage de similarités entre plusieurs gènes de la souche NRP45 et de la souche de référence CECT4600 a été réalisée.

Tableau 7 : Pourcentages de similarités en analyse multilocus sur les souches *V. tapetis* CECT4600 et NRP45, (Paillard et al., 2008a)

Gènes analysés	Similarité de séquence entre les souches NRP45 et CECT4600
ADNr16s	99,6%
GyrB	94,8%
Cpn60	96%

Ces souches sont très similaires concernant les trois gènes testés. Néanmoins, deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce si l'hybridation ADN :ADN entre ces deux souches est supérieure à 70%. En réalisant cette analyse sur les souches CECT4600 et LP2 avec la souche NRP45, le taux moyen d'hybridation est de 55%, bien inférieur au 70% attendu pour définir que deux souches appartiennent à la même espèce. Ainsi, ces auteurs ont mis en évidence d'une part l'existence d'une souche de *Vibrio* très proche mais n'appartenant pas à l'espèce *V. tapetis* d'où l'appellation *V. tapetis-like*. D'autre part, cette analyse a permis de révéler la faible résolution de l'analyse de l'ADNr16s pour déterminer si un isolat appartient à l'espèce *V. tapetis*.

### 2.7. Méthodes de détections du pathogène

#### *Méthodes culturales*

Différentes méthodes culturales permettent de faire croître et d'identifier les souches de l'espèce *V. tapetis* (Maes and Paillard, 1992) :

- Croissance sur milieu Zobell à 18°C
- Croissance sur milieu TCBS : Thiosulfate Citrate Bile Saccharose : lors de la fermentation du saccharose, le milieu s'acidifie modifiant la couleur des colonies du vert au jaune. *V. tapetis* ne fermentant pas le saccharose, les colonies obtenues sont donc vertes.
- Croissance sur milieu ZMB (Zobell, Mannitol, Bleu de Bromothymol) : lors de l'utilisation du mannitol, le milieu s'acidifie modifiant la couleur du bleu de bromothymol (bleu à pH basique et Fuchsia à pH acide). *V. tapetis* n'utilisant pas le mannitol, le milieu reste bleu.

#### *Méthodes immunologiques*

Le test de séro-agglutination est basé sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-IS1 obtenus par l'injection à un lapin de cellules fixées au formol. Ces anticorps reconnaissent les antigènes à la surface de *V. tapetis*. Lorsque la bactérie est mise en présence des anticorps sur lame de Téflon, il y a agglutination (contrôle négatif avec *V. cholerae*, d'après Paillard et al. (2006); Beguier (2005)). Ces méthodes ont permis de mettre en évidence différents sérogroupes sur la base de l'antigène O présent à la surface de *V. tapetis*. 3 sérotypes sont actuellement décrits chez *V. tapetis* : le sérotype CECT4600<sup>T</sup> (O1), le sérotype RD0202 (O2) et le sérotype HH6087 (O3) (Lopez et al., 2011).

#### *Méthodes moléculaires*

##### *SSP-PCR (Species Specific Primers PCR) et hybridation dot blot*

Paillard et al. (2006) ont étudiés l'application des méthodes de SSP-PCR et d'hybridation dot blot, basées sur la création d'amorces spécifiques de l'espèce *V. tapetis* (SSP-PCR ou Species Specific Primers PCR, amplifiant un fragment de l'ADNr16s de *V. tapetis*) et sur la création d'une sonde à partir de l'ADNr16S de CECT4600. Elles ont pour but de détecter la présence de la bactérie, dès les stades larvaires les plus précoces, dans les fluides extra palléaux. Ces auteurs ont défini 3 catégories basées sur la détection de *V. tapetis* et la présence de MAB après 30 jours d'infection :

- Catégorie I : pas de détection de *V. tapetis*, pas de MAB
- Catégorie II : détection de *V. tapetis*, présence de MAB
- Catégorie III : détection de *V. tapetis*, pas de MAB (guérison)

La SSP-PCR et l'hybridation dot blot ont permis, en présence de *V. tapetis*, la détection du pathogène. Cependant, la SSP-PCR est plus spécifique dans la mesure où aucune détection n'est observée, lors de l'expérimentation, en présence de souches n'appartenant pas à l'espèce *V. tapetis* contrairement à l'hybridation dot blot et la séro-agglutination où quelques résultats faux-positifs sont observés. En plus d'être moins chronophage que l'utilisation d'une sonde, la SSP-PCR est également plus sensible que les deux autres méthodes testées car elle permet la détection des larves contaminées dès le départ bien que celles-ci n'aient pas développé de MAB au bout de 30 jours (guérison). En effet, avec l'ancien test Elisa, la limite de détection était de  $5.10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup> or les larves sont très sensibles à la bactérie et ne peuvent avoir des concentrations au-delà de  $10^5$  UFC.ml<sup>-1</sup> sans qu'il y ait de grands taux de mortalités. Dans cet article, les échantillons de larves étaient contaminés à  $10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup> (sans mortalités). Ces auteurs ont permis, pour la première fois, de détecter *V. tapetis* dans des larves (inférieures à 2mm). En sélectionnant des larves capables d'éliminer le pathogène, la SSP-PCR pourrait ainsi permettre de sélectionner des souches résistantes à la bactérie.

#### *PCR en temps réel TAQMAN*

Bidault et al. (2015) ont développé une technique de quantification de *V. tapetis* dans les fluides extra-palléaux basée sur la présence d'une copie unique du gène *virB4* appartenant à l'opéron VirB et codant pour une protéine impliquée dans le système de sécrétion de type IV (T4SS). La première description du T4SS chez les bactérie Gram négative a été faite chez le phyto-pathogène *Agrobacterium tumefaciens* (Escobar and Dandekar, 2003; Voth et al., 2012). La quantification s'effectue, à partir des fluides extra-palléaux des palourdes dans les différentes conditions expérimentales, par qPCR TAQMAN basée sur l'utilisation d'une sonde spécifique du gène *virB4* marquée par deux colorants fluorescents.

Pour cela, les auteurs ont testé un grand nombre de souches de *V. tapetis* et d'autres espèces de *Vibrio* sur la base de leur virulence et sur la quantification par qPCR du gène *virB4*, la limite de détection de la méthode étant de  $1,125 \times 10^1$  UFC.ml<sup>-1</sup> de fluide extra palléaux.

Lorsque les premiers symptômes de MAB apparaissent (7j post infection, dépôt brun de conchyoline), une plus faible concentration *V. tapetis* est détectée lors de la qPCR. Cela s'explique par le fait que le dépôt de conchyoline a pour but d'englober la bactérie en la piégeant dans la surface interne du coquillage et de ce fait en diminuant le taux de bactéries circulantes dans les fluides extra palléaux. A priori, seules les souches virulentes vis à vis de la palourde japonaise présentent une copie du gène *virB4* qui peut ainsi être utilisé non seulement pour quantifier la bactérie mais aussi pour mettre en évidence la présence de souches particulièrement virulentes. Par conséquent, ces résultats portent à croire que le système de sécrétion de type IV serait fortement impliqué dans la virulence des souches pathogènes de *V. tapetis*.

### Limites de détection des différentes méthodes

Les techniques moléculaires de détection du pathogène permettent d'obtenir une meilleure sensibilité en détectant des concentrations en *V. tapetis* très faibles à partir de tissus ou de fluides. Cela permet d'identifier la présence du pathogène avant le développement de la maladie et, chez les larves infectées, de suivre leur capacité à éliminer le pathogène et à déterminer les éventuelles résistances associées.

Tableau 8 : Limite de détection des techniques de mise en évidence de *V. tapetis*, d'après Paillard 2004; Paillard et al. 2006; Bidault et al. 2015

Techniques	Limite de détection	Localisation
Isolement du pathogène	5.10 <sup>3</sup> UFC/g de matière fraîche	Tissus
	5.10 <sup>3</sup> UFC/ml	Fluides palléaux
IIF (Indirect Immunofluorescence)	10 <sup>3</sup> UFC/ml	Fluides palléaux
ELISA (enzyme-linked immunoassay)	5.10 <sup>4</sup> UFC/ml	Fluides extra-palléaux et Hémolymphe
SSP – PCR (species specific primer PCR)	10 <sup>2</sup> UFC/ml	Fluides palléaux et homogénats de tissus
TAQMAN PCR	1.125x10 <sup>1</sup> UFC/ml de fluides extra palléaux	Fluides extra palléaux

Le tableau ci-dessus synthétise les limites de détections des différentes techniques connues à ce jour pour mettre en évidence *V. tapetis*. Compte tenu de la mauvaise spécificité de l'ADNr16s pour l'identification de souches de *V. tapetis*, il est à noter que la PCR Taqman est la méthode la plus sensible et la plus spécifique dans la détection des souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes.

---

## 2.8. Virulence connue des souches de *V. tapetis* au regard de la MAB

Différents tests permettent de déterminer la virulence des souches de *V. tapetis* dans la cadre de la MAB. La virulence des souche *in vitro* peut être définie grâce à un test basé sur l'effet du pathogène sur les hémocytes de palourde japonaise infectés (Choquet et al. (2003), effet détaillé dans la partie 3.4 *La toxicité hémocytaire dans le cadre de la MAB*). L'induction de la maladie de l'anneau brun *in vivo* peut également être effectuée par injection du pathogène dans la cavité palléale de palourde japonaise, reproduisant alors la dynamique de l'infection lors de la MAB lorsque la souche est virulente.

Le tableau 9 synthétise l'ensemble des souches de *V. tapetis* pour lequel des tests de virulence ont été réalisés vis à vis du modèle palourde japonaise grâce aux tests *in vitro* et *in vivo* disponibles à ce jour. Il montre l'existence de 3 catégories de souches, compte tenu des données disponibles à ce jour. La première catégorie regroupe les souches isolées de bivalves avant les années 2000 et virulentes au regard des tests décrits. La seconde concerne les souches isolées de bivalves après les années 2000 et non pathogènes (à l'exception de la souche FCP1121 isolée en 2008). Enfin, la dernière catégorie comprend les souches isolées de poissons et non pathogènes au regard de ces test de virulence. Ces catégories seront un élément clé du chapitre 2 développé durant cette thèse.

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 9 : Virulence connue des souches de *V. tapetis* vis à vis de la palourde japonaise *R. philippinarum*. POS : positif, NEG : négatif, ND : non déterminé. Synthèse des données récoltées d'après Bidault et al. (2015b); Dias et al. (2018).

Souches de <i>V. tapetis</i>	Hôte	Année	Décollement d'hémocytes chez <i>R. philippinarum</i> in vitro	Induction de la MAB chez <i>R. philippinarum</i> in vivo
CECT4600	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990	POS	POS
IS1 (VP1)	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1988	POS	POS
IS5	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1991	POS	POS
IS7	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990	POS	POS
IS8	<i>Venerupis aurea</i>	1990	POS	POS
IS9	<i>Cerastoderma edule</i>	1990	POS	POS
RP 2.3	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990-1991	ND	POS
RP 8.17	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990-1991	POS	POS
RP 9.7	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990-1991	POS	POS
RP 11.2	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1990-1991	POS	POS
RD 0705	<i>Ruditapes decussatus</i>	1992	NEG	POS
P16B	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1995	POS	POS
UK6	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1996	POS	POS
LP2	<i>Symphodus melops</i>	1999	NEG	NEG
HH6087 (CECT 8161)	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	2002	NEG	NEG
GDE	<i>Dosynia exoleta</i>	2003	NEG	NEG
FPC 1121	<i>Ruditapes philippinarum</i>	2008	ND	POS
GTR I	<i>Polititapes rhomboides</i>	2008	NEG	ND
S2-2	<i>Solea solea</i>	2009	ND	NEG

### III. Interaction hôte-pathogène

#### 3.1. Approche éco-physiologique de la relation hôte pathogène

Le schéma suivant établi par Paillard (2016) synthétise la MAB d'un point de vue écologique, physiologique et épidémiologique. En effet, *V. tapetis* est une bactérie d'eau froide sévissant particulièrement en hivers lorsque sa virulence est maximale et que le système immunitaire de la palourde est plus affaibli.

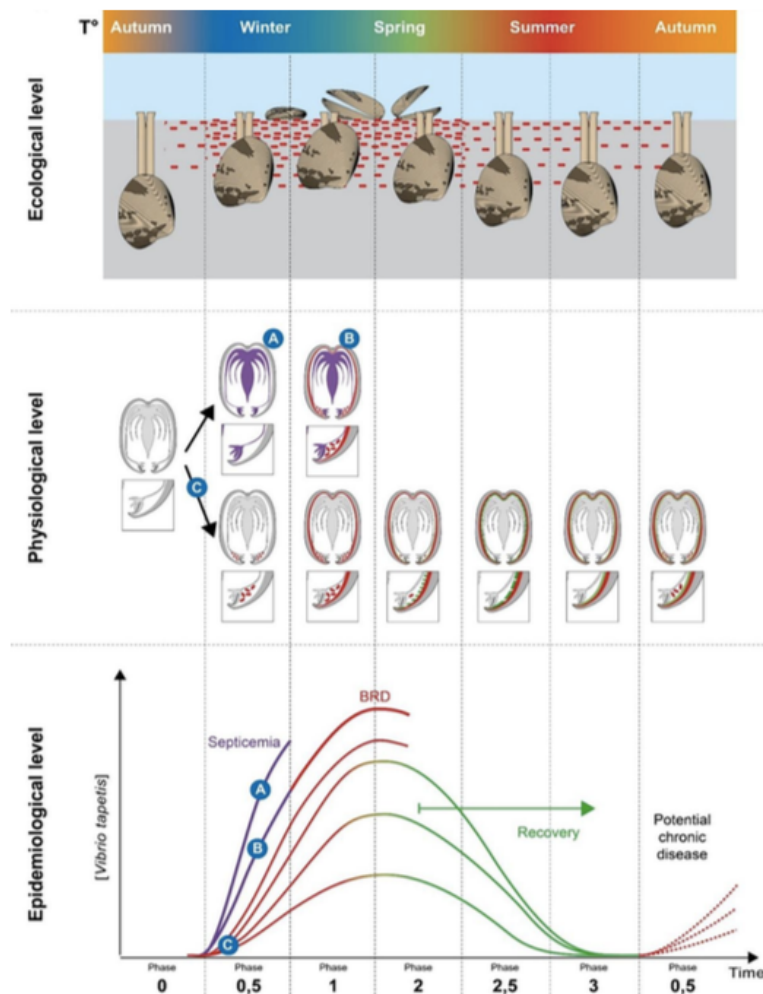


Figure 11 : Synthèse de la MAB d'un point de vue écologique (localisation des animaux dans le sédiment), physiologique (localisation du pathogène dans l'animal) et épidémiologique (évolution de la concentration en *V. tapetis* dans l'animal lors de la septicémie, le développement de la MAB ou la réparation coquillière). A : *Vibrio tapetis* dans les tissus (violet); C: *V. tapetis* dans les fluides palléaux et extra palléaux (rouge); B: *V. tapetis* dans les compartiments internes et externes (violet et rouge). Réparation coquillière en vert (Paillard, 2016).

D'un point de vue physiologique, sur la figure 11, le stade A représente une invasion du pathogène dans les tissus de la palourde entraînant une septicémie puis la mort de l'animal. Le stade B représente une invasion dans les compartiments internes (microparasite interne) pouvant entraîner la MAB voire même la mort de l'animal. Le





de la combinaison forte densité de palourdes et eaux non renouvelées ; néanmoins il est à noter que ces conditions sont celles le plus souvent retrouvées dans le milieu naturel. Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence deux modes de transmission de la MAB : par l'eau et par les fèces et pseudofèces via le sédiment.

De plus, la capacité du pathogène à agir comme un microparasite et, de ce fait, à ne pas tuer son hôte entraîne une persistance de la bactérie dans l'environnement.

Enfin, les palourdes atteintes par le pathogène ont un comportement modifié en remontant vers la surface, présentant alors des concentrations en *V. tapetis* allant de  $2.10^5$  à  $8.10^9$  UFC/ml. Les plus moribondes, qui jonchent la surface du sédiment, sont ainsi accessible pour les prédateurs tel que le labre *S. melops* et deviennent ainsi une source importante de dissémination du pathogène.

### 3.2. Les différentes stratégies d'infection

L'une des étapes fondamentales dans le développement de la MAB est la colonisation par *V. tapetis* de la lame périostacale, précédant l'envahissement, par le pathogène, de la cavité extra-palléale. D'après Paillard (2004), deux stratégies de colonisation sont possibles :

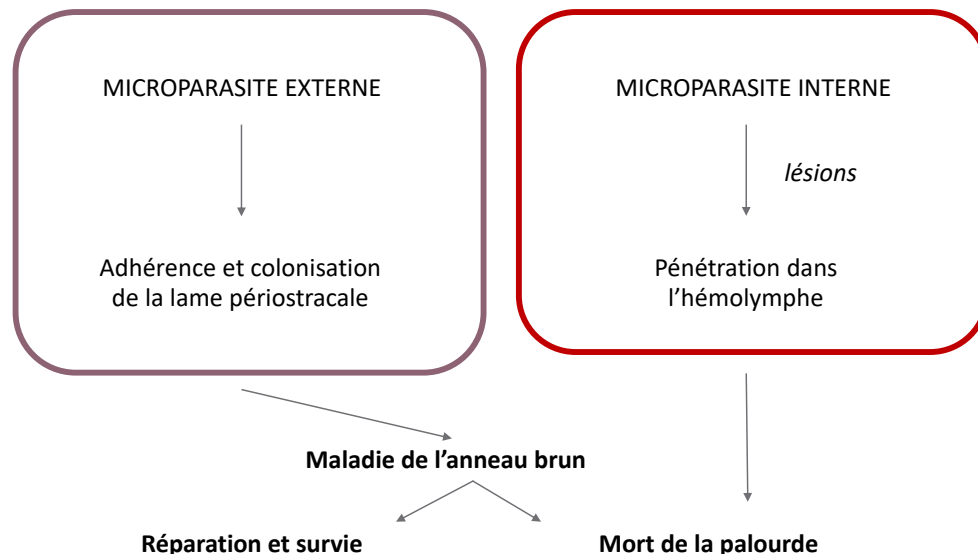


Figure 13 : Les stratégies de colonisation du pathogène de palourdes, *V. tapetis*, d'après Paillard 2004a.

#### Stratégie n°1 : Microparasite externe

Dans ce cas, la bactérie ne pénètre pas à l'intérieur des tissus de l'hôte. Elle adhère et colonise la lame périostacale de la palourde, provoquant des altérations qui

permettent alors la pénétration de la cavité extra-palléale de la bactérie. Elle se développe alors au sein des hémocytes de la palourde, induisant la maladie de l'anneau brun correspondant à une accumulation de conchyoline sur le périostracum de la palourde, révélatrice d'une interférence dans la biominéralisation de la coquille.

### **Stratégie n°2 : Microparasite interne**

Lorsque l'hôte présente des lésions comme des altérations du manteau dues à la prolifération du dépôt de conchyoline, la bactérie pénètre dans les tissus de la palourde et rejoint le système circulatoire dans lequel circule l'hémolymphe. Cela induit de fortes mortalités : mort des palourdes en 5 à 15 jours (Allam and Ford, 2006).

### **3.3. Importance de la colonisation et du site d'infection dans le processus infectieux**

La pathogénicité des souches de *V. tapetis* peut être étudiée *in vivo* grâce à l'injection d'une suspension du pathogène dans 3 compartiments : (i) la cavité palléale, (ii) le muscle adducteur, (iii) la cavité extra-palléale centrale ou périphérique.

(i) Lors de l'injection de souches pathogènes de *V. tapetis* dans la cavité palléale de palourdes saines, celles-ci développent alors les symptômes de la MAB, environ 4 semaines après injection, avec une prévalence allant de 60 à 95%, dépendant de la virulence des souches de pathogènes et des années où l'expérience a eu lieu (Paillard, 2004b).

(ii) Allam et al. (2002), ont également mis au point une expérience visant à injecter directement une suspension de *V. tapetis* dans le muscle adducteur postérieur de la palourde. Cela a eu pour résultats de conduire, en une douzaine de jours, à des mortalités proches de 100%, sans pour autant qu'un dépôt brun ne soit observé. Chez ces palourdes, les tissus connectifs sont également envahis, particulièrement dans le manteau et la glande digestive avec des tissus manifestement nécrosés. La concentration de la suspension bactérienne injectée, dans ce cas, a un rôle très important. Ils ont observé 80% de mortalités lors de l'injection à  $10^9$  bactéries/individu contre 2% pour une concentration de  $10^6$  bactéries/individu. Cet effet met en évidence la relation entre la capacité de clearance de la palourde et la résistance au pathogène. Dans les concentrations les plus importantes, la bactérie semble proliférer plus vite qu'elle ne peut être éliminée.

(iii) Ces auteurs ont également réalisé cette expérience par injection de *V. tapetis* directement dans les FEPs centraux de la palourde japonaise (Allam et al., 2002). Dans ce cas, aucun signe de MAB n'est observé. Cependant, 100% de mortalités cumulées sont relevées 14 jours après injection avec une mesure de la phagocytose évoluant de 60% 2H après infection jusqu'à une absence totale d'hémocytes adhérent (0% de phagocytose) après 7 jours d'infection. De plus, les mêmes expériences réalisées chez la palourde européenne *R. decussatus* ne mettent en évidence aucune mortalité. Au contraire, aucune palourde ne présentait de *V. tapetis* vivant associés aux hémocytes à seulement 3 jours post-infection et aucune charge en *V. tapetis* n'était détectable après 7 jours d'infection. D'autres auteurs ont également réalisé des injections des souches *V. tapetis* CECT4600 et LP2 directement dans les FEPs périphériques (Le Bris et al., 2015). De manière très intéressante, ils ont démontré que l'injection du pathogène dans ce compartiment pouvait induire de la maladie de l'anneau brun et cela plus rapidement qu'après injection dans la cavité palléale. De plus, ils ont également démontré que la souche LP2, n'induisant pas de MAB dans le milieu naturel et en injection dans la cavité palléale, était capable d'induire la MAB lors de son injection dans la cavité extra-palléale.

Ces différentes études ont ainsi mis en lumière d'une part un effet très spécifique de la bactérie sur son hôte et d'autre part le fait que la colonisation de la lame périostracale de *R. philippinarum* par *V. tapetis* joue un rôle clé dans le processus d'infection de la bactérie pour permettre le développement de la MAB et ainsi la persistance et la dissémination du pathogène dans l'environnement. En effet, dans la dynamique naturelle de la MAB, la colonisation de la lame périostracale est suivie par la pénétration de *V. tapetis* dans les FEPs. Ce compartiment possède une microflore hétérotrophe et de nombreuses cellules appelées hémocytes. Les hémocytes sont des cellules du système immunitaire circulant aussi bien dans l'hémolymphe que dans les FEPs chez les bivalves.

### 3.4. Modifications hémocytaires dans le cadre de la MAB

Les hémocytes sont des cellules circulantes pouvant entrer dans les tissus et impliquées dans diverses fonctions telles que la digestion, le transport de nutriment la biominéralisation mais aussi dans l'immunité des mollusques (Cheng, 1996). Lors du développement de la maladie de l'anneau brun, les hémocytes de palourdes présentent un arrondissement caractérisé par la perte des pseudopodes. Ces cellules possèdent des élongations membranaires, appelées pseudopodes, formées d'un

cytosquelette d'actine leur donnant un aspect en étoile et leur permettant de phagocyter les bactéries pathogènes. Ce phénomène d'arrondissement, observé lors de l'exposition des hémocytes à *V. tapetis*, est dû à des remaniements du cytosquelette d'actine entraînant la perte d'adhérence des hémocytes. Les hémocytes recrutés au niveau du site d'infection phagocytent *V. tapetis* qui est alors intégré dans le phagosome. Au lieu d'entraîner la fusion du phagosome avec le lysosome, *V. tapetis* inhibe ce processus et est capable de se multiplier au sein de la cellule hémocytaire. L'infection de l'hémocyte est alors suivie par une inhibition de la polymérisation du cytosquelette d'actine, entraînant la perte des pseudopodes. Lorsque la densité bactérienne devient trop importante, la membrane des hémocytes se rompt et entraînent la dissémination du pathogène dans le compartiment extra-palléal (Paillard, 2004a).

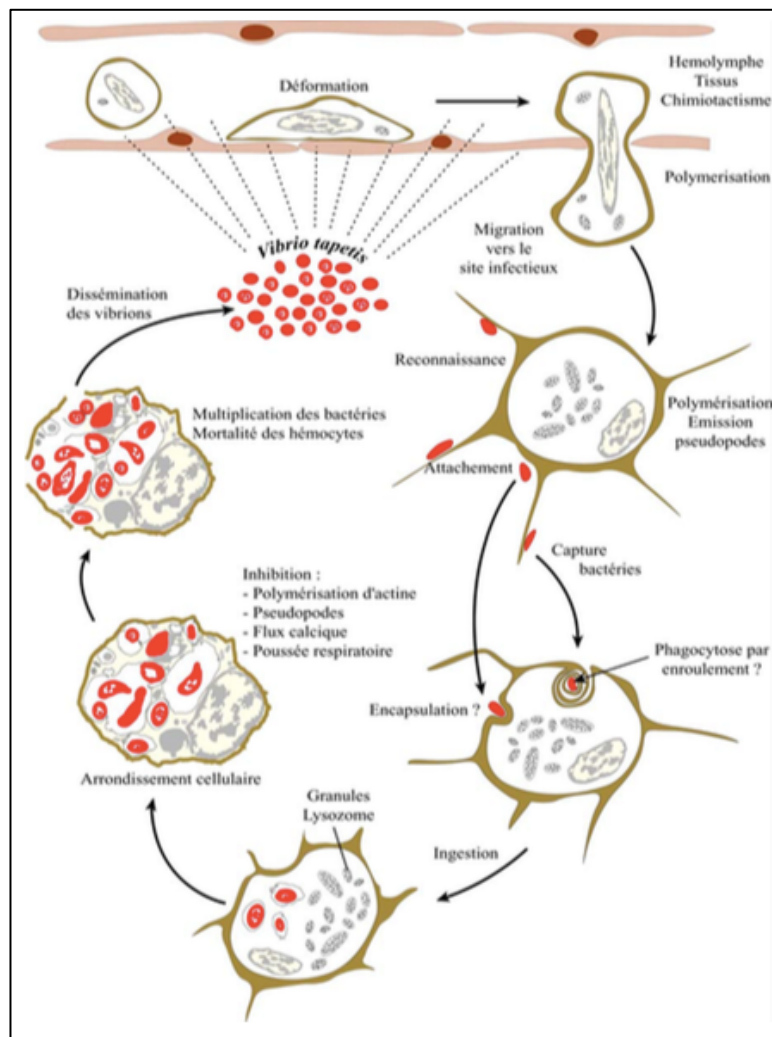


Figure 14: Schéma des diverses étapes d'altération des cellules hémocytaires de *R. philippinarum* suite au contact avec le pathogène *V. tapetis* (rouge). (Paillard, 2004a)

L'activité cytotoxique de *V. tapetis* vis à vis des hémocytes peut être mise en évidence par un test *in vitro* développé par Choquet et al. (2003) appelé *test d'adhérence*. Ce test est utilisé afin de déterminer la virulence des différentes souches de *V. tapetis*. L'hémolymphe de palourdes japonaises est prélevée par introduction d'une aiguille dans le muscle adducteur. Elle est alors incubée durant 3H avec la bactérie *V. tapetis* (25 bactéries par hémocytes) ou avec de l'eau de mer stérile filtrée à 18°C. A la fin de l'expérience, chaque puit est fixé à l'aide de formaldéhyde 3% et présente deux fractions : le surnageant contenant les hémocytes non-adhérents et le fond de plaque contenant les hémocytes adhérents à celui-ci. La quantité d'hémocytes non adhérents est déterminée par cytométrie en flux pour chaque condition testée. Le ratio est exprimé en nombre de cellules non adhérentes après incubation avec la bactérie/ nombre de cellule non adhérente après incubation avec l'eau de mer stérile filtrée. Un ratio statistiquement supérieur à 1 indique un effet cytotoxique de la bactérie sur les hémocytes, caractérisé par une perte d'adhérence de ceux-ci en présence de la bactérie.

### 3.5. Réponse immunitaire et métabolique de *R. philippinarum* lors de l'infection par *V. tapetis*

#### *L'immunité innée et la palourde japonaise*

Les mollusques bivalves tels que la palourde japonaise possèdent comme moyen de défense contre les pathogènes un système immunitaire dit « inné » en opposition au système immunitaire dit « acquis ». Le système immunitaire inné se caractérise par la mobilisation de différentes protéines afin détruire ou limiter la prolifération de bactéries exogènes et permettre de lutter contre les infections. Au sein du système immunitaire, on distingue classiquement le système immunitaire cellulaire du système immunitaire humoral. La composante cellulaire est constituée des cellules du système immunitaire, telles que les hémocytes, agissant via des voies telles que la production d'espèces réactives de l'oxygène ou la mélanisation. La composante humorale du système immunitaire est classiquement associée aux protéines circulantes tels que PRRs (pathogen recognition receptors) ou les lysozymes (Allam and Raftos, 2015; CHU, 1988; Le Bris, 2013).

Les lysozymes sont des enzymes ubiquitaires retrouvées chez un grand nombre d'organismes, des champignons jusqu'aux vertébrés. Ces protéines sont fortement impliquées dans la lutte contre les pathogènes au sein de l'animal en raison de leurs propriétés bactériolytiques. Chez la palourde japonaise, ces enzymes produites par

les hémocytes circulent dans des compartiments tels que l'hémolymphe ou les fluides extra-palléaux et permettent la destruction de bactéries étrangères à la flore microbienne de l'hôte (Ding et al., 2011; López et al., 1997; Paillard et al., 2004).

D'autres protéines appelées cyclophilines pourraient être impliquées dans la défense immunitaire. Les cyclophilines appartiennent à la famille des immunophilines en tant que modulateur de la réponse immunitaire en interagissant avec des molécules immunodépressives telles que la cyclosporine A (Quesniaux et al., 1987). Elles sont soupçonnées d'être impliquées dans les stades précoces d'infection chez plusieurs organismes marins. Chez la crevette *Penaeus monodon*, la cyclophiline est transcriptionnellement surexprimée dans l'hépatopancréas lors de la stimulation avec du LPS (lypopolysaccharide) (Qiu et al., 2009). Chez le poisson chat, *Ictalurus punctatus*, l'infection par la bactérie *Edwardsiella ictaluri* entraînerait une surexpression des transcrits codant pour la cyclophiline (Yeh and Klesius, 2008). Chez *R. philippinarum*, Chen et al., (2011) ont mis en évidence, dans l'hémolymphe, l'expression différentielle de 2 gènes de cyclophilines lors de l'exposition à des pathogènes.

Le système immunitaire inné comprend aussi des voies spécifiques de reconnaissance des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) par des PRRs (Pathogen Recognition Receptors). Une partie de ces PRRs sont membranaires comme par exemple les Toll-like receptors mais ils incluent également des protéines solubles activées par la voie du complément (Parham and Janeway, 2015). Bien que la description complète du système du complément n'a jamais été faite chez les bivalves, de nombreuses études tendent à prouver la présence de ce système (Moreira et al., 2012).

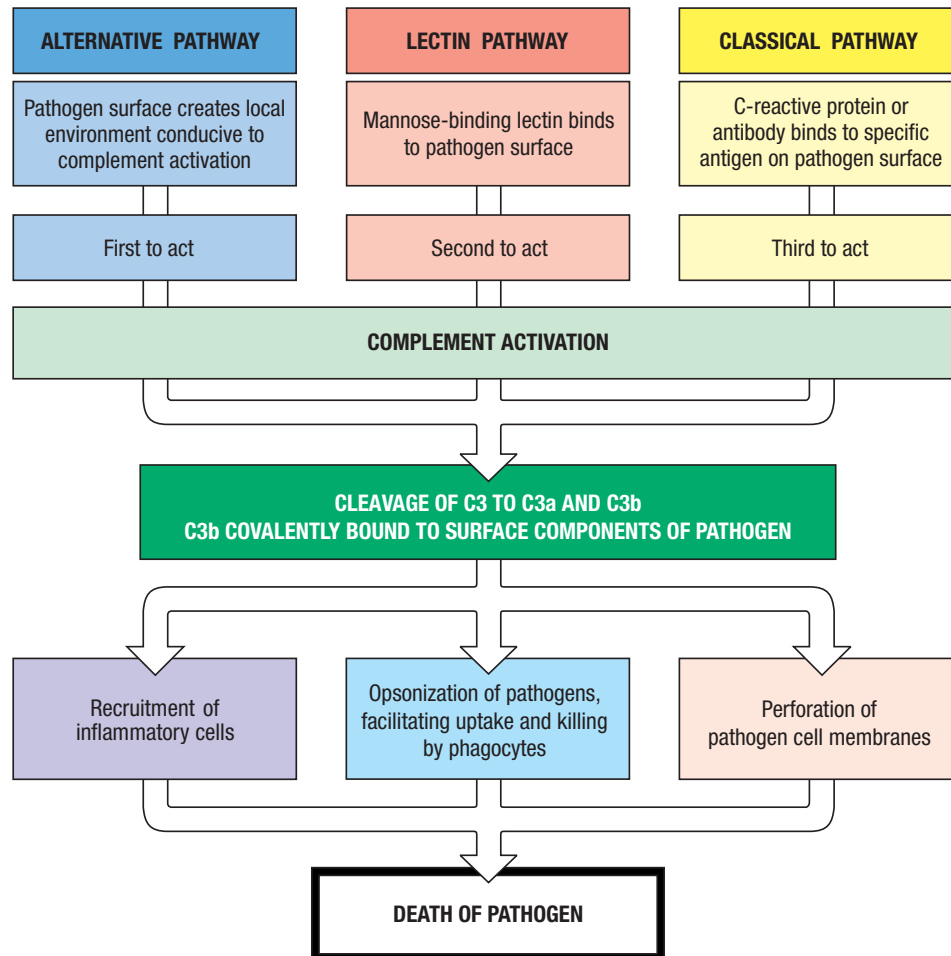


Figure 15 : Les 3 voies d'activation du système du complément en réponse à une infection par un pathogène dans le cadre de la réponse due au système immunitaire inné, d'après Parham and Janeway, (2015).

Le système du complément est activé selon 3 voies : la voie alternative, la voie des lectines et enfin la voie classique. La première voie intervient lors de changements physicochimiques locaux induits par les constituants des bactéries infectieuses. La voie des lectines agit via la liaison des Mannose-Binding Lectin (MBL) à des composés présents sur la paroi des bactéries et autres pathogènes. Enfin, la voie classique est activée par la liaison de la protéine C-réactive à la surface des bactéries. L'ensemble de ces voies ont pour but d'activer le système du complément via le clivage de la protéine C3 en 2 protéines : C3a et C3b. La protéine C3b se lie alors à la surface du pathogène induisant, comme décrit dans la figure 15 ci-dessus : recrutement de cellules inflammatoires, opsonisation du pathogène pour qu'il soit phagocyté ou perforation de la membrane du pathogène, conduisant alors à la mort de l'agent infectieux (Parham and Janeway, 2015).



Moreira et al. (2012), ont identifié une partie des voies moléculaires impliquées dans la réponse immunitaire des hémocytes situés dans les FEPs et l'hémolymphe de palourde japonaise affectées par la MAB. Leur étude présente une analyse transcriptomique d'hémocytes exposés *in vitro* à *V. tapetis*. Ces auteurs ont démontré que les transcrits principaux retrouvés chez les hémocytes stimulés *in vitro* étaient impliqués dans des fonctions liées à l'apoptose, la voie Toll-like ou encore le système du complément. Cette étude est la première à avoir mis en évidence chez les bivalves et plus précisément chez la palourde japonaise la présence de la voie du complément en identifiant presque toutes les molécules de ce système de signalisation en réponse à l'exposition à *V. tapetis*.

### *Systèmes de détoxification et MAB*

Différents auteurs ont étudié la réponse métabolique de la palourde japonaise exposée à l'agent pathogène de la MAB. Richard et al. (2016) ont mis en évidence que la modification du régime alimentaire de la palourde n'impactait pas la réponse métabolique de celle-ci face au pathogène. En revanche, le développement de la MAB impacte fortement la réponse immunitaire et anti-oxydante de l'hôte. 2 jours après injection d'une suspension de *V. tapetis*, on observe, chez les palourdes ne présentant pas les premiers symptômes de MAB, une diminution de leur activité antioxydante ce qui entraîne l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour lutter contre la bactérie. Chez les palourdes sans MAB, à 7 jours post-infection, on observe une activation des enzymes antioxydantes et de la phénoloxydase (permettant une bonne élimination des ROS) contrairement aux palourdes chez lesquelles des symptômes de MAB sont observés. L'activité d'enzymes antioxydantes (rôle dans la détoxification) ou liées au système immunitaire (augmentation de la réponse immunitaire) sont, chez les palourdes, des marqueurs de résistance au développement de la MAB.

Le Bris et al. (2015) ont étudié dans le manteau et l'hémolymphe de palourdes japonaise l'évolution spatio-temporelle de deux enzymes impliquées dans la réponse du système immunitaire lors de l'infection par *V. tapetis* : la phénoloxydase et la superoxyde dismutase (SOD). Cette étude a été menée sur 30 jours post infection par injection, dans la cavité extra-palléale périphérique des palourdes, de 2 souches de *V. tapetis* : CECT4600 (pathogène de la palourde japonaise) et LP2 (non pathogène pour la palourde). 72H après infection, l'hémolymphe (fluide circulant) est marquée par une augmentation de l'activité de la phénoloxydase (à 7 jours post infection) et une diminution de l'activité SOD (à 14j post infection) significativement plus

---

importante lors de l'infection par la souche CECT4600. Les auteurs ont mis en évidence un effet spécifique dans l'hémolymphe dû à la pathogénicité plus importante de la souche CECT4600 sur ces deux enzymes liées au système immunitaire de l'hôte.

En complément de cette étude, Richard et al. (2015) ont étudié l'influence de la température sur l'activité de la SOD et de la phénoloxydase chez les palourdes infectées par CECT4600 et LP2. L'activité basale des deux enzymes est augmentée lorsque les palourdes sont exposées à des températures plus élevées. Ainsi, ils ont mis en évidence un effet amplificateur de la température sur la réponse du système immunitaire des palourdes via les enzymes phénoloxydase et SOD lorsque l'infection s'effectue à 22°C tandis que la virulence des souches, elle, diminue à cette température. Cela est cohérent avec le fait que la réparation coquillère est plus importante à 22°C, permettant à la palourde japonaise d'amorcer le processus de guérison (Paillard, 2016).

En conclusion, la dynamique de la MAB dépend fortement des étapes de colonisation du pathogène, elle-même impactée par des facteurs environnementaux (la température par exemple). Ces derniers influent sur les systèmes de détoxification/réparation mis en place par la palourde japonaise pour lutter contre l'infection à travers des enzymes telles que la SOD ou la phénoloxydase. De plus, la mobilisation du système immunitaire de l'animal joue un rôle clé dans le développement de la MAB puisque celui-ci est en partie détourné par le pathogène via des mécanismes moléculaires qui n'ont pas tous été élucidés à ce jour.

### **3.6. Réponse moléculaire de la palourde japonaise : les voies altérées par le pathogène**

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires liés à la maladie de l'anneau brun, plusieurs études se sont basées sur l'analyse des régulations d'expressions de gènes dans la cadre de la MAB. Ces analyses se basent sur des expériences réalisées *in vitro* sur certains compartiments de la palourde japonaise ou *in vivo* à partir d'animaux infectés expérimentalement ou provenant du milieu naturel.

Dans le cadre de la problématique de la résistance à la MAB de la palourde japonaise, Jeffroy et al. (2013) ont réalisés une analyse sur l'hémolymphe et le manteau de palourdes japonaises infectées avec la souche CECT4600 jusqu'à l'étape de

réparation coquillière. Cette analyse est basée sur une technique appelée *Suppression Subtractive Hybridization* ou SSH qui permet l'amplification par PCR de fragments d'ADNc correspondant aux ARNm différenciellement exprimés entre deux conditions. Pour cela, les ADN doubles brins formés par hybridation des ADNc de la condition contrôle avec la condition expérimentale sont retirés ne laissant que les ADNc dont l'abondance diffère entre les conditions. Ces auteurs ont mis en évidence la régulation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (galectine), le métabolisme du fer (ferritine) ainsi que la biominéralisation (Ca-like et serpine) après 56 jours d'infection, temps permettant d'atteindre une guérison complète.

Dans le but d'identifier les mécanismes impliqués dans l'arrondissement des hémocytes par *V. tapetis*, Brulle et al., (2012) ont également réalisé une analyse basée sur la technique SSH mais cette fois-ci en exposant *in vitro* de l'hémolymphe de palourdes japonaise (dans laquelle se trouvent des hémocytes) à la souche *V. tapetis* CECT4600. Cette analyse réalisée à partir d'une expérience *in vitro* a mis en évidence la régulation de gènes impliqués dans le cytosquelette avec une sur-expression de gènes codant la bêta-actine et la bêta-thymosine ainsi que la sous régulation de gènes codant pour la CRP-A (cysteine glycine rich protein A), impliqués dans la régulation du cytosquelette.

Enfin, dans le but de valider les voies moléculaires impliqués dans l'infection par *V. tapetis* sur des animaux issus du milieu naturel, Allam et al., (2014) ont effectué une analyse des transcrits exprimés dans différents tissus de palourdes japonaises pouvant être infectées par *V. tapetis* en analysant des tissus cibles. Cette analyse s'est basée sur une technique d'*oligoarrays* ou puces à ADN. Le principe est d'hybrider les ADNc marqués par un fluorochrome, issus des ARNm de différentes conditions, sur une matrice puce à ADN contenant les sondes. L'intensité de fluorescence correspond au niveau d'hybridation pour une sonde donnée et permet de réaliser une approximation de l'expression du gène, qui est ensuite comparée entre les différentes conditions. Ils ont pu démontrer une réponse spécifique selon les compartiments de l'hôte. Ces auteurs ont mis en évidence la régulation chez les palourdes infectées de transcrits impliqués dans la reconnaissance du pathogène (lectines, C1q domain-containing proteins), dans la mort du pathogène (défensine), dans la régulation de l'apoptose (death-associated protein, bcl-2) et enfin dans la biominéralisation de la coquille (shell matrix proteins, perlucine, galaxine, chitine- and calcium-binding proteins).

Ces différentes études nous permettent de mieux comprendre les voies moléculaires impliqués dans la réponse de l'hôte d'une part mais également potentiellement régulée directement ou indirectement par le pathogène d'autre part. Un des objectifs de cette thèse est de mieux comprendre les régulations directes et indirectes du pathogène sur l'expression des gènes de la palourde japonaise afin de mieux caractériser les mécanismes d'infection.

## IV. Facteurs de pathogénicité de *V. tapetis* potentiellement impliqués dans la MAB

La compréhension des caractéristiques propres à l'hôte ou au pathogène ainsi que de la dynamique de l'infection est essentielle dans l'identification des facteurs de virulence connus ou probables dans le cadre de la MAB. C'est sur la base de ces informations qu'est construite la partie IV qui reprend les facteurs de virulence autour desquels se sont construits les chapitres de cette thèse.

### 4.1. Le système de sécrétion de type IV

Comme décrit dans la partie 2.8. *Méthodes de détection du pathogène*, Bidault et al. (2015b) ont mis en évidence la présence du gène *virB4* chez les souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes et uniquement chez celles-ci. Récemment, Dias et al. (2018) ont démontré la présence dans le génome de *V. tapetis* d'un îlot génomique correspondant au système de sécrétion de type IV (T4SS).

Le T4SS a précédemment été décrit chez *Agrobacterium tumefaciens*, pathogène de végétaux provoquant une maladie appelée « galle du collet ». Le T4SS est composé d'un groupe de 11 gènes *virB* ainsi que d'un gène *virD4* et contrôle le transfert, dans la cellule hôte, d'ADN<sub>T</sub> oncogénique provoquant, dans le cas de *A. tumefaciens*, des tumeurs chez les plantes infectées. De manière schématique, le système de sécrétion de type IV peut être représenté comme un pilus injectant dans la cellule hôte cet ADN exogène et oncogène.

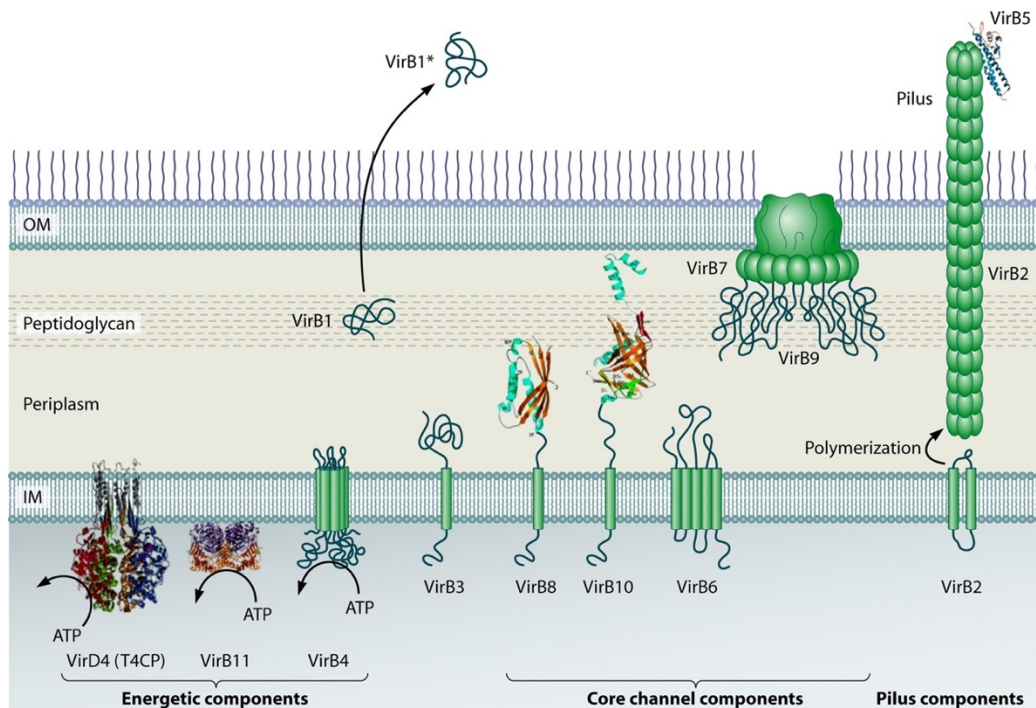


Figure 16 : Description du système de sécrétion de type IV chez *A. tumefaciens*, Alvarez-Martinez and Christie (2009)

La figure 16 schématise chacune des 11 protéines de ce système, ayant une fonction bien définie dans la construction de cette « seringue ». **VirB1** est une transglycolase lytique dégradant le peptidoglycane de la paroi au niveau du site d'assemblage du T4SS. **VirB2** et **VirB5** sont des composants du pilus. **VirB3** et **VirB7** sont des protéines associées au pilus. **VirB4** et **VirB11** sont des nucléoside triphosphatases qui permettent de fournir l'énergie nécessaire au transfert de l'ADN oncogénique. **VirB6**, **VirB7**, **VirB8**, **VirB9** et **VirB10** sont des composants du canal de transfert de cette ADN (Juhas et al., 2008).

Depuis la découverte du T4SS d'*A. tumefaciens*, plusieurs types de T4SS ont été décrit chez diverses bactéries pathogènes Gram-négatives. Les plus connus sont le système **VirB** d'*A. tumefaciens* (Stachel and Nester, 1986), mais également le système **Tra** d'*E. coli* (Zatyka and Thomas, 1998) impliqué dans la conjugaison bactérienne ou le système **Dot/Icm** de *Legionella pneumophila* entraînant la maladie du légionnaire et impliqué dans la survie intracellulaire du pathogène (Berger and Isberg, 1993). Les figures 17 et 18 décrivent respectivement l'organisation des gènes

codant pour le T4SS chez différents pathogènes et les mécanismes d'actions liés à cette diversité de T4SS au sein des différentes espèces chez lesquelles il a été décrit.



Figure 17 : Organisation des systèmes de sécrétion de type IV. Alignement de différents systèmes de sécrétion illustrant la conservation de l'organisation entre les systèmes conjugatifs ou le système de transfert de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*, (Foulongne et al., 2002).

L'organisation des gènes codant pour le T4SS chez les différents pathogènes est très diverse selon les espèces bactériennes comme le montre la figure 17. Cette diversité met en évidence des mécanismes de mobilisation du système très spécifiques en fonction des mécanismes d'infection mobilisés chez les différents pathogènes.

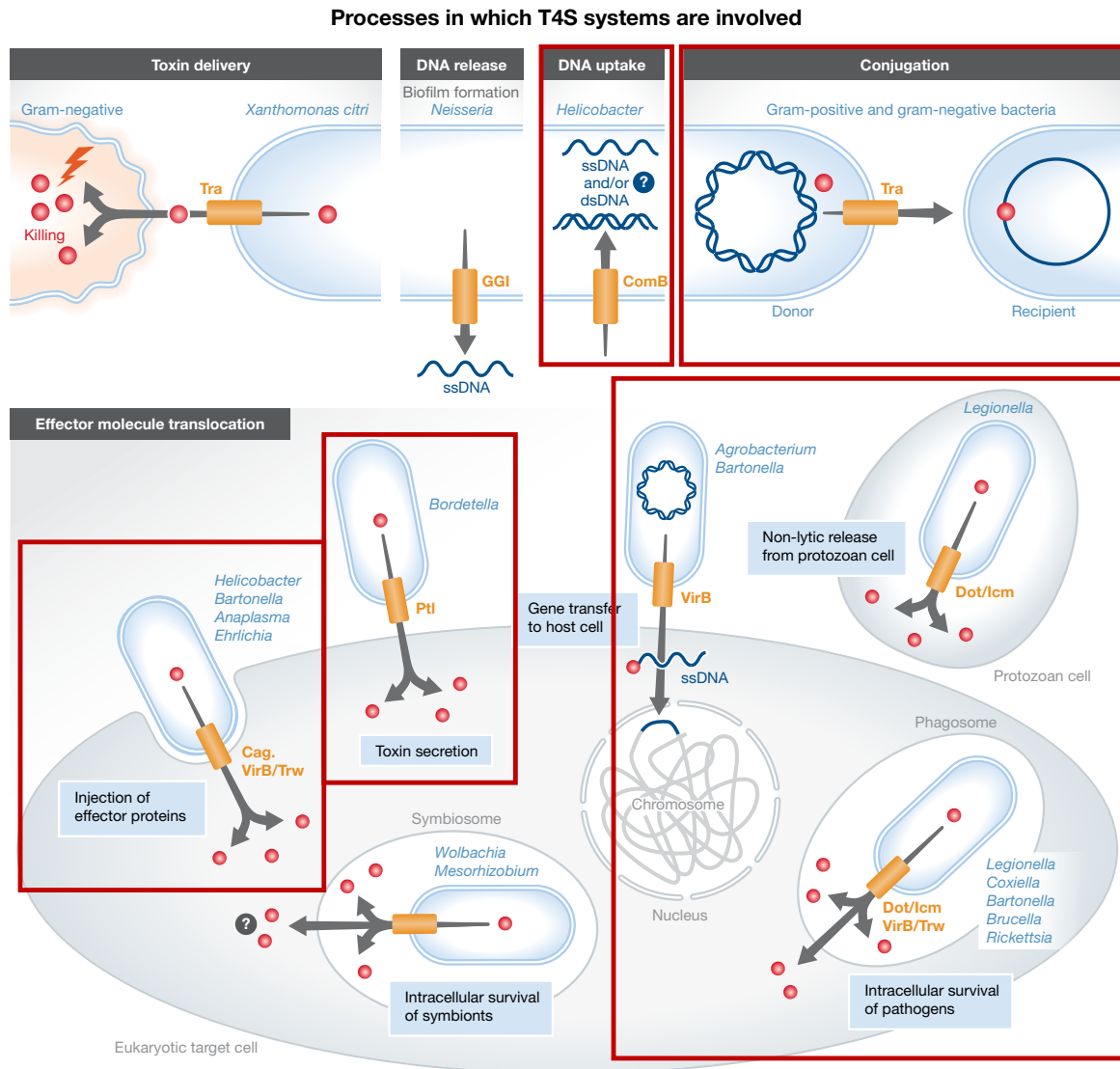


Figure 18 : Processus dans lesquels sont impliqués les différents T4SS (transport d'ADN durant la conjugaison et l'infection d'*A. tumefaciens*, transport d'effecteurs par de nombreuses bactéries pathogènes). Les cadres rouge représentent les systèmes de pathogènes dont l'organisation des gènes est décrit dans la figure 17 (modifié d'après Waksman 2019).

Les mécanismes mobilisés dans le cadre du T4SS vont de la conjugaison bactérienne (système Tra d'*E. coli*) à la sécrétion de toxines directement dans la cellule hôte eucaryote. La figure 18 décrit cette diversité de mécanismes. Les cadres rouges représentent les mécanismes concernant les bactéries dont l'organisation du cluster est décrite dans la figure 17. Chez les bactéries de l'espèce *Bordetella pertussis*, responsable de la coqueluche, l'organisation du cluster Ptl permet l'injection directe de toxine de la bactérie dans le phagosome de la cellule hôte. Chez les bactéries de l'espèce *Helicobacter pylori*, responsable d'ulcères gastrique, la mobilisation du système Cag entraînant la sécrétion de la toxine CagA nécessite une internalisation



de la bactérie dans le phagosome. Enfin, chez *L. pneumophila*, responsable de la légionellose, le T4SS est de type Dot/Icm (Defective for organelle trafficking /IntraCellular multiplication). Il permet la survie intracellulaire de la bactérie par inhibition de la fusion phagosome-lysosome. Pour éviter d'être tué par l'hôte, *L. pneumophila* transforme les phagosomes en un compartiment protecteur appelé " *Legionella containing vacuole* " (LCV). La formation de la LCV nécessite le système Dot/Icm. Les LCV sont conçus pour échapper à la fusion avec les lysosomes. Ils se déplacent le long de microtubules dans la cellule hôte, finissent par fusionner avec le réticulum endoplasmique (RE) et interagissent avec les mécanismes impliqués dans le trafic de vésicules endosomales et sécrétoires (Foulongne et al., 2002; Grohmann et al., 2018; Waksman, 2019).

Chez *V. tapetis*, Dias et al. (2018), ont comparé les génomes issus de différentes souches de *V. tapetis* isolées de plusieurs espèces de bivalves et de poissons. Cette étude se base sur le séquençage et la comparaison des génomes de ces différentes souches afin de mieux identifier les gènes potentiellement impliqués dans leur pouvoir pathogènes et principalement dans la MAB. Ils ont permis de définir 5 groupes à partir de la présence/absence et de la structure du cluster de gène codant pour le T4SS.

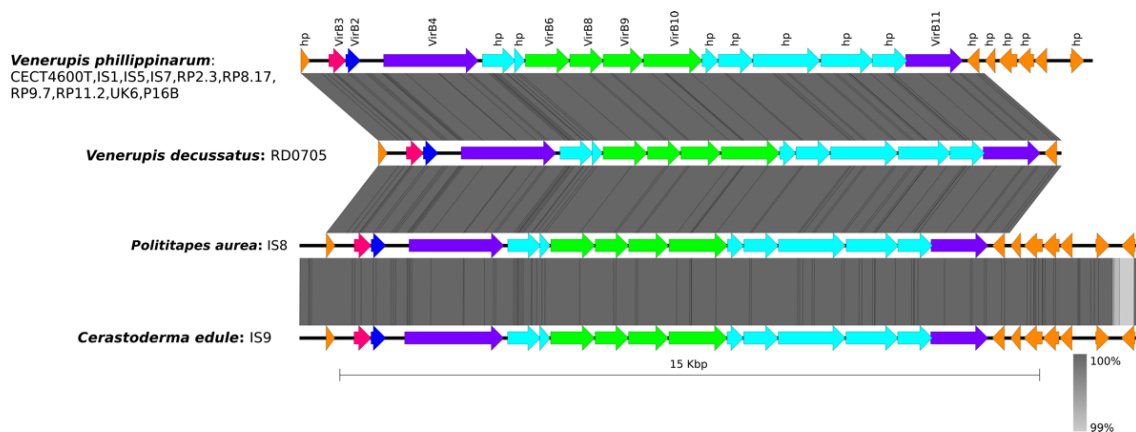


Figure 19 : Organisation du T4SS chez la plupart des souches de *V. tapetis* extraites de bivalves. Les flèches indiquent chaque CDS du cluster selon leur fonction. Flèches orange et cyan : protéines de fonction inconnue. Flèches violettes : VirB4 et VirB11. Flèches rose foncé : VirB2. Flèche verte : VirB6, VirB8, VirB9, VirB10. Traduit de l'anglais d'après Dias et al., (2018).

Les souches chez lesquelles ce cluster de gènes a été retrouvé possèdent un T4SS de type **VirB** (le même que chez *A. tumefaciens*) comme l'illustre la figure 19. La plupart des souches isolées de l'espèce *R. philippinarum* possèdent une organisation du T4SS très similaire. Les souches isolées d'autres espèces de bivalves (palourdes ou coques)

possèdent également un T4SS mais l'alignement des gènes montrent une organisation différente du cluster.

L'avancée principale réalisée par ces auteurs est la mise en évidence de la présence du T4SS **uniquement** chez les souches de *V. tapetis* capables d'induire la MAB chez la palourde japonaise. En effet, les souches isolées de bivalves après les années 2000 ainsi que les souches isolées de poissons ne possèdent pas ce cluster de gènes. Il est ainsi fortement probable que ce système de sécrétion joue un rôle clé dans le cadre du développement de la MAB. **Un des objectifs de cette thèse sera de confirmer ou d'infirmer le rôle de ce système dans le cadre de la MAB.**

#### 4.2. La protéine chaperonne DjIA

D'après Lakhal et al. (2008) la délétion du gène codant pour la protéine chaperonne DjIA, appartenant à la famille des DnaJ, entrainerait, chez *R. philippinarum*, une perte du phénotype « décollement des hémocytes » lorsque ceux-ci sont infectés par la souche *V. tapetis* CECT4600 dont le gène *djIA* a été supprimé (test *in vitro* détaillé dans la partie 3.4). Dans cet article, il a été démontré que le gène codant la protéine DjIA (282 acides aminés) se trouve dans un opéron et est soumis à l'expression d'un promoteur contrôlant également l'expression du gène *Duf<sub>924</sub>* (178 acides aminés), ces deux CDS étant séparées par un fragment de 123 pb.

Le mutant *V. tapetis*  $\Delta$ DjIA<sub>VT</sub> n'induit pas de perte d'adhérence sur les hémocytes de *R. philippinarum* *in vitro* et n'est pas capable de reproduire le phénotype MAB *in vivo*. L'absence de restauration du phénotype wild-type avec la complémentation *Duf<sub>924</sub>* seule indique que, dans l'opéron DjIA- *Duf<sub>924</sub>*, seule la protéine DjIA est impliquée dans le décollement des hémocytes de la palourde japonaise. La structure DjIA-*Duf<sub>924</sub>* étant peu conservée chez les *Vibrios* (présente uniquement chez *V. tapetis* et *V. splendidus*), il est possible qu'elle résulte d'une acquisition récente de gènes sans relation fonctionnelle apparente.

Dans cette étude, les auteurs ont ainsi prouvé l'efficacité de cette méthode de délétion de gènes dans l'étude de la virulence de *V. tapetis*. Il est néanmoins important de prendre en compte le phénotype de croissance associé à la construction dépourvue du gène *djIA*. En effet, bien que l'absence de virulence *in vitro* et *in vivo* soit prometteuse dans la compréhension des mécanismes d'infection, il est possible que ces observations soient dues à la croissance ralentie chez la souche dépourvue du gène *djIA*.

### 4.3. Les Protéines Extracellulaires ou ECP

D'après Allam and Ford (2006), *V. tapetis* secrète des protéines extracellulaires (ECPs) présentant un effet inhibiteur sur le système immunitaire de *R. philippinarum*. Ils ont testé, *in vitro*, l'activité biologique de ces ECPs provenant de *V. tapetis* mais également de *V. anguillarum* et *V. splendidus* sur les hémocytes de la palourde japonaise en ciblant les propriétés suivantes : la phagocytose, la granulosité et la viabilité des hémocytes. Ils ont observé dans un premier temps, une diminution de la phagocytose et de la granulosité chez les hémocytes exposés à *V. tapetis*. Dans un second temps, ils ont observé un effet des différentes fractions de cultures de *V. tapetis* sur la viabilité des hémocytes (Tableau 10).

Tableau 10: Effet des différentes fractions de *V. tapetis* sur la viabilité des hémocytes de *R. philippinarum*, d'après Allam and Ford 2006.

	Effet des différentes fractions de <i>V. tapetis</i> sur la viabilité des hémocytes de <i>R. philippinarum</i>
Cultures totales	Viabilité diminuée
Cellules lavées	Viabilité diminuée
ECP	Viabilité diminuée
Cultures avec choc thermique	Pas d'effet

En présence du surnageant d'une culture de *V. tapetis*, contenant ces ECPs, la phagocytose est inhibée contrairement à ce qui est observé avec *V. splendidus* et *V. anguillarum*. De plus, des mortalités d'hémocytes plus importantes sont observées lors de la mise en contact des hémocytes de *R. philippinarum* avec *V. tapetis* qu'avec *V. splendidus* ou *anguillarum*. Le résultat du choc thermique, auquel ont été soumises les différentes fractions de *V. tapetis*, a révélé que celles-ci présentent une activité biologique thermosensible sur la viabilité des hémocytes, cette viabilité diminuant lorsque la fraction testée est active. Cette étude démontre ainsi l'activité biologique inhibitrice des différentes fractions de *V. tapetis* et particulièrement des produits de sécrétion extracellulaires de la bactérie.

Madec et al. (2014) ont caractérisé ces produits extracellulaires comme étant des protéines solubles ou associées aux vésicules de la membrane externe. Ces auteurs ont réalisé une analyse du sécrétome de *V. tapetis*. Parmi les protéines identifiées, certaines pourraient vraisemblablement être impliquées dans le pouvoir pathogène de la bactérie dans le cadre de la MAB compte tenu de la dynamique connue de

---

l'infection et de la fonction ou l'influence de ces protéines sur la pathogénicité dans d'autres maladies.

Les chitinases par exemple sont des enzymes permettant la dégradation de la chitine, composant essentiel de l'enveloppe externe de certains animaux. Plusieurs types de chitinases ont été retrouvés dans les protéines extracellulaires sécrétées par *V. tapetis*. La dégradation de la chitine peut représenter une source de carbone pour les organismes pathogènes et faciliter leur pénétration dans les tissus de l'hôte. Aussi, le rôle des chitinases dans la virulence de plusieurs bactéries a déjà été démontré comme par exemple chez les pathogènes *Listeria monocytogenes* (Chaudhuri et al., 2013) ou *Legionella pneumophila* (DebRoy et al., 2006). De plus, la chitine étant un composé essentiel de la matrice organique de la coquille des bivalves, la présence de chitinases sécrétées chez *V. tapetis* pourrait avoir un rôle clé dans la colonisation de la lame périostracale chez les palourdes infectées (Madec et al., 2014).

En plus des chitinases, d'autres protéines sécrétées par le pathogène pourraient jouer un rôle clé dans le développement de la MAB. Les protéines candidates décrites ci-dessous figurent parmi les plus susceptibles d'être impliquées dans la MAB et sont celles retenues pour les expériences de mutagénèses développées durant cette thèse. Elles ont été retenues d'une part à cause de leur rôle connu dans d'autres infections. D'autre part les gènes codant ces protéines sont présents en copie unique dans le génome de *V. tapetis* CECT4600, permettant d'envisager des techniques de délétion de gènes pour confirmer leur rôle dans la MAB, contrairement par exemple aux gènes codant les chitinases présent en de nombreuses copies dans le génome de *V. tapetis* CECT4600.

### *OmpU ou Outer Membrane Protein U*

Le gène *ompU* code pour la protéine de la membrane externe du même nom et est connu pour être un facteur de virulence impliqué dans l'adhérence du pathogène *Vibrio cholerae*, responsable du choléra (Sperandio et al., 1995). Son expression est induite par l'activateur transcriptionnel ToxR. La présence/ régulation du gène *ompU* joue un rôle prépondérant dans l'expression de facteurs de virulence et la colonisation de l'épithélium intestinal par *V. cholerae* (Provenzano and Klose, 2000). La protéine OmpU est utilisée par la bactérie *Vibrio tasmaniensis* dans l'adhésion et la colonisation des cellules du système immunitaire lors de l'infection chez l'huître *Crassostrea gigas* (Duperthuy et al., 2011).

### *GbpA* ou *N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) binding protein*

La protéine GbpA se lie aux carbohydrates contenant de la N-acetylglucosamine comme par exemple la chitine. Elle est impliquée dans la colonisation du mucus intestinal et la dégradation de la chitine marine par *V. cholerae* (Wong et al., 2012). Cette protéine est sécrétée par le système de sécrétion de type II chez *V. cholerae* (Kirn et al., 2005). Cette protéine possède 4 domaines dont 3 sont essentiel à la colonisation de *V. cholerae* chez la souris (Wong et al., 2012).

#### 4.4. Les toxines associées à l'espèce *V. tapetis*

La synthèse de toxine par des bactéries peut être un élément clé de leur pouvoir pathogène vis à vis d'un hôte particulier ou d'un groupe d'hôtes. Les toxines bactériennes sont classiquement réparties en 2 catégories : les endotoxines et les exotoxines. L'appellation « endotoxines » est définie par le LPS (lipopolysaccharides) des bactéries Gram négatives. L'implication du LPS chez les *Vibrios* pathogènes a déjà été démontré chez différentes espèces comme par exemple *V. cholerae* ou *V. vulnificus* (Choquet, 2004; Linkous and Oliver, 1999; Reidl and Klose, 2002). Concernant les exotoxines, il en existe une grande diversité tant dans leur structure que leur mode d'action (Choquet, 2004; Cossart et al., 2004) et elles sont retrouvées chez des bactéries Gram positives comme négatives. Différentes études se sont axées sur les exotoxines produites par cette bactérie, pouvant être liée aux mécanismes impliqués dans la MAB.

Lors de la caractérisation de la souche de référence *V. tapetis* CECT4600, il a été mis en évidence que cette souche possède une activité de type hémolysine grâce à sa capacité à lyser des érythrocytes de chevaux (Borrego et al., 1996b). Choquet, (2004) ont identifié chez *V. tapetis* des gènes codant pour des hémolysines de type lécithinase. Seule une partie des souches de *V. tapetis* testées, pourtant toutes isolées de palourdes japonaises, présentaient une activité lécithinase. Néanmoins, chez ces souches négatives, l'activité lécithinase a pu être induite.

Enfin, lors de la réalisation du sécrétome de *V. tapetis*, la présence d'une protéine contenant la signature des toxines RTX a pu être mise en évidence (Madec et al., 2014). Les toxines RTX (repeats-in-toxin) sont des facteurs de virulence de type exotoxines formant des pores au niveau de la membrane (Choquet, 2004; Cossart et al., 2004). Les toxines RTX contiennent des répétitions de motifs riches en glycine et en aspartate se liant au ions  $Ca^{2+}$  (Linhartová et al., 2010; Madec et al., 2014). Ce sont

des facteurs de virulence connus chez d'autres bactéries comme *Vibrio cholerae* (Olivier et al., 2007) et *Vibrio vulnificus* (Ziolo et al., 2014).

#### 4.5. Les biofilms de *V. tapetis*

La formation de biofilms bactériens est impliquée dans les processus de colonisation et d'infection de nombreuses bactéries pathogènes (Costerton, 1999). Leur rôle dans le potentiel infectieux de différents agents pathogènes a déjà été démontré tels que les biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose (Costerton, 2001; Høiby et al., 2010) ou leur rôle dans le potentiel infectieux de *V. cholerae* (Tamayo et al., 2010) par exemple.

Rodrigues et al. (2015) ont étudié les biofilms formés par différentes souches de *V. tapetis* :



Figure 20 : Description des souches testées et de leur hôte associé, d'après Rodrigues et al. 2015

Les deux souches de référence LP2 (isolée de *S. melops*, souche de référence chez les isolats de poissons) et CECT4600 (isolée de *R. philippinarum*, souche de référence de la MAB) forment des biofilms très différents dont les principales caractéristiques sont reprises dans les figures 21 et 22.

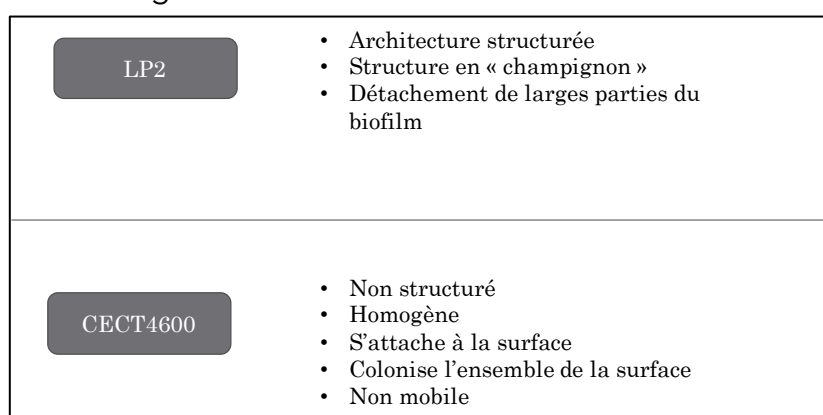


Figure 21 : Principales caractéristiques des biofilms formés par *V. tapetis* LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

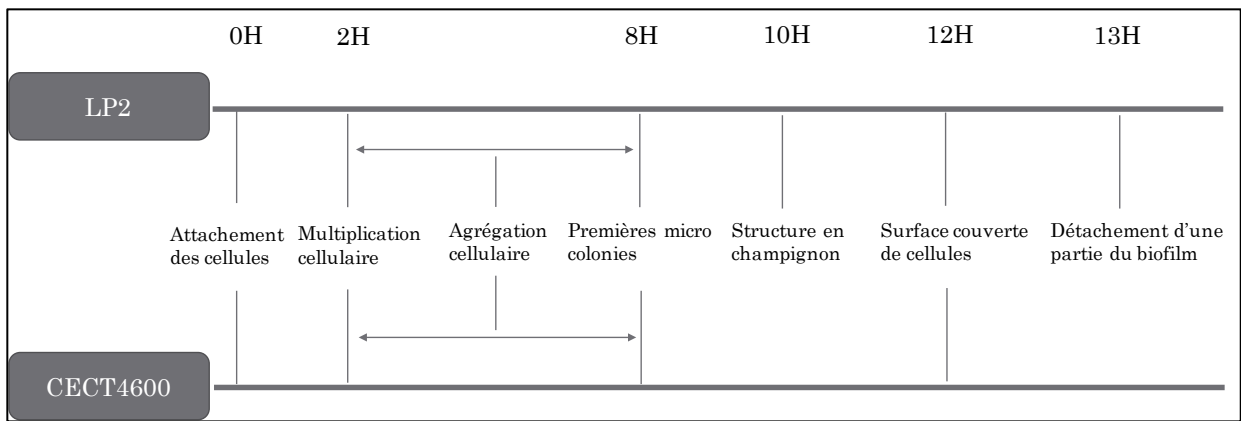


Figure 22 : Étapes de formations du biofilm chez les deux souches *V. tapetis* LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015

Le biofilm des souches de *V. tapetis* est principalement composé de polysaccharides et d'ADN extracellulaire. De plus, les étapes de formations du biofilm chez ces deux souches bactériennes diffèrent avec une structure différente d'une part et le détachement uniquement chez CECT4600 d'une partie du biofilm d'autre part.

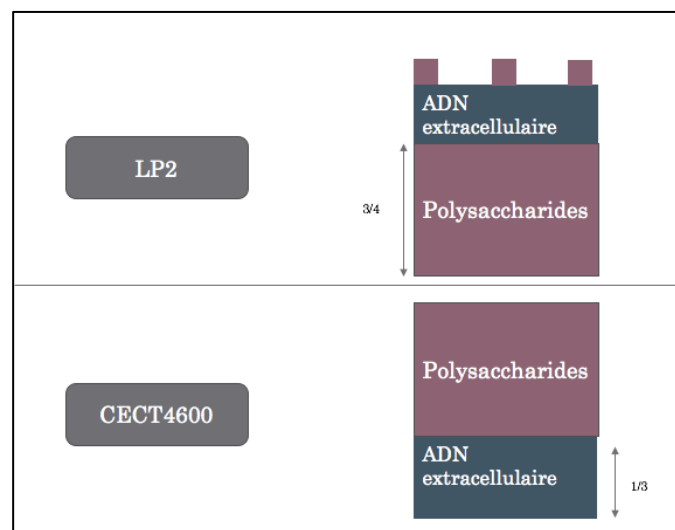


Figure 23 : Schéma de la composition des biofilms des souches *V. tapetis* LP2 et CECT4600, d'après Rodrigues et al. 2015

La principale différence entre les deux souches caractérisées est la répartition de ces « couches » du biofilm. Le biofilm de la souche CECT4600 est principalement composé de polysaccharides sur la face supérieure du biofilm lui donnant un aspect très homogène tandis que celui de LP2 est également composé d'ADN extracellulaire sur la partie extérieure du biofilm formant ainsi une structure hétérogène sur la surface d'attachement comme l'illustre la figure 23.

---

Le biofilm de CECT4600 présente à sa surface, en grande quantité, des structures sphériques de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre, d'aspects rugueux, liés physiquement à la bactérie et les unes aux autres. Ces composés contiennent des protéines et de l'ADN et présentent des alternances de zones claires et sombres sans qu'aucun compartiment interne ne soit visible. Les auteurs ont écarté l'hypothèse selon laquelle ces composés pourraient être des vésicules membranaires car celles-ci mesurent entre 50 et 250 nm de diamètre, taille bien inférieure à celle des composés sphériques observés. Si ces composés sont abondants à la surface du biofilm de la souche CECT4600, ils sont présents en faible nombre à la surface du biofilm de la souche LP2.

Après avoir observé l'ensemble des 5 souches testées dans cet article, les auteurs semblent avoir mis en évidence un pattern avec les souches CECT4600, IS1, GDE, GTRI, pathogènes de bivalves, présentant des composés sphériques abondants à la surface du biofilm et la souche LP2, pathogène de poissons, présentant des composés sphériques en faible quantité. Il semble donc vraisemblable que le biofilm formé par les souches pathogène de bivalve joue un rôle (certainement au cours de la colonisation) dans le pouvoir pathogène vis à vis de l'hôte.

Les auteurs ont également mis en évidence le rôle des conditions environnementales dans le développement du biofilm de la souche CECT4600. En effet, dans des conditions dites non favorables au développement de la MAB (température à 21°C et salinité à 4%), le biofilm formé par la souche CECT4600 présente toujours un grand nombre de composés sphériques, cependant la cinétique de formation du biofilm est différente de celle observée dans les conditions standards (température à 14° et salinité à 2%). Le biofilm croît plus rapidement mais n'atteint pas sa densité maximale par rapport aux conditions standards (Rodrigues, 2014).

#### **4.6. La virulence associée au pH**

Le pH est un facteur abiotique essentiel à la croissance des organismes vivants des microorganismes jusqu'à l'Homme. Il peut également être impliqué dans le développement de la flore microbienne commensale ou pathogène. De nombreuses études ont démontré le lien étroit existant entre le développement bactérien et le pH, par exemple dans la composition microbiologique du sol ou encore de la flore intestinale (Nicol et al., 2008 ; Ratzke and Gore, 2018 ; Sofi et al., 2014). Ratzke and Gore, (2018) ont déterminé que le changement du pH environnant peut entraîner des

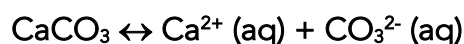


boucles de rétroaction chez les bactéries pouvant influencer le devenir des populations bactériennes en facilitant ou inhibant leur croissance. Ces auteurs mettent en avant le fait que la compréhension des mécanismes par lesquels les microbes réagissent et modifient leur environnement permettrait également de comprendre et prévoir leurs interactions.

Chez certains organismes, le pH joue le rôle « d'activateur » de gènes de virulence. Ce phénomène est particulièrement décrit chez des espèces de champignons et levures. Chez le champignon *Fusarium oxysporum*, pathogène de plante, la régulation de l'expression de gènes par le pH environnant est assurée par une cascade de signalisation dont le composant terminal est le facteur de transcription PacC/Rim101p, cette régulation incluant l'expression de gènes impliqués dans la virulence (Caracuel et al., 2003). La voie de transduction du signal Rim101 dépendante est la première voie du « pH sensing » décrit chez *Candida albicans* et est étroitement impliquée dans de nombreuses infections, notamment en permettant au pathogène de s'adapter aux conditions environnantes afin d'assurer sa croissance (Davis, 2009).

Chez *Colletotrichum gloeosporioides*, une espèce de champignon pathogène de plante, il a été mis en évidence que la capacité du pathogène à produire une pectate lyase (PL) joue un rôle prépondérant dans son pouvoir infectieux. Le champignon est capable de sécréter de l'ammoniac et d'augmenter le pH du milieu. L'accumulation d'ammoniac et le changement de pH qui en résulte augmentent en fonction du pH initial et du pouvoir tampon du milieu. La sécrétion de PL par *C. gloeosporioides* augmentait en conséquence lorsque le pH du milieu augmentait (Prusky et al., 2001).

Le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) est le principale constituant des coquilles de mollusques. Ce minéral se trouve sous trois formes dans l'eau de mer : l'aragonite, la calcite et le magnésian-calcite (riche en magnésium). L'équilibre de dissolution du carbonate de calcium se définit comme suit :



L'état de saturation de ce minéral dans l'eau de mer définit si la réaction est favorisée dans le sens de la formation de cristaux ou de leur dissolution. L'acidification a pour effet de diminuer le taux de saturation des cristaux de carbonate de calcium en diminuant les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  disponibles et favorise ainsi la dissolution de la coquille.

Dans le cadre de la MAB, la régulation du pH pourrait jouer un rôle important dans la modulation de la pathogénicité. En effet, la bactérie colonise et dégrade le périostracum de la palourde japonaise. L'une des conséquences de l'infection est alors l'inhibition de la biominéralisation de la coquille.

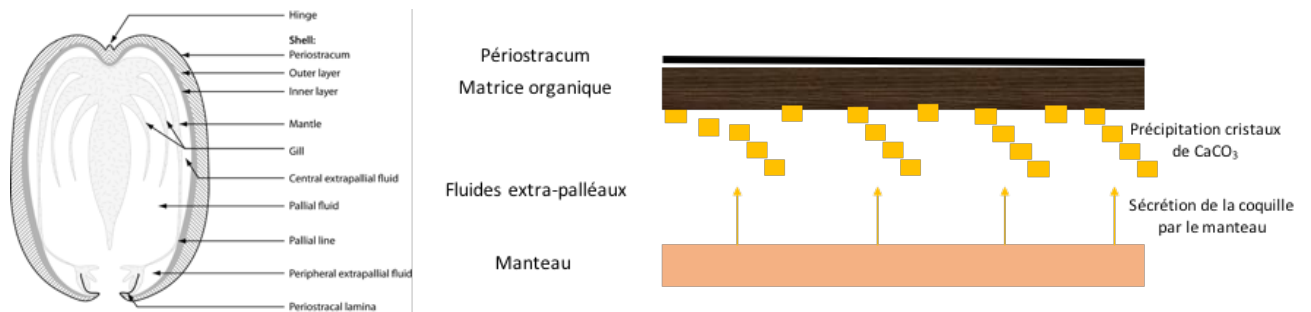


Figure 24 : Schéma de la formation de la coquille chez la palourde japonaise *R. philippinarum*

Chez la palourde japonaise, la réaction de biominéralisation de la coquille se déroule dans les fluides extra-palléaux. Le périostracum (partie externe de la coquille) est composé d'une matrice organique appelée conchyoline. Le manteau sécrète les composants de la coquille ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ) qui précipitent sur la matrice organique au niveau du périostracum et forme des cristaux aragoniques de carbonate de calcium (Figure 24).

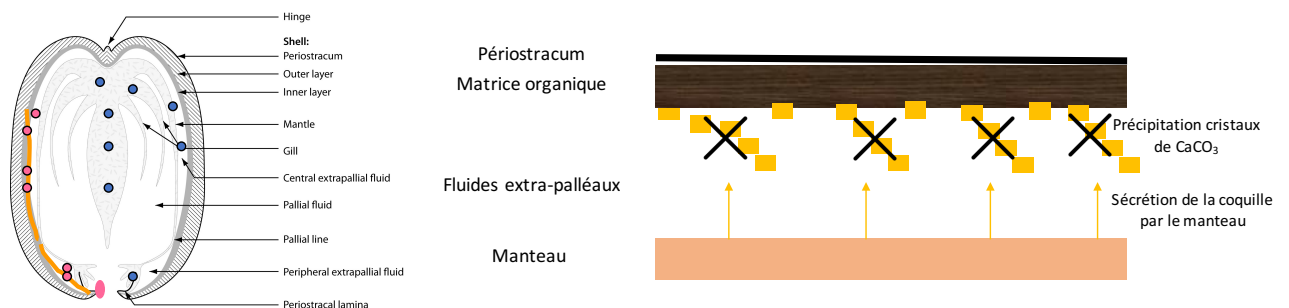


Figure 25 : Schéma hypothétique de l'infection par *Vibrio tapetis* et de l'intervention du pathogène dans la biominéralisation de la coquille. En rose : la bactérie infiltrant les fluides extra-palléaux périphériques et centraux. En bleu, le pathogène infiltrant les tissus en cas de lésions tissulaires.

Lors de l'infection par *Vibrio tapetis*, le pathogène colonise donc le périostracum et le dégrade de manière à infiltrer les fluides extra-palléaux périphériques voire centraux. De ce fait, il va inhiber la réaction de biominéralisation de la coquille, empêchant probablement la précipitation des cristaux de carbonate de calcium d'aragonite et ainsi conduisant à l'accumulation de ce dépôt brun organique qu'est la conchyoline (Figure 25). La matrice protéique (organique) est composée essentiellement, dans des conditions normales, d'aspartate, responsable de liaison avec les ions calcium : la chélation par des groupes d'esters sulfates sur les chaînes

polysaccharidiques amorcerait la biominéralisation. Lorsque la MAB se développe, les palourdes atteintes présentent des taux anormaux en acide glutamique, acide aspartique, sérine, glycine et alanine pouvant entraîner une configuration stéréochimique anormale entraînant une mauvaise liaison Calcium – Carbonate (Ph Gouletquer et al., 1989).

**L'un des objectifs de cette thèse sera de comprendre les relations entre le pH et l'infection dans le cadre de la MAB au regard de ces informations et des mécanismes de virulence connus.**

## Objectifs de travail

---

L'objectif de cette thèse est d'identifier les facteurs de pathogénicité de la bactérie *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et de mortalités récentes chez les poissons marins.

Ce travail a été effectué au LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'environnement marin), UMR 6539, et a été encadré par Vianney Pichereau, Christine Paillard (tous deux directeurs de thèse) et par François Delavat (encadrant scientifique).

Il a été construit au travers de 2 axes de recherches visant à répondre à cette problématique générale de thèse.

Le premier axe vise à étudier la virulence de *V. tapetis* en répondant aux 2 problématiques suivantes : Chapitre 1 - **Quels sont les gènes impliqués dans la virulence de *V. tapetis* ?** et Chapitre 2 - **Existe-t-il des marqueurs hôtes-spécifiques de la virulence de *V. tapetis* ?**

Le second axe de recherche concerne l'interaction hôte pathogène et répond aux 2 problématiques suivantes : Chapitre 3 - **Quels sont les gènes exprimés lors de l'infection chez l'hôte ?** et Chapitre 4 - **Quelles sont les modulations au sein de l'animal associées au pH et à la température lors de l'infection ?**

L'ensemble de ces travaux a pour ambition de mieux identifier les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans la maladie de l'anneau brun et de manière plus large dans la virulence de l'espèce *V. tapetis*.



# Matériels et Méthodes

Dans cette partie sont détaillés l'ensemble des milieux de cultures, souches bactériennes et tests standardisés de base utilisés dans les recherches menées durant cette thèse. C'est à partir de ce référentiel commun à l'ensemble des chapitres que nous avons réalisé nos expériences par modifications des milieux de cultures, constructions de nouvelles souches et modifications de protocoles à partir de ce matériel biologique de base.

## 1. Milieux de culture

Le tableau n°11 décrit la composition des milieux de culture sources. LB : Luria Bertani broth, LBS : Luria Bertani broth with Salt, TSA : Tryptic Soy Agar.

Tableau 11 : Milieux de cultures de base utilisés durant cette thèse

NOM DU MILIEU	CONTENU DU MILIEUX DE CULTURE
LB	Eau distillée (1L) + Extrait de levure (5g)+ Tryptone (10g) + NaCl (5g)+ Agar (15g)
LBS	Eau distillée (1L) + Extrait de levure (5g)+ Tryptone (10g) + NaCl (20g)+ Agar (15g)
Zobell	Eau distillée (1L) + Extrait de levure (1g)+ Peptone (4g) + Phosphate ferrique (0,1g) + Sels marins (30g) + Agar (15g)
TSA	Eau distillée (1L) + TSA powder (40g)
TSA + 1,6% NaCl (TSA2)	Eau distillée (1L) + TSA powder (40g) + NaCl (16g)

## 2. Souches de *Vibrio tapetis* utilisées

Le tableau n°12 recense les souches de *V. tapetis* utilisées dans les différentes études menées au cours de ces recherches de thèse.

# MATERIELS ET METHODES

Tableau 12 : Liste des souches de *V. tapetis* utilisées durant cette thèse

<b>V. tapetis isolées</b>	<b>Espèce</b>	<b>Subsp.</b>	<b>Année</b>	<b>Lieu</b>	<b>Hôte</b>	<b>Référence</b>
<b>CECT4600</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	C Paillard and Maes 1995; Borrego et al. 1996
<b>IS1 (VP1)</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1988	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Paillard and Maes, 1990; Maes and Paillard 1992b; Borrego et al. 1996
<b>IS5</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>IS7</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>IS8</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Venerupis aurea</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>IS9</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990	France, Quiberon	<i>Cerastoderma edule</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>RP 2.3.</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>RP 8.17</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>RP 9.7</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>RP 11.2</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1990-1991	France, Landeda	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Borrego et al., 1996; Maes, 1992
<b>P16B</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1995	France, Golfe du Morbihan	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Allam, Paillard, and Ford 2002
<b>GDE</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2003	France, Glénan	<i>Dosinia exoleta</i>	C. Paillard 2004a; Dias et al. 2018
<b>GTR I</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	2008	France, Glénan	<i>Polititapes rhomboides</i>	Dias et al. 2018
<b>UK6</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1996	Grande Bretagne, Poole Harbour	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Allam, Paillard, and Auffret 2000
<b>HH6087 (CECT 8161)</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>britannicus</i>	2002	Grande Bretagne, Glasgow	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Reid et al. 2003
<b>LP2</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>tapetis</i>	1999	Norvège, Bergen	<i>Symphodus melops</i>	Jensen et al. 2003
<b>2AU</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BB</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BW</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BT</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BA</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2AC</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BC</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BCT</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2AE</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BG</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BU</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>2BM</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2017	Belgique (Norh sea)	<i>Limanda limanda</i>	Vercauteren et al. 2018
<b>V. tap Tong</b>	<i>V. tapetis</i>	<i>inconnue</i>	2015	Belgique (Experimental environment)	<i>Solea solea</i>	Declercq et al. 2015

### 3. Test de virulence des souches de *V. tapetis in vitro* vis à vis de la palourde japonaise

Ce test, développé et standardisé par (Choquet et al., 2003), a été appliqué aux différents chapitres de cette thèse afin de tester la virulence des souches de *V. tapetis* aux regards des recherches menées. Un schéma récapitulatif de ce test est disponible figure 26.

#### A) Animaux

Les animaux utilisés lors des expériences décrites dans cette thèse sont des palourdes japonaises de l'espèce *Ruditapes philippinarum* fournies par la société conchyicole SATMAR et provenant des sites de Landeda (Nord Finistère) ou Marennes Oléron (Charente-Maritime). Les palourdes ont été acclimatées dans de l'eau de mer oxygénée à l'aide d'un bulleur et à une température de 14°C.

#### B) Prélèvement d'hémolymphe

L'hémolymphe des palourdes japonaises utilisées pour ces expériences est prélevée directement dans le muscle adducteur via le ligament situé à l'extérieur de la coquille sans avoir à ouvrir les animaux. Chaque hémolymphe est prélevée individuellement et la qualité des hémocytes présents dans ce fluide est vérifiée par observation au microscope (présence de pseudopodes, peu d'hémocytes de forme arrondie, pas de microorganismes). Les hémolymphe de bonne qualité sont poolées et les hémocytes de ce pool sont comptés sur cellule de Malassez pour déterminer la concentration d'hémocytes.

#### C) Suspension bactérienne

Les suspensions bactériennes, nous permettant de tester la virulence des différentes souches concernées, sont obtenues à partir de colonies resuspendues dans de l'EMSF (eau de mer stérile filtrée). Les densités cellulaires de ces suspensions sont ajustées pour que l'exposition finale lors du test soit de 25 bactéries / hémocyte. Les concentrations sont déterminées après mesure au spectrophotomètre de la densité optique (DO) à une longueur d'onde  $\lambda$  de 492nm selon la formule :

$$\text{UFC/ml} = 1,3 \times 10^9 \text{ DO} - 3,6 \times 10^7.$$



### D) Préparation des échantillons

Les expériences sont toujours réalisées au minimum en triplicatas pour chaque condition testée. Dans une ou plusieurs plaques 24 puits, selon le nombre de souches à tester, sont déposés 100 µl d'hémolymphe. Après quelques minutes, 100µl de suspension bactérienne de la souche à tester sont déposés dans les puits correspondant pour les conditions expérimentales et 100 µl d'EMSF pour les contrôles.

### E) Déroulement du test

La ou les plaques contenant de l'hémolymphe + EMSF (contrôles) ou de l'hémolymphe + suspension bactérienne (exposés) sont incubées pendant 3 heures à 18°C en étuve. Le contenu des puits est alors immédiatement fixé à l'aide de 200 µl de formol 3% final (volume à volume) et conservés à +4°C jusqu'à analyse.

### F) Analyse au cymomètre en flux

Le contenu de chaque puit est transféré individuellement dans un tube de cytométrie et est marqué par ajout de 4 µL de SYBR Green 10<sup>-1</sup>, intercalant de l'ADN. Après 30 minutes de marquage à l'abri de la lumière, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux. Le SYBR Green permet de marquer l'ADN des cellules qui deviennent alors fluorescentes. Connaissant les caractéristiques de taille et de granulosité des hémocytes, cette analyse permet de quantifier la fluorescence correspondant aux hémocytes et ainsi de connaître le nombre d'hémocytes se trouvant dans le surnageant de chaque puit exposé ou non à la bactérie.

### G) Détermination des ratios d'hémocytes non adhérents

Après recueil du nombre total d'hémocytes en suspension présents dans chaque puit, déterminé par l'analyse au cytomètre en flux, nous effectuons une moyenne d'hémocytes présents dans les puits contrôles. Nous calculons ensuite le ratio moyen d'hémocytes pour chaque condition testée et chaque réplica :

$$Ratio = \frac{\text{nombre d'hémocytes présents dans les puits expérimentaux}}{\text{nombre moyen d'hémocytes présents dans la condition contrôle}}$$

Nous effectuons ensuite une moyenne de ratio des réplicas pour chaque condition. Ce ratio est basé sur le fait que chez les palourdes non atteintes, les hémocytes sont capables, via leurs pseudopodes, d'adhérer au fond des puits de la plaque 24 puits. En revanche, lorsque les palourdes sont atteintes, les hémocytes perdent leurs

pseudopodes et donc leur capacité d'adhérence et ne peuvent plus adhérer au fond de la plaque. Ainsi, lorsque la souche testée est **non-virulente**, le nombre d'hémocytes présents dans le surnageant des puits correspondants n'est pas significativement différent de celui des puits contrôles et le **ratio est proche de 1**. En revanche, lorsque la souche testée est **virulente** et induit une perte d'adhérence, le nombre d'hémocytes surnageant présents dans les puits correspondants est significativement supérieur à celui des puits contrôles, induisant ainsi un **ratio supérieur à 1**. Les représentations graphiques classiquement utilisées pour présenter les résultats de ce test sont basées directement sur ces ratios moyens.

#### H) Tests statistiques

Afin de déterminer si la différence du nombre d'hémocytes entre les échantillons expérimentaux et contrôles est significative, nous nous basons sur le nombre d'hémocytes présent dans chaque puit. Sur ces données nous réalisons un test de Student lorsque les données suivent une loi normale ou un test de Mann-Withney-Wilcoxon lorsque les données ne suivent pas une loi normale.

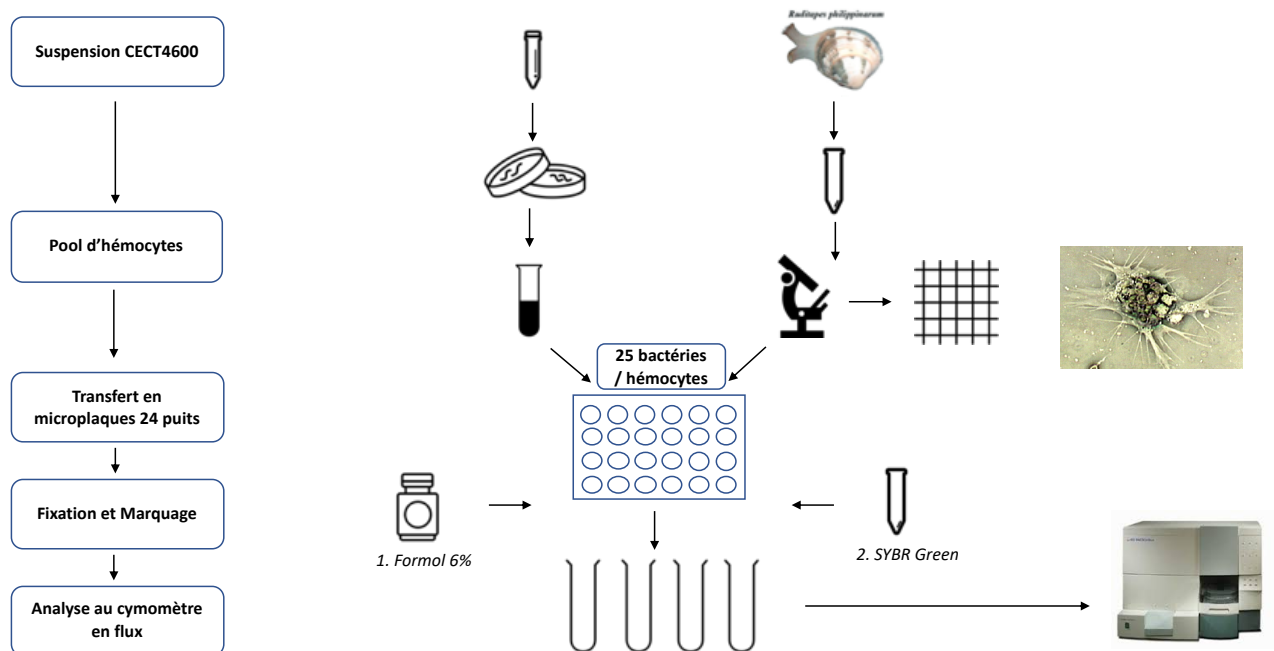


Figure 26 : Schéma récapitulatif du test d'adhésion *in vitro*



# AXE DE RECHERCHE I

## Étude de la virulence de *Vibrio tapetis*

---

Chapitre 1 : Quels sont les gènes impliqués dans la virulence de *V. tapetis* ?

Chapitre 2 : Existe-t-il des marqueurs hôtes-spécifiques de la virulence de *V. tapetis* ?



# CHAPITRE 1

---

Quels sont les gènes impliqués dans la virulence de *V. tapetis* ?

## Introduction :

Dans ce premier chapitre, nous avons choisi de cibler des gènes candidats, potentiellement responsables du pouvoir pathogène dans la cadre de la MAB. Le choix de ces gènes repose sur les informations apportées par de précédentes études basées à la fois sur des approches transcriptomiques, protéomiques et sur les recherches déjà menées au regard de la grande diversité de souches de *V. tapetis* existantes. Notre objectif est de comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie de l'anneau brun au travers d'une approche de mutagenèse ciblée, permettant de supprimer des gènes chez le pathogène et de déterminer leur rôle précis dans la dynamique de l'infection.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons choisi de cibler le gène *virB4* codant pour un ATPase du système de sécrétion de type IV (T4SS), décrit pour la première fois chez *Agrobacterium tumefaciens*, pathogène de végétaux provoquant une maladie appelée « galle du collet » (Stachel and Nester, 1986). Le T4SS a également été décrit comme étant impliqué dans la virulence de nombreux pathogènes comme les bactéries *Helicobacter pylori* responsable d'ulcères gastriques ou *Legionella pneumophila* responsable de la maladie du légionnaire, affection pulmonaire pouvant entraîner la mort (Grohmann et al., 2018). La présence du cluster de gènes codant pour le T4SS uniquement chez les souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes (Dias et al., 2018) indique que ce système de sécrétion pourrait être impliqué dans les mécanismes associés à la MAB.

Compte tenu de la mise en évidence de l'importance très probable du T4SS dans la virulence de *V. tapetis*, nous avons choisi de commencer par la délétion du gène *virB4* chez la souche *V. tapetis* CECT4600 (souche de référence de l'espèce *V. tapetis* *subsp. tapetis*).

## Identification de gènes de virulence chez *V. tapetis* dans le cadre de la MAB par une approche de mutagénèse ciblée

### Résumé de l'article

*Vibrio tapetis* est une bactérie Gram négatif qui provoque des infections sur les mollusques bivalves et les poissons. La maladie de l'anneau brun (MAB) est une infection causée par *V. tapetis* qui affecte la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Des études récentes ont montré que le groupe de gènes du système de sécrétion de type IV (T4SS) se trouve exclusivement dans des souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes japonaises. Toutefois, on ne sait toujours pas si le T4SS est effectivement impliqué pendant le processus d'infection. Le but de cette étude était de créer et de caractériser une souche mutante de *V. tapetis* ne possédant pas le T4SS, obtenue par délétion complète du gène *virB4*, afin de déterminer le rôle du T4SS dans le développement de la MAB. Cette étude a démontré que le T4SS n'est pas responsable de la perte des capacités d'adhésion des hémocytes, ni de la diminution de l'activité lysosomale durant la MAB. Néanmoins, nous avons observé une diminution de 50% de la prévalence de la MAB et une diminution de la dynamique de mortalités avec le mutant *virB4*. Ces travaux démontrent que le T4SS de *V. tapetis* joue un rôle crucial dans le développement de la MAB chez la palourde japonaise.



Article under review pour « Applied and Environmental Microbiology » depuis le 26.07.2019

**Implication of the type IV secretion system in the pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease affecting the Manila clam *Ruditapes philippinarum***

Alexandra Rahmani<sup>1#</sup>, François Delavat<sup>1</sup>, Christophe Lambert<sup>1</sup>, Nelly Le Goic<sup>1</sup>, Eric Dabas<sup>1</sup>, Christine Paillard<sup>1#†</sup>, Vianney Pichereau<sup>1#†</sup>.

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

# Corresponding authors, [vianney.pichereau@univ-brest.fr](mailto:vianney.pichereau@univ-brest.fr) ; [alexandra.rahmani@univ-brest.fr](mailto:alexandra.rahmani@univ-brest.fr) ; [christine.paillard@univ-brest.fr](mailto:christine.paillard@univ-brest.fr)

† These authors contributed equally

**Implication of the type IV secretion system in the pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease affecting the Manila clam *Ruditapes philippinarum***

Alexandra Rahmani<sup>1#</sup>, François Delavat<sup>1</sup>, Christophe Lambert<sup>1</sup>, Nelly Le Goic<sup>1</sup>, Eric Dabas<sup>1</sup>, Christine Paillard<sup>1#†</sup>, Vianney Pichereau<sup>1#†</sup>.

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

# Corresponding authors, [vianney.pichereau@univ-brest.fr](mailto:vianney.pichereau@univ-brest.fr) ; [alexandra.rahmani@univ-brest.fr](mailto:alexandra.rahmani@univ-brest.fr) ; [christine.paillard@univ-brest.fr](mailto:christine.paillard@univ-brest.fr)

† These authors contributed equally

## **ABSTRACT**

*Vibrio tapetis* is a Gram-negative bacterium that causes infections on mollusk bivalves and fish. The Brown Ring Disease (BRD) is an infection caused by *V. tapetis* that affects the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Recent studies have shown that the type IV secretion system (T4SS) gene cluster is exclusively found in strains of *V. tapetis* pathogenic to clams. However, whether the T4SS is effectively implicated during the infection process remains unknown. The aim of this study was to create and characterize a *V. tapetis* T4SS null mutant, obtained by complete deletion of the *virB4* gene, in order to determine the role of T4SS in the development of BRD. This study demonstrated that the T4SS is neither responsible for the loss of hemocytes adhesion

capacities, nor for the decrease of the lysosomal activity during BRD. Nevertheless, we observed a 50% decrease of the BRD prevalence and a decrease of mortality dynamics with the  $\Delta virB4$  mutant. This work demonstrates that the T4SS of *V. tapetis* plays a crucial role in the development of BRD in the Manila clam.

## IMPORTANCE

T4SSs are known to be involved in the infection activity of many pathogens. *Vibrio tapetis* is a marine pathogen affecting a wide range of hosts and particularly the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Recent genomic comparisons highlighted that only *V. tapetis* strains pathogenic to clams carry the T4SS cluster. However, the lack of genetic tools to genetically modify those strains hampered the demonstration that their T4SS is implicated for infection of clams. In this study, a technical bottleneck has been alleviated, by the development an efficient technique to delete the *virB4* gene, an essential ATPase of the T4SS. This genetic approach unveiled the role of this system for *V. tapetis*, by the demonstration that its T4SS does not affect hemocytes but is important for the development of the Brown Ring Disease in the Manila clams.

**Keywords:** Brown Ring Disease, *V. tapetis*, *R. philippinarum*, Hemocytes, T4SS, rounding phenotype, colonization, mutagenesis

## Abbreviations

BRD: Brown Ring Disease

CFU: Colony Forming Unit

EPFs: Extrapallial Fluids

FSSW: Filter Sterilized Sea Water

PCR: Polymerase Chain Reaction

T4SS: Type IV Secretion System

WT: Wild Type

## INTRODUCTION

Mass mortalities have occurred on the last decades impacting bivalves in hatcheries as well as in natural beds. Many *Vibrio* species are involved in these plagues and are known to be important pathogens in aquaculture (1). *Vibrio tapetis* (2) is the etiological agent responsible for the Brown Ring Disease (BRD) (3, 4) affecting the manila clam *Ruditapes philippinarum* (5). BRD is characterized by a brown organic deposit, in the inner face of the shell, between the pallial line and the edge of the shell, which can often be observed in Manila clams during the winter and spring periods but is present all year long (6, 7), mostly on the European Northern coast. BRD is a cold water disease considering the fact that *V. tapetis* is virulent only at low temperatures, with an optimum infection temperature of 14°C (3, 8).

The effects of BRD infection on *R. philippinarum* have been well documented. The pathogen enters the pallial cavity of clams and then colonizes and degrades their periostracum to penetrate into extrapallial fluids (EPFs) where they can spread (3, 8). Hemocytes, which are the clam's immune system cells, are recruited to the site of infection within the extrapallial fluids to eliminate the pathogen (9). During a typical infection, hemocytes phagocytize foreign bacteria and mobilize the lysosome to eliminate them (10). These immune cells are characterized by pseudopods, which are actin-rich membranes expansions, that make them able to catch and internalize bacteria. During the development of BRD, *V. tapetis* cells are phagocytized by

hemocytes, but once internalized, they will inhibit several cellular functions such as actin polymerization or phagosome-lysosome fusion, thereby avoiding degradation (8, 10–12). Moreover, Reactive Oxygen Species (ROS) production is reduced in infected hemocytes (13). These bacteria-mediated inhibitions of critical cellular functions lead to the multiplication of *V. tapetis* within the hemocytes, which are ultimately lysed when bacteria reach high densities, allowing *V. tapetis* cells to spread in EPFs.

However, while knowledge is improving regarding the behavior of clams and clam hemocytes upon infection by *V. tapetis*, very little is known about the precise mechanisms linked to the virulence of the pathogen. A characterization of the *V. tapetis*' secretome upon exposure to Manila clam hemocytes allowed the identification of several proteins potentially involved in pathogenicity (14). *V. tapetis* is also able to produce several virulence factors potentially involved in its pathogenic capacity such as hemolysins, cytotoxins and exotoxins (15). It has also been recently demonstrated that the structures of the biofilms formed by different *V. tapetis* strains vary, depending on whether they are clam- or fish- pathogens (16).

The genomes of various strains of *V. tapetis* have recently been sequenced and compared. Interestingly, this analysis showed that the Type IV Secretion System (T4SS) cluster is exclusively found in strains of *V. tapetis* reproducing BRD in clams and mainly isolated from infected clams, and not in the ones isolated from fish (17). Furthermore, a diagnosis method has recently been developed to quantify *V. tapetis* in EPFs relying

on the presence of the *virB4* gene (18). The T4SS is a delivery system, which can transfer proteins, but also DNA, directly into recipient cells (which can be either prokaryotes or eukaryotes). T4SSs were first described in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* (19) and are well known to be involved in pathogenicity in multiple infections such as Brucellosis (*Brucella spp.*) or Legionnaires' disease (*Legionella pneumophila*) (20). One of the characteristics of T4SSs is the presence of a conserved ATPase, called VirB4 in *A. tumefaciens*. VirB4 is one of the two ATPase of this T4SS, being essential for both T4SS structure and activity (21, 22).

Based on the presence of the T4SS cluster only in *V. tapetis* strains infecting clams and based on the demonstrated role of T4SS in the pathogenicity of many bacteria, this secretion system is therefore a likely candidate to be tested to understand the pathogenicity mechanisms set up by *V. tapetis* during infection of the Manila clam. The best way to test such a hypothesis is to delete the corresponding genes. However, despite laborious efforts, only one deletion mutant ( $\Delta djIA$ ) of *V. tapetis* strains infecting clams has been generated so far (23) and has shown its role on hemocyte cytotoxicity. This  $\Delta djIA$  mutant was not able to induce mortality or BRD development in clams, but this result may be a consequence of the growth defect phenotype of the mutant (23).

In this study, we aimed at clarifying the role of the T4SS in the development of the BRD, by deleting the *virB4* gene of *V. tapetis* CECT4600. A targeted mutagenesis approach has been developed, which led to the deletion of the *virB4* gene. We could

demonstrate that the T4SS, while not being essential to induce vibriosis, plays a crucial role in BRD development in the Manila clam. This approach and the generation of deletion mutants will help to better understand the genes, and therefore the mechanisms, set up by the pathogen during the development of BRD.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains, plasmids and culture conditions:

Bacterial strains used in this study are described in Table 1. Plasmids and primers used in this study are listed in Table 2 and 3, respectively. *E. coli* strains were routinely grown at 37°C in LB medium. *V. tapetis* CECT4600 and  $\Delta virB4$  were grown in LB containing 20 g/l (final concentration) of NaCl (LBS) or in Zobell medium (24) at 18°C  $\pm$  2°C. When necessary, the following components were added: Kanamycine (Km, 100  $\mu$ g/ml), Chloramphenicol (Cm, 5  $\mu$ g/ml for *E. coli* (Cm<sup>5</sup>); 1 (Cm<sup>1</sup>) or 5  $\mu$ g/ml (Cm<sup>5</sup>) for *V. tapetis*), Trimethoprim (Trim, 10  $\mu$ g/ml), Diaminopimelic acid (DAP, 0.3 mM), D-glucose (D-glc 1%), L-arabinose (L-ara 0.2 %) or agar (15 g/l). Growth parameters of strains CECT4600 and  $\Delta virB4$  have been determined by using a microplate reader (BioscreenC) in both LBS and Zobell media at 18°C with agitation, in 100-well microplates, after 24 h of growth.

### Construction of a $\Delta virB4$ deletion mutant



The *virB4* gene has been deleted by double homologous recombination using a pLP12-derived suicide plasmid (26), but with specific culture and mating conditions. Briefly, two fragments of 820 and 799 bp located upstream (UP) and downstream (DOWN) of the *virB4* gene of *V. tapetis* CECT4600, respectively, were PCR-amplified using 170607-170608 and 170609-170712, respectively. The two DNA fragments were fused by Splicing by Overlap Extension (SOEing) PCR using 170607 and 170612, giving a single 1.6 kbp fragment UP-DOWN (UD-fragment) that was inserted into the pGEM-T plasmid (Promega) by ligation with T4 ligase (Promega) according to the manufacturer recommendations. The UD-fragment sequence has been checked by sequencing at the Eurofins Genomics platform. The UD-fragment has been retrieved from pGEM-T using *EcoRI* and *NheI* (Promega) and ligated in the pLP12 plasmid digested with the same enzymes. The ligation mixture was transformed by heat shock into competent cells of *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir, and a clone containing the pLP12 plasmid in which the UD-fragment had been inserted (renamed pFD055) has been stored at -80°C. The purified pFD055 plasmid has then been transferred to *E. coli* GEB883 by heat shock transformation (strain 88). *E. coli* GEB883 has also been transformed with the pEVS104 plasmid in order to obtain the helper strain (strain 102, Table 1) used in this study.

The pFD055 plasmid was transferred to *V. tapetis* CECT4600 by a triparental mating procedure. Briefly, strains 88, 102 and 2 (Table 1) were mixed at a 1:1:5 ratio. Each strain was harvested one by one, centrifuged (7168 x g, 3 min) and the supernatant

was removed in order to avoid exposure to antibiotics for the next strain added. The cell pellet was subsequently resuspended in 20 µl of LBS+D-Glc+DAP and spotted on a cellulose filter deposited on a LBS+D-Glc+DAP plate. This plate has been incubated at 25°C for 48 h. The spot was then resuspended with 1 ml LBS, and 100 µl were plated on both LBS+D-Glc+Cm<sup>5</sup> and LBS+D-Glc+Cm<sup>1</sup>. The remaining suspension was centrifuged (7168 x g, 3 min), resuspended in 200 µl of LBS, splitted in two 100 µl fractions which were plated on the same culture media. All plates were incubated at 20°C for 5 days.

The obtained colonies were re-streaked on LBS+D-Glc+Cm<sup>1</sup> and the site of chromosomal insertion of pFD055 was determined by PCR, using 170611-170902 (for a recombination between UP fragments) and 170901-170612 (for a recombination between DOWN fragments).

After confirmation of plasmid integration, clones that had integrated pFD055 were cultivated overnight in LBS. The culture was serially diluted, and 100 µl were plated on LBS+L-ara to induce expression of the Vmi480 toxin (26) and then excision of pFD055 by a second recombination, followed by an incubation at 20°C. The obtained colonies were then tested for deletion of the *virB4* gene by using 170611-170612 (expected size 1759 bp in the mutant, 4285 bp in the wild type (WT)) and 170513-170514 (no PCR product in the mutant, 173 bp in the WT). A *V. tapetis* mutant strain deleted for the *virB4* gene has been stored at -80°C (strain 177).

Complementation of the  $\Delta virB4$  deletion mutant

The full coding sequence of the *virB4* gene of *V. tapetis* CECT4600 was PCR-amplified using 180915-180916, cloned into the pGEM-T vector and verified by sequencing. The obtained construction, as well as the pFD086 plasmid, were then both digested using *EcoRI* and *NheI*, the accurate DNA fragments were purified from electrophoresis gel (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel) and ligated. The replacement of the *gfp* gene in pFD086 by *virB4* was checked by using primers 180401-170514 (expected size 2848 bp). The obtained pAR003 plasmid was then transformed into *V. tapetis*  $\Delta virB4$  (strain 177) by triparental mating as described earlier, by mixing the strains 234, 102, and 177 (Table 1) at 18°C, 24 h. The mating mixture was plated on LBS+Trim and the presence of pAR003 in *V. tapetis*  $\Delta virB4$  was confirmed by using 180401-170514 (expected size 2848 pb) to obtain the strain 268.

In vitro virulence assays on Manila clams

The *in vitro* virulence assay has been performed, following a standardized protocol developed in order to test the ability of *V. tapetis* strains to induce a rounding on hemocytes of the Manila clam (11). . Briefly, Manila clams from the SATMAR shellfish aquaculture site in Marennes (Charente-Maritime, France) were acclimatized in oxygenated seawater at 14°C. Hemolymph was harvested directly from the adductor muscle of each individual, and the quality of hemocytes was checked by microscopical observation (presence of pseudopods, number of rounded hemocytes). Good quality

hemolymph samples were pooled and the hemocytes enumerated by using a Malassez cell. Hemolymph was exposed to a bacterial suspension of *V. tapetis* CECT4600 or its derivatives (Table 1) in at least 3 replicates and two independent experiments. 100 µl of hemolymph were added in 24-well plates, followed by 100 µl of bacterial suspension (in Filter-Sterilized Seawater (FSSW)), to obtain a 25/1 : bacteria/hemocyte ratio);. For the controls, the bacterial suspension was replaced by 100 µl of FSSW. The flow cytometry analysis was coupled with the lysotracker assay described below, and results were expressed as the ratio of non-adherent hemocytes in exposed vs control samples.

LysoTracker assays on Manila clams hemocytes:

The LysoTracker probes (Molecular Probes) are fluorescent acidotropic probes for labeling and tracking acidic organelles in live cells, according to the manufacturer definition. We used this method to characterize the amounts of acidic organelles in hemocytes exposed to the different strains of *V. tapetis*, or FSSW for control. This LysoTracker assay, performed during the *in vitro* virulence test, has recently been developed in order to correlate the rounding phenotype to the cell content in acidic organelles by performing both tests (*i.e.* virulence test and LysoTracker assay) on the same samples (12).

The virulence test was performed as described above. After 1 hour of incubation at 18°C, 4 µl of 50 µM LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen, emission from 550 to 700

nm, final concentration 1  $\mu$ M) was added to each well. After 2 more hours of incubation at 18°C, the contents of the wells were then transferred in 5-mL cytometry polystyrene Falcon tubes (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Flow cytometry analyses were performed by using a BD FACSVerser flow cytometer using its blue laser (488 nm) as an excitation source. The mean red fluorescence level (LysoTracker fluorescence linked to acidic organelles) of the selected hemocytes was measured using the PerCP-Cy5.5 detector of the flow cytometer (700/54 nm).

Subsequently, 2  $\mu$ l of a 100X dilution in ultra-pure water of a commercial solution of SYBR-Green I nucleic acid gel stain 10 000X in DMSO (Molecular probes by Life Technology, USA) have been added in each tube for 10 min at room temperature, in dark conditions, before measurement of the green fluorescence. Addition of SYBR-Green allow the selection of hemocytes by FITC detector of the flow cytometer (527/32 nm) and then the quantification of the number of non-adherent hemocytes in our sample.

This second flow cytometry analysis allowed to measure both the green and red fluorescences, and were performed by using excitation wavelengths of 488 nm and 640 nm, respectively. Results are expressed in mean red fluorescence level per hemocyte (arbitrary units, AU) measured with the APC detector of the flow cytometer (660/10 nm) instead of the PerCP-Cy5.5 detector (700/54 nm) to overcome a possible SYBR-Green fluorescence overlapping.

To determine whether the differences between the ratio of non-adherent hemocytes and the amount of acidic organelles in exposed and controls samples are statistically significant, a Wilcoxon test has been performed.

*In vivo virulence assays on Manila clams:*

For the *in vivo* experiments, two modes of infection were used: (i) inoculation of a fixed number of bacteria into the pallial cavity, which results in BRD symptoms after a few weeks (31) and (ii) injection of *V. tapetis* strains into the adductor muscle, which induces clam mortality in a few weeks (32).

- (i) The day before injection, clams were removed from water to allow them to open enough for injection the next day. 150 clams were injected with 100 µl of a suspension ( $5 \times 10^7$  CFU/animal) of strains *V. tapetis* CECT 4600 or  $\Delta virB4$ , or with 100 µl FSSW as the control. All injected clams were left for 6 h out of water to promote the colonization of the periostracal lamina by *V. tapetis*. Animals were then placed into tanks (50 animals per replicate, in triplicate) equipped with a bubbler, at 14°C. Animals were not fed during the experiment and water was changed once after 2 weeks post injection (p.i.). The replicates have been injected in 3 independent days. After 4 weeks p.i., animals were sacrificed and shells were kept and analyzed according to the method developed by Paillard and Maes (33) to determine the BRD prevalence in each condition. To

determine whether the BRD prevalence was statistically significant between these conditions, a Chi-2 test with 2 degree of freedom was performed.

- (ii) 30 animals (ten clams per replicate) were injected in the adductor muscle with either a bacterial suspension ( $5 \times 10^7$  CFU/animal) of strains *V. tapetis* CECT4600, *V. tapetis*  $\Delta virB4$  or *V. tapetis*  $\Delta virB4$  +pAR003, respectively for the experimental conditions, or with 100  $\mu$ l FSSW as a control. Animals were then placed into tanks equipped with a bubbler, at 14°C. Dead animals were enumerated and collected all along the experiment, thus enabling to determine the mortality rates. Data represented survival rates for each condition. Statistical analyses have been done using Kaplan-Meier survival analysis and a Wilcoxon test.

## RESULTS

### Deletion of the *virB4* gene in *V. tapetis* CECT4600 and physiological characterization of the $\Delta virB4$ mutant:

In order to determine the role of the T4SS in the virulence of *V. tapetis* CECT4600, the T4SS-conserved gene *virB4* has been chosen as a target for gene deletion. *V. tapetis* death occurs at around 30°C and its optimal growth temperature is 18°C, which is low as compared to the one of *E. coli*. Based on the recent observation that

the growth of *Vibrio* strains under supra-optimal conditions increases the chance of transferring foreign DNA into marine bacteria (28), matings between *V. tapetis* CECT4600 and *E. coli* carrying the suicide plasmid pFD055 were performed at 25°C. After selection of chloramphenicol-resistant clones, one colony was obtained, that had integrated the pFD055 plasmid into its genome. This clone was tested by PCR which showed an integration of pFD055 by recombination within the “DOWN” region. After excision of the pFD055 plasmid by induction of the Vmi480 toxin with L-arabinose, some of the obtained colonies were tested by colony-PCR to determine the genotype of the clones, regarding the presence of *virB4*. Finally, clones in which the *virB4* gene was deleted in *V. tapetis* CECT4600 have been obtained, and one clone has been stored at -80°C for subsequent analyses.

In order to characterize the effect of the *virB4* deletion on *V. tapetis* CECT4600, the doubling time of both strains has been compared, under both LBS and Zobell culture conditions in microplate. The growth rates of both strains in LBS were around 2 times slower than in Zobell, even though the final cell densities were higher when cells were grown in LBS (Table 4). Statistical analyses of doubling time and Lag phase have been performed by Wilcoxon tests. The doubling time of the *virB4* mutant as compared to the wild type, was higher in LBS ( $p=0.016$ ) but not in Zobell ( $p=0.06$ ) and the Lag phase was longer in LBS medium as compared to growth in the Zobell medium ( $p = 0.0002$ ) for both strains. Therefore, although the absence of the *virB4* gene leads to a



slight increase in the doubling time of *V. tapetis* in LBS, this deletion does not significantly modify the growth of the mutant in Zobell medium.

**The T4SS does not induce loss of adhesion properties on hemocytes**

In order to characterize the importance of the T4SS in the virulence of *V. tapetis* CECT4600 toward *R. philippinarum* hemocytes, an *in vitro* adherence test of clam hemocytes has been performed, comparing the wild-type- and the  $\Delta virB4$ - strains both in LBS (data not shown) and in Zobell media (Fig. 2). Our results showed that the ratio of non-adherent hemocytes in exposed versus control samples was increased by 5.6 fold when hemocytes were exposed to *V. tapetis* CECT4600, as compared to hemocytes exposed to FSSW (Fig. 2). This confirmed earlier works, that showed that *V. tapetis* CECT4600 induces a loss of hemocytes adhesion properties, by causing rounding of the cells and de-structuration of the actin cytoskeleton (12, 34). Interestingly, inactivation of the T4SS did not lead to a decrease in this ratio (Fig.2) neither in Zobell or LBS. These results strongly suggest that the T4SS of *V. tapetis* is not implicated in the pathogen-induced loss of hemocytes adhesion properties.

**The T4SS is not implicated in the inhibition of the lysosomal activity in *V. tapetis* infected hemocytes**

To test whether the T4SS is implicated in the inhibition of the phagosome-lysosome fusion, we have characterized the amounts of acidic organelles in hemocytes exposed

to *V. tapetis* or the *virB4* mutant in comparison with exposure to FSSW, by using the LysoTracker Red DND-99 in flow cytometry. Our results showed that, during *in vitro* exposure of hemocytes to *V. tapetis* CECT4600 or *V. tapetis*  $\Delta virB4$ , a clear decrease of at least 2-fold in the amount of acidic organelles was observed as compared to control hemocytes (Fig 3). The amount of acidic organelles was slightly higher with the *virB4* mutant, as compared to CECT4600 ( $p=0.004$ ), but this amount was still lower than the control ( $p=0.003$ ). This decrease probably reflects a decrease in the lysosomal activity of hemocytes induced by *V. tapetis*. The deletion of the *virB4* gene only marginally influences this decrease of lysosomal activity.

#### **The T4SS of *V. tapetis* is involved in BRD development in the Manila clam**

Our *in vitro* assays revealed that the T4SS does not seem to be implicated in the cytotoxic effect and in the phagosome-lysosome inhibition of *V. tapetis* within hemocytes. To test whether the T4SS is important for BRD development in the Manila clam, injections of *V. tapetis* CECT4600 or *V. tapetis*  $\Delta virB4$  into the pallial cavity of clams have been performed. BRD prevalence has been determined after 4 weeks post-injection (Fig. 4). The prevalence of BRD in control clams was very low (2%), confirming that clams were not infected before this experiment. After four weeks of infection, the prevalence of BRD observed in clams infected by *V. tapetis* CECT4600 was close to 60%, which is the expected prevalence already reported in several

studies (8, 34–36). Interestingly, clams injected with a suspension of the  $\Delta virB4$  mutant displayed a prevalence of BRD close to 30%, thus decreasing two-fold the prevalence of BRD in Manila clams. Consequently, our results show that the T4SS is implicated, but not essential, for BRD development.

**The T4SS of *V. tapetis* is involved in the mortality dynamics observed after injection of *V. tapetis* in the adductor muscle**

The T4SS is implicated in BRD formation, but it remained unknown whether this system is also important for the direct mortality of Manila clams. To answer this question, mortalities have been monitored for 4 weeks after injection in the adductor muscle of Manila clams with *V. tapetis* strains. In this experiment, we expected mortality because the injection was performed in tissues (*i.e.* adductor muscle) and this protocol allows mortality within weeks as it has already been demonstrated (32, 37). Mortality rates observed in this experiment are presented in the Fig. 5. By using the Kaplan-Meier survival analysis, we showed that the mortality rates significantly differed among conditions ( $p = 0.002$ ). Expectedly, the highest mortalities were observed when clams were injected with *V. tapetis* CECT4600. By contrast, *V. tapetis*  $\Delta virB4$  displayed a lower virulence, as the mortality dynamics significantly differed from the ones of strains CECT4600 ( $p = 0.013$ ). Specifically, the proportion of dead animals at the end of the experiment decreased from 43% to 23% following exposure

to CECT4600 and  $\Delta virB4$ , respectively. In order to confirm that this phenotype was effectively due to the  $\Delta virB4$  deletion, we performed genetic complementation on *V. tapetis*  $\Delta virB4$  by transferring in this mutant a plasmid carrying the *virB4* gene. As expected, the functional complementation of *virB4* in the  $\Delta virB4$  mutant partially restored the virulence of this strain (Fig. 5), with 30% of clam mortality after 5 weeks of infection, and a mortality dynamics that did not significantly differed from that observed for *V. tapetis* CECT4600 ( $p = 0.52$ ). Thus, the functional complementation of *V. tapetis*  $\Delta virB4$  reproduced the mortality dynamics observed after injection in the adductor muscle of the *V. tapetis* CECT4600. This demonstrated that the attenuated virulence phenotype of *V. tapetis*  $\Delta virB4$  is effectively due to the deletion of the *virB4* gene, thus demonstrating a major role for the T4SS in the virulence of *V. tapetis*.

## DISCUSSION

Brown Ring Disease (BRD) affects the Manila clam *R. philippinarum* and is due to an infection by *V. tapetis*, a bacterium that acts as an external microparasite to induce this disease (8). *V. tapetis* colonizes and degrades the periostracal lamina, in order to enter the extrapallial fluids (EPFs). During this process, a brown organic deposit is produced that results from the inhibition of shell biomineralization. This inhibition leads to accumulation of the organic part of the shell, the conchyoline that forms a brown ring inside the shell, giving its name to BRD (3). Invasion of *V. tapetis* in EPFs

also leads to several perturbations in the immune response capacities of the Manila clam, exemplified by a phenotype of rounded hemocytes. Indeed, it has been demonstrated that *V. tapetis* induces a loss of adhesion properties of infected hemocytes and a standardized test have been developed in order to show and measure this phenotype *in vitro* (11). Studies also demonstrated that *V. tapetis* is able to modify processes such as phagocytosis, ROS production and resistance capacities of the hemocyte cells during infection (15, 34, 38). These modifications of hemocytes physiology are accompanied by actin cytoskeleton re-organization, as it has been shown by analyses of deregulated genes in clams during infection or physiological assay (12, 34, 39, 40).

Nevertheless, almost nothing is known about the molecular mechanisms set up by the pathogen in order to induce the phenotypes described above. Interestingly, a recent genomes comparison of *V. tapetis* strains highlighted the probable involvement of T4SS in BRD (17). In this study, the authors compared the genomes of seventeen strains of *V. tapetis* isolated from either bivalves or fish. They highlighted that strains of *V. tapetis* pathogenic to clams are the only ones that carry a cluster of 11 genes encoding a VirB/D4 T4SS. It is then likely that T4SS is involved in this specific ability of clam's pathogenic strains to induce BRD in the Manila clam. T4SSs are found in nearly half of the bacterial genomes (41) and are implicated in the conjugation of DNA and/or the secretion of effectors into prokaryotic and/or eukaryotic cells. Its molecular structure is also very different depending on the infection strategy implemented by

the species that carries this cluster, and on the bacterial species itself. The T4SS genes organizations of *V. tapetis* CECT4600 is very close to the VirB/D4 system of *A. tumefaciens* (17).

Given that T4SSs are present in many pathogenic strains, and that a T4SS is present only in *V. tapetis* strains pathogens to clams (17, 18), we decided to inactivate this system in *V. tapetis* CECT4600. To achieve this goal, we focused our effort on the deletion of the *virB4* gene of *V. tapetis* CECT4600. The VirB4 protein is one of the two ATPase of this T4SS and is involved in pilus biogenesis, as it gives the energy required for this process. The other ATPase, VirB11, functions with VirB4 to induce a structural change in the pilin and was thus suggested to modulate the VirB4 dislocase activity (22).

Unfortunately, no efficient technic of gene deletion was available for *V. tapetis*, with only one study that was able to perform a gene deletion on *V. tapetis*. Indeed, Lakhali et al. (23) already succeeded more than 10 years ago to delete the *djlA* gene (849 bp), encoding a membrane-anchored DnaJ-Like protein that is involved in the rounding phenotype observed and measured by *in vitro* assay. *V. tapetis*  $\Delta$ *djlA* was not able to induce BRD in infected clams. However, the fact that this strain exhibits a significantly reduced growth rates makes its role in the virulence of *V. tapetis* *in vivo* undetermined (23). In this study, we succeeded to delete the *virB4* gene, using a derivative of the pLP12 suicide plasmid (26). To achieve it, we developed a mutagenesis protocol specifically designed for *V. tapetis*, by identifying the optimal

mating temperature allowing recombination of the suicide plasmid into the *V. tapetis* genome. Specifically, performing the matings at 25°C was key to obtain cointegrates. This temperature is sublethal for *V. tapetis* CECT4600, as this strain can survive but is not able to grow at this temperature. This stressful condition is supposed to alter the restriction/modification systems (42), making these stressed cells more prone to accept foreign DNA. An electroporation protocol has recently been developed to introduce foreign DNA in various marine bacteria, and successful transformation was only obtained if cells were grown at supraoptimal temperature (28).

*V. tapetis* is able to grow and develop into clam hemocytes after phagocytosis (4, 33). This ability to grow into hemocytes may be due to the activity of the T4SS, as demonstrated with various pathogens. Indeed, *Legionella pneumophila*, that induces the legionnaire disease in humans, carries a specialized dot/Icm T4SS. This T4SS induces the formation of a *Legionella* containing vacuole (LCV) and escape fusion with lysosome (44). *L. pneumophila* T4SS structure is close to *H. pylori* Cag T4SS (45), and this system allows the translocation of more than 300 effectors in eukaryotic cells, affecting pathways controlling membrane transport process (44, 46). The LCV is able to merge with endoplasmic reticulum and to move along microtubules to deregulate factors for host signaling. Nevertheless, in this study we demonstrated that the amount of acidic organelles, which is a proxy of lysosomal activity, decreases after challenge of hemocytes by *V. tapetis* in the WT strain but also in the *virB4* mutant (Fig. 3). Thus, although there is a probable link between intracellular survival and decrease

of lysosomal activity, this process is not dependent on the T4SS in the case of *V. tapetis* (Fig. 3).

The diversion of the actin cytoskeleton has already been shown in clam hemocytes following exposure to *V. tapetis* (12, 34). Such a phenomenon has also been reported in other pathogenic species, forming a vacuole and encoding a T4SS. For example, *Helicobacter pylori*, that carries a *cag* pathogenicity island, and causes gastric ulcers and gastric adenocarcinoma in humans, secretes a protein, CagA, associated with the surface-exposed portion of pilus (47). This effector is associated with the protein HtrA to open cell-to-cell junctions and to bind to the basolateral host receptor integrin. These proteins disorganize the apical junctions in stomach cells by a disorganization of the actin cytoskeleton (44, 48). *Bartonella henselae* carries a VirB/D4 type of T4SS which is involved in a reorganization of the cytoskeleton that leads to uptake of bacteria into endothelial cells (44). Finally, *Coxiella burnetii*, that causes Q-fever in humans, forms a *Coxiella*-containing-vacuole (CCV), using a Dot/Icm-like T4SS similar to the *L. pneumophila*'s one. It modifies host endocytic transport systems and replicates into CCV, interacting with autophagosome (49). Unlike *V. tapetis*, *C. burnetii* grows into a CCV that has acquired lysosomal characteristics such as acidic pH, acid hydrolases and cationic peptides (50). Interestingly, *in vitro* incubation of *R. philippinarum* hemocytes with *V. tapetis* heated cultures had revealed that the severe changes that affect hemocytes during exposure to *V. tapetis* (*i.e.* changes in structure and decrease in hemocyte phagocytic activity and viability) are related to a



thermosensitive molecule (15). Thus, *V. tapetis* seems to possess thermosensitive cytotoxic factor(s) mediated by intact bacterial cells, which are also present as extracellular secretions (15) and might be secreted through the T4SS. Protease production is widespread amongst members of the *Vibrionaceae* and could be involved in *V. tapetis* toxicity. In the dynamics of BRD, disorganization of hemocytes adhesion capacities is followed by an absence of phagolysosome fusion, thus allowing *V. tapetis* to grow into the infected hemocytes in a vacuole formed after phagocytosis (34). Nevertheless, we demonstrated in this study that T4SS is not implicated in the cytotoxic effect of *V. tapetis* toward hemocytes, as *in vitro* assays showed that a *virB4* null mutant is still inducing a loss of adhesion properties on hemocytes (Fig. 2).

Finally, we could demonstrate that the deletion of the *virB4* gene in *V. tapetis* CECT4600, and therefore inactivation of its T4SS, significantly reduced BRD prevalence by 50% when compared to the WT strain (Fig. 4). Furthermore, mortality rates of clams after injection of the adductor muscle significantly decreased in *V. tapetis*  $\Delta virB4$ , as compared to the WT strain (Fig. 5). Thus, the T4SS has a direct implication in the virulence and BRD formation by *V. tapetis*. Interestingly, previous studies focusing on *V. tapetis* LP2, a strain that does not carry the T4SS cluster, might help us to understand the role of T4SS in the development of BRD. The LP2 strain is not able to induce BRD in the classical way of infection (*i.e.* injection into the pallial cavity or balneation) (17, 18, 37). However, if this strain is injected directly into the extrapallial cavity of Manila clams, it can induce BRD at rates of 75%, as compared to

strain CECT4600 injected into extrapallial cavity that had induced 100% of BRD is this particular study (51).

Considering the knowledge about other bacterial species encoding T4SS, it is likely that *V. tapetis* is able to secrete effector proteins during the infection's dynamics of the BRD. Nevertheless, because a *virB4* mutant is not able to reduce loss of adhesion properties in infected hemocytes, and because prevalence of BRD is reduced in the absence of the *VirB4* gene, we make the hypothesis that *V. tapetis* T4SS would rather be involved in the colonization of the host, thus suggesting that T4SS-pilus-mediated colonization is a key factor for the specificity of this pathogen toward the Manila clam. The BRD owns its name from the brown organic deposit observed during infection by *V. tapetis*. This reaction of the Manila clams to infection occurs in two steps: conchiolin deposit and shell process repair to enrobe bacteria (52). It has also been shown that *V. tapetis* is able to disrupt the host biomineralization process to facilitate colonization (53). Indeed, *V. tapetis* colonizes the periostracal lamina and the epithelia of mantle fold (34). The mantle edge cells are involved in pathogen recognition and "nacrezation" defense mechanism with the secretion of melanized matrices (3, 40, 54). Thus, we could also formulate the hypothesis that the T4SS interacts with the shell biomineralization process by injecting effectors into the cytosol of mantle edge cells. Considering our study, the  $\Delta virB4$  strain is able to colonize (at least partially) the periostracal blade and epithelium of the mantle edge, but it might induce a weaker

immune response because this strain might be less recognized by the mantle cell receptors and therefore induces less brown deposit.

Future analyses could focus on colonization of the periostracal lamina by light and electronic microscopy but also on phenoloxydase production in mantle and extrapallial fluids, in order to study these hypotheses (8, 51).

## CONCLUSION

In this study, we showed that the T4SS plays an important role in the dynamics of BRD but is not essential for BRD development. Considering our results and the knowledge on other pathogens carrying T4SSs, we make the hypothesis that this system might be involved in colonization steps or pathogen's induction of the immune response in the development of BRD. Both of these hypotheses might be consistent with the reduced prevalence of BRD observed *in vivo*.

This study is the first gene deletion approach on *V. tapetis* that unveil an important molecular mechanism involved in the pathogenic activity of this bacterium in the BRD. Furthermore, it is the first study that confirms the involvement of T4SS in the development of BRD.

## FUNDINGS

This project received grants from the H2020 European project “VIVALDI” (grant agreement N°678589). This work was also supported by the University of Western Brittany (UBO), the “investment for the future” programs LabexMER (ANR-10-LABX-19) and ISblue (ANR-17-EURE-0015).

## ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Jean-François Auvray (SATMAR, Marennes, Charentes-Maritimes) for providing the clams, and Adeline Bidault and Morgan Perennou for helping with clam dissections.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CP and VP acquired funds and coordinated the study. AR performed the experimental mutagenesis with the knowledge and help of FD. AR performed *in vitro* tests with the help of NLG and CL for the flow cytometry analyses. AR performed *in vivo* infections technical design with the help of ED, NLG and CP. AR, FD, VP and CP wrote the article (the original draft was written by AR). The article was carefully reviewed by other co-authors, who all approved the final version.

## REFERENCES

1. Travers M-A, Boettcher Miller K, Roque A, Friedman CS. 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* 131:11–31.
2. Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Evol Microbiol* 46:480–484.
3. Paillard C, Maes P, Oubella R. 1994. Brown ring disease in clams. *Annu Rev Fish Dis* 4:219–240.
4. Paillard C, Maes P. 1990. Aetiology of brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. *Comptes Rendus Académie Sci Ser 3 Sci Vie* 310:15–20.
5. Linnaeus C von. 1758. *Systema naturae*, 10th edn, vol. 1. Stockh Salvii.
6. Paillard C, Jean F, Ford SE, Powell EN, Klinck JM, Hofmann EE, Flye-Sainte-Marie J. 2014. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *J Sea Res* 91:15–34.
7. Paillard C. 2016. An ecological approach to understanding host-pathogen-environment interactions: the case of Brown Ring Disease in clams
8. Paillard. 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat Living Resour* 17:467–475.
9. Allam B, Paillard C, Auffret M. 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the

pathogen *Vibrio tapetis*. J Invertebr Pathol 76:63–69.

10. Al-Khalaifah H, Al-Nasser A. 2018. Immune Response of Molluscs. Molluscs.

11. Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas J-L, Paillard C. 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*.

Dis Aquat Organ 57:109–116.

12. Rahmani A, Corre E, Richard G, Bidault A, Oliveira L, Thompson C, Thompson F, Pichereau V, Paillard C. 2019. Transcriptomic analysis of clam Extra Pallial Fluids reveals immunity and cytoskeleton alterations in the first week of Brown Ring Disease development. Fish Shellfish Immunol - Submitted.

13. Paillard C. 2017. Brown ring disease: a vibriosis affecting clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*. ICES Identif Leaflet Dis Parasites Fish Shellfish 12.

14. Madec S, Pichereau V, Jacq A, Paillard M, Boisset C, Guérard F, Paillard C, Nicolas J-L. 2014. Characterization of the Secretomes of Two Vibrios Pathogenic to Mollusks. PLoS ONE 9:e113097.

15. Allam B, Ford SE. 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. Fish Shellfish Immunol 20:374–383.

16. Rodrigues S, Paillard C, Le Pennec G, Dufour A, Bazire A. 2015. *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. Front Microbiol 6.

17. Dias GM, Bidault A, Le Chevalier P, Choquet G, Der Sarkissian C, Orlando L,

Medigue C, Barbe V, Mangenot S, Thompson CC. 2018. *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs. *Front Microbiol* 9:227.

18. Bidault A, Richard GG, Le Bris C, Paillard C. 2015. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ* 3:e1484.

19. Stachel SE, Nester EW. 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 5:1445–1454.

20. Voth DE, Broederdorf LJ, Graham JG. 2012. Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol* 7:241–257.

21. Kerr JE, Christie PJ. 2010. Evidence for VirB4-Mediated Dislocation of Membrane-Integrated VirB2 Pilin during Biogenesis of the *Agrobacterium* VirB/VirD4 Type IV Secretion System. *J Bacteriol* 192:4923–4934.

22. Waksman G. 2019. From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO Rep* e47012.

23. Lakhel F, Bury-Mone S, Nomane Y, Le Goic N, Paillard C, Jacq A. 2008. DjlA, a Membrane-Anchored DnaJ-Like Protein, Is Required for Cytotoxicity of Clam Pathogen *Vibrio tapetis* to Hemocytes. *Appl Environ Microbiol* 74:5750–5758.

24. Zobell C. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res* 4:41–75.

25. Nguyen AN, Disconzi E, Charrière GM, Destoumieux-Garzón D, Bouloc P, Le Roux F, Jacq A. 2018. *csrB* Gene Duplication Drives the Evolution of Redundant Regulatory Pathways Controlling Expression of the Major Toxic Secreted Metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *mSphere* 3:e00582-18, /msphere/3/6/mSphere582-18.atom.
26. Luo P, He X, Liu Q, Hu C. 2015. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-Vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480. *PLoS One* 10:e0144465.
27. Stoudenmire JL, Essock-Burns T, Weathers EN, Solaimanpour S, Mrázek J, Stabb EV. 2018. An Iterative, Synthetic Approach To Engineer a High-Performance PhoB-Specific Reporter. *Appl Environ Microbiol* 84:e00603-18.
28. Delavat F, Bidault A, Pichereau V, Paillard C. 2018. Rapid and efficient protocol to introduce exogenous DNA in *Vibrio harveyi* and *Pseudoalteromonas* sp. *J Microbiol Methods* 154:1–5.
29. Stabb EV, Ruby EG. 2002. RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the *Vibrionaceae*. *Methods Enzymol* 358:413–426.
30. Dunn AK, Millikan DS, Adin DM, Bose JL, Stabb EV. 2006. New rfp- and pES213-Derived Tools for Analyzing Symbiotic *Vibrio fischeri* Reveal Patterns of Infection and lux Expression In Situ. *Appl Environ Microbiol* 72:802–810.
31. Oubella R, Paillard C, Maes P, Auffret M. 1994. Changes in hemolymph parameters in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia) following



bacterial challenge. J Invertebr Pathol 64:33–38.

32. Allam B, Paillard C, Ford SE. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. Dis Aquat Organ 48:221–231.

33. Paillard C, Maes P. 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. Dis Aquat Organ 19:137–146.

34. Paillard. 2004. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilit À Dir Rech HDR Univ Bretagne Occident Brest.

35. Maes P, Paillard C. 1992. Effect du *Vibrio* P1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990.

36. Maes P. 1992. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Brest Univ Bretagne Occident.

37. Choquet G. 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Brest.

38. Jeffroy F, Paillard C. 2011. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. Fish Shellfish Immunol 31:1137–1141.

39. Brulle F, Jeffroy F, Madec S, Nicolas J-L, Paillard C. 2012. Transcriptomic

analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after in vitro *Vibrio tapetis* challenge. *Dev Comp Immunol* 38:368–376.

40. Allam B, Pales Espinosa E, Tanguy A, Jeffroy F, Le Bris C, Paillard C. 2014. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease. *Fish Shellfish Immunol* 41:2–11.

41. Guglielmini J, Quintais L, Garcillán-Barcia MP, Cruz F de la, Rocha EPC. 2011. The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation. *PLOS Genet* 7:e1002222.

42. Rolfe B, Holloway BW. 1969. Host Specificity of DNA and Conjugation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genetics* 61:341–349.

43. Balbi T, Cortese K, Ciacci C, Bellese G, Vezzulli L, Pruzzo C, Canesi L. 2018. Autophagic processes in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Effects of *Vibrio tapetis*. *Fish Shellfish Immunol* 73:66–74.

44. Grohmann E, Christie PJ, Waksman G, Backert S. 2018. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria: Type IV secretion. *Mol Microbiol* 107:455–471.

45. Ghosal D, Chang Y-W, Jeong KC, Vogel JP, Jensen GJ. 2017. In situ structure of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system by electron cryotomography. *EMBO Rep* 18:726–732.

46. Sherwood RK, Roy CR. 2016. Autophagy Evasion and Endoplasmic Reticulum Subversion: The Yin and Yang of *Legionella* Intracellular Infection. *Annu Rev Microbiol*

70:413–433.

47. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. 2015. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol* 10:955–965.
48. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* 22:515–528.
49. Kohler LJ, Reed SR, Sarraf SA, Arteaga DD, Newton HJ, Roy CR. 2016. Effector Protein Cig2 Decreases Host Tolerance of Infection by Directing Constitutive Fusion of Autophagosomes with the Coxiella-Containing Vacuole. *mBio* 7:e01127-16.
50. Voth DE, Heinzen RA. 2007. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* 9:829–840.
51. Le Bris C, Richard G, Paillard C, Lambert C, Segueineau C, Gauthier O, Pernet F, Guérard F. 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish Shellfish Immunol* 42:16–24.
52. Paillard C, Maes P. 1995. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J Invertebr Pathol* 65:91–100.
53. Trinkler N, Bardeau J, Marin F, Labonne M, Jolivet A, Crassous P, Paillard C.

2011. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. *Dis Aquat Organ* 93:149–162.

54. Allam B, Raftos D. 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J Invertebr Pathol* 131:121–136.

## TABLES AND FIGURES

Table 1: Bacterial strains used in this study

Strains	Strains collection number	Description	Reference
<b><i>E. coli</i> strains</b>			
DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir	9	supE44, $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ lacZ $\Delta$ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, $\lambda$ pir phage lysogen	Lab strain
GEB883	62	<i>E. coli</i> K12 $\Delta$ dapA::erm, pir, RP4-2, $\Delta$ recA, gyrA462, zei298::Tn10, Ery <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , DAP-, conjugative strain	(25)
<i>E. coli</i> GEB883 + pFD055	88	<i>E. coli</i> GEB883 containing pFD055	This study
<i>E. coli</i> GEB883 + pEVS104	102	<i>E. coli</i> GEB883 containing pEVS104	This study
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir + pAR003	234	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir containing pAR003	This study
<b><i>V. tapetis</i> strains</b>			
CECT4600	2	<i>V. tapetis</i> reference strain (wild type) isolated from <i>R. philippinarum</i>	(2)
$\Delta$ virB4	177	CECT4600 strain in which the <i>virB4</i> gene has been deleted	This study
$\Delta$ virB4+ pAR003	268	Strain 177 containing pAR003	This study

Table 2: Plasmids used in this study

Plasmids	Characteristics	Reference
pGEM-T® Promega	<i>Amp<sup>R</sup></i> , <i>lacZ</i>	Promega
pLP12	<i>oriT</i> RP4, <i>oriVR6K</i> , <i>P<sub>BAD</sub>-vmi480</i> , <i>Cm<sup>R</sup></i> , suicidal plasmid in <i>V. tapetis</i> , replicative plasmid in <i>E. coli</i> $\lambda$ pir strains	(26)
pFD055	pLP12 plasmid containing the upstream and downstream regions of the <i>virB4</i> gene of <i>V. tapetis</i> CECT4600	This study
pJLS199	<i>oriT</i> RP4, <i>oriV R6K</i> , <i>Trim<sup>R</sup></i> , Replicative in <i>V. tapetis</i> and in <i>E. coli</i> . Derived from (27)	(28)
pEVS104	<i>Km<sup>R</sup></i> , replicative plasmid in <i>E. coli</i> , helper plasmid for conjugation	(29)
pVSV102	<i>Km<sup>R</sup></i> , containing a <i>gfp</i> gene, Replicative in <i>V. tapetis</i> and in <i>E. coli</i>	(30)
pFD085	Derivative of pJLS199, in which the <i>mcherry</i> gene has been removed (using <i>EagI</i> ), and in which the RBS region of the <i>gfp</i> gene has been replaced by the one found upstream of the <i>gfp</i> gene of pVSV102. Replicative plasmid in <i>E. coli</i> and <i>V. tapetis</i> , <i>Trim<sup>R</sup></i>	This study
pFD086	Derivative of pFD085 containing the <i>P<sub>lac</sub></i> promoter of pVSV102 upstream of the <i>gfp</i> gene ( <i>XhoI/XbaI</i> ), replicative plasmid in <i>E.</i> <i>coli</i> and <i>V. tapetis</i> , <i>Trim<sup>R</sup></i>	This study
pAR003	Derivative of pFD086 in which the <i>gfp</i> gene has been replaced by the <i>virB4</i> gene ( <i>XbaI/BamHI</i> ), expressed from the <i>P<sub>lac</sub></i> promoter. Replicative plasmid in <i>E. coli</i> and <i>V. tapetis</i> . <i>Trim<sup>R</sup></i>	This study

All in silico plasmid maps and sequences are available upon request

Table 3: Primers used in this study

Primer Name	Sequence (5' -> 3')	Description
170513	TTAAAAGTGGCGGAGGAATG	Forward primer annealing within the <i>virB4</i> gene
170514	AAGCTCTGCATCGGTTAGGA	Reverse primer annealing within the <i>virB4</i> gene
170607	TTTTT <u>GAATTC</u> CACGTTCAAAACTATCCAAAG ( <i>EcoRI</i> )	Forward primer to amplify the UP region of <i>virB4</i> gene
170608	GGGCTTGTGCATAATTAGAAC	Reverse primer to amplify the UP region of <i>virB4</i> gene
170609	<i>GTTCTAATTATGCACAAGCCCCGGA</i> ACTAAGGAAAGAGCTG (reverse complement of primer 170608 in italic)	Forward primer to amplify the DOWN region of <i>virB4</i> gene
170712	TTTTT <u>GCTAGC</u> GGTTTCATTAACGTCAATCTC ( <i>NheI</i> )	Reverse primer to amplify the DOWN region of <i>virB4</i> gene
170611	GGTTAGAACTTTTCGAGGAAC	Forward primer annealing 33 bp upstream of the UP region of <i>virB4</i> gene
170612	CCAAATCGTGTTCGACGTC	Reverse primer annealing 83 bp downstream of the DOWN region of <i>virB4</i> gene
170515	GTTTTCCAGTCACGAC	Forward primer annealing 111 bp before pGEM-T insertion site
170516	CAGGAAACAGCTATGACC	Reverse primer annealing 126 bp after pGEM-T insertion site
180915	TTTTT <u>CTAGA</u> AAAGAAGGAGATATACATATGCACAAGCCCCTCAATAG ( <i>XbaI</i> )	Forward primer amplifying <i>virB4</i> gene
180916	TTTTT <u>GGATC</u> CTCACAGCTCTTCCTTAGTTC ( <i>BamHI</i> )	Reverse primer amplifying <i>virB4</i> gene
170901	GCTCGAGGGAATATAAGTCG	Forward primer annealing 59 bp before UD fragment in pFD055
170902	CGGCTGACATGGGAATTGC	Reverse primer annealing 52 bp after UD fragment in pFD055
180401	ACGT <u>ACTAGT</u> GATATCCTGCAGCTCGAGGGTTCGCGTTGCCGATTC ( <i>SpeI</i> )	Forward primer annealing in Plac promotor in pFD086

*Restriction sites are underlined*

AXE DE RECHERCHE I : Étude de la virulence de *Vibrio tapetis* – CHAPITRE 1

Table 4: Growth parameters of *V. tapetis* CECT4600 and *V. tapetis*  $\Delta$ virB4 in LBS and Zobell media, with shaking at 18°C in 100-well microplates.

Strains	T°	LBS			Zobell		
		Doubling Time (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	Lag Phase (h)	Doubling Time (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	Lag phase (h)
<i>V. tapetis</i> CECT4600	18°C	4.42 ± 0.04	1.74 ± 0.01	3.33 ± 0.00	2.22 ± 0.19	1.29 ± 0.01	2.53 ± 0.18
<i>V. tapetis</i> $\Delta$ virB4	18°C	6.00 ± 0.07	1.59 ± 0.01	3.40 ± 0.15	2.55 ± 0.10	1.13 ± 0.01	2.25 ± 0.32



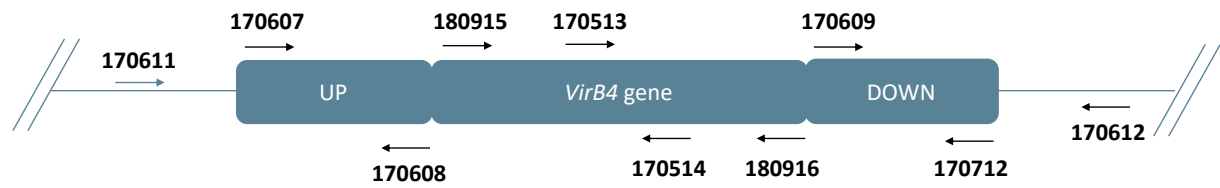


Figure 1: Scheme of *VirB4* region in the *V. tapetis* CECT4600 chromosome A with the positions of primers used in this study

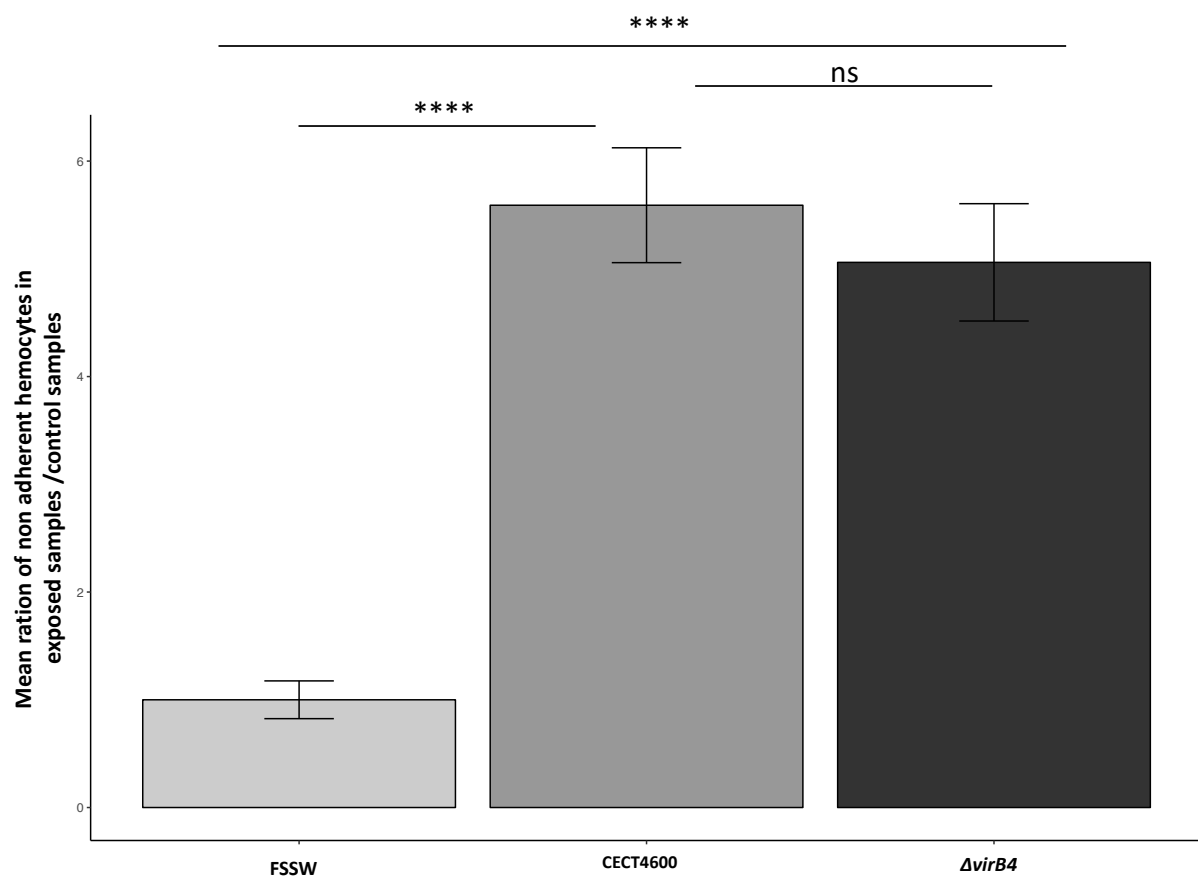


Figure 2: Effect of the  $\Delta virB4$  mutation on the adhesion properties of clam hemocytes. Results are presented by mean ratio of non-adherent hemocytes (i.e. round hemocytes) on exposed samples / control samples. \*\*\*\*:  $p.value < 10^{-4}$  (student test)

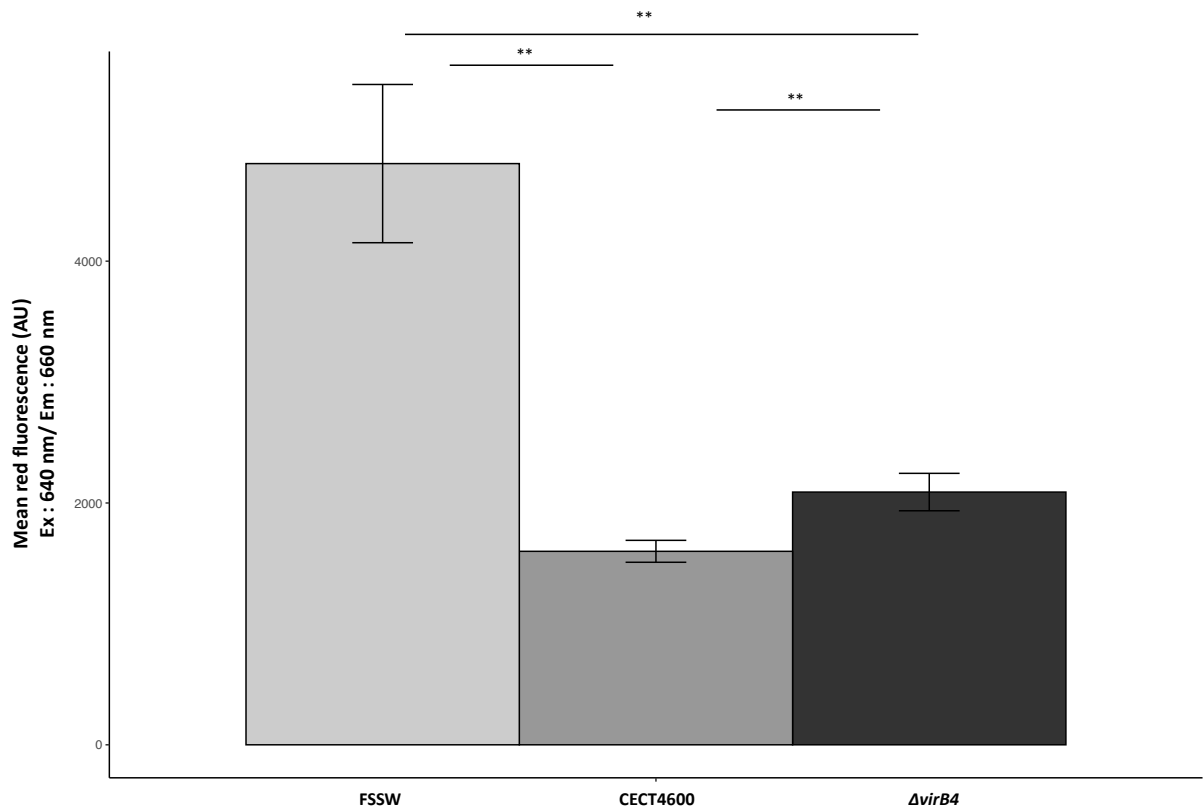


Figure 3: Measurement of acidic organelles amount by flow cytometry using Lysotracker Red DND-99®.

Excitation of the probe has been done at 640 nm, as specified in the x axis. Mean fluorescence measured in this range of excitation laser in y axis for each strain tested. \*\*:  $p.value < 0.004$  (Wilcoxon test)

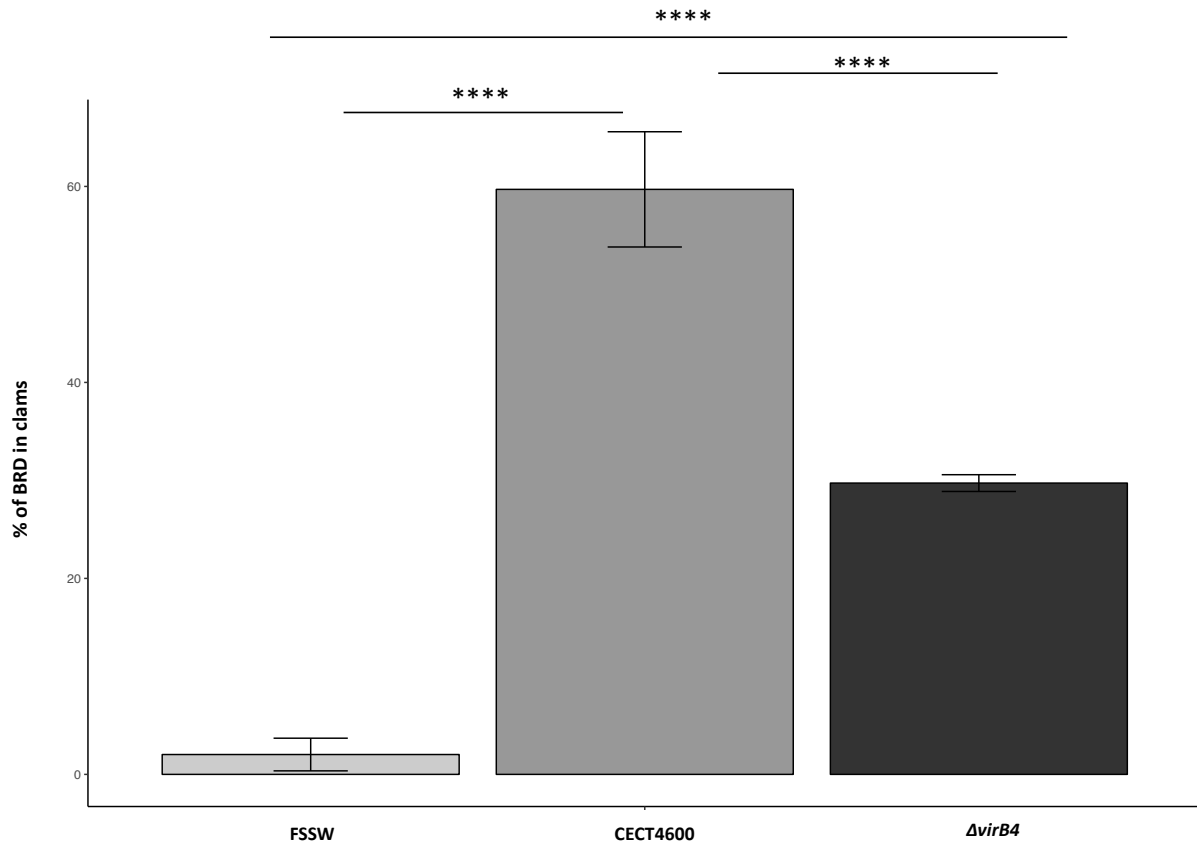


Figure 4: BRD prevalence after injection of *V. tapetis* strains CECT4600 and  $\Delta virB4$  in the pallial cavity of the Manila clam. \*\*\*\*:  $p.value < 10^{-4}$  (Chi2 test, 2df)

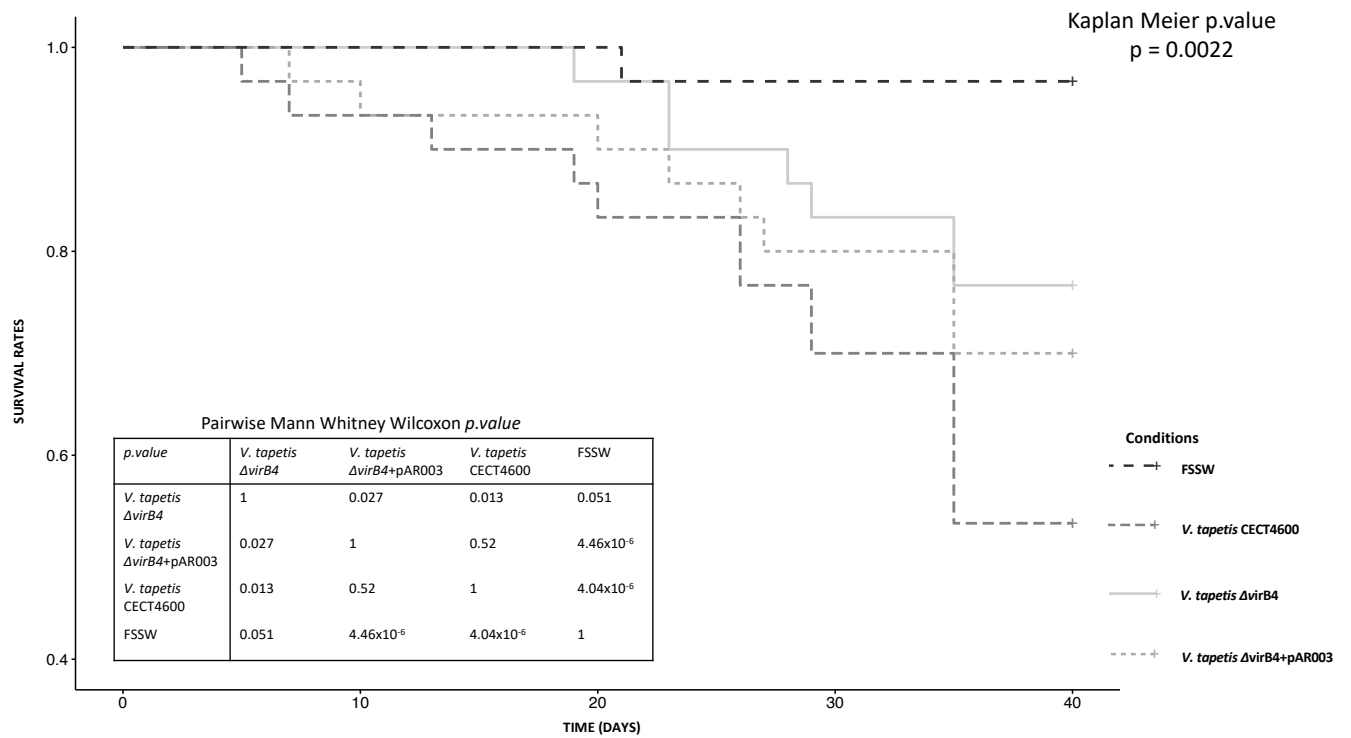


Figure 5: Mortality rates, using Kaplan-Meier analysis, observed after injection of strains *V. tapetis* strains CECT4600,  $\Delta virB4$  and  $\Delta virB4+pAR003$  (30 clams / conditions) in the adductor muscle of the Manila clam *R. philippinarum*.

### Résultats complémentaires

Après l'obtention de la souche *V. tapetis*  $\Delta virB4$ , nous avons tenté de supprimer les deux gènes suivants dans le but de réaliser de nouvelles expériences de mutagénèse ciblées chez la souche *V. tapetis* CECT4600.

#### **OmpU ou Outer Membrane Protein U**

Le gène *ompU* code pour la protéine de la membrane externe du même nom et est connu pour être un facteur de virulence chez le pathogène *Vibrio cholerae*, responsable du choléra. Son expression est induite par l'activateur transcriptionnel ToxR. La présence/ régulation du gène *ompU* joue un rôle prépondérant dans l'expression de facteurs de virulence et la colonisation de l'épithélium intestinale par *V. cholerae* (Provenzano and Klose 2000). La protéine OmpU est utilisée par la bactérie *Vibrio tasmaniensis* dans l'adhésion et la colonisation des cellules du système immunitaire lors de l'infection chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Duperthuy et al., 2011).

#### **GbpA ou N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) binding protein**

La protéine GbpA se lie aux carbohydrates contenant de la N-acetylglucosamine comme par exemple la chitine. Elle est impliquée dans la colonisation du mucus intestinal et la dégradation de la chitine marine par *V. cholerae* (Wong et al. 2012). Cette protéine est sécrétée par le système de sécrétion de type II (Kim, Jude, and Taylor 2005). Cette protéine possède 4 domaines dont 3 sont essentiel à la colonisation de *V. cholerae* chez la souris (Wong et al. 2012).

Nous avons réussi à construire les plasmides pAR001 et pAR002 (Fig. 27) permettant de réaliser les expériences de mutagénèses ciblées vers les gènes *ompU* et *gbpA*, respectivement. Ces plasmides sont construits à partir du plasmide pLP12 (Luo et al., 2015) dans lequel nous avons intégré les séquences en amont et en aval des gènes cibles, précédemment amplifiées par PCR et purifiées.

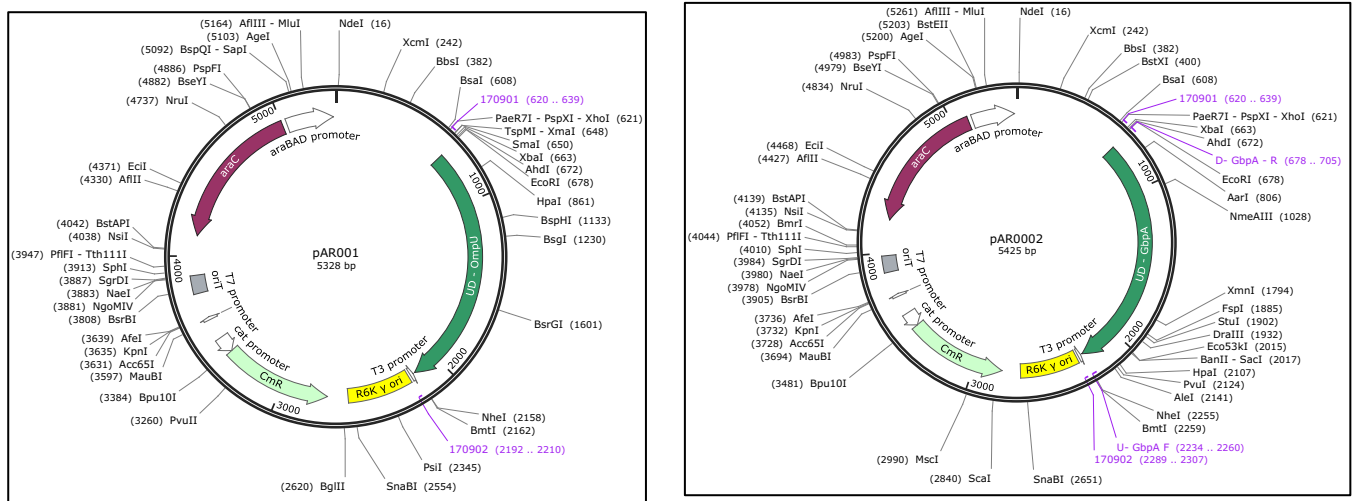


Figure 27 : cartographie des plasmides pAR001 (portant les séquences Up-DOWN du gène *ompU*) et pAR002 (portant les séquences UD du gène *gbpA*)

Plusieurs essais de conjugaisons ont été réalisés avec les souches suivantes, à 25°C durant 48H selon le protocole développé pour déléter le gène *virB4* :

- *E. coli* GEBB883 + pAR001 ; *E. coli* GEB883 + pEVS104 ; *V. tapetis* CECT4600  
ou
- *E. coli* GEBB883 + pAR002 ; *E. coli* GEB883 + pEVS104 ; *V. tapetis* CECT4600

Nous avons tenté de réaliser les conjugaisons en milieux LBS et Zobell et à 18° et 25°C avec des conjugaison durant 24 ou 48H. Malheureusement aucun co-intégrat (souche de *V. tapetis* ayant intégré le plasmide pAR001 ou pAR002 dans son génome) n'a pu être obtenu malgré plusieurs tentatives. Il est possible que la température de conjugaison optimale soit différente selon la taille du plasmide. Il est également possible que l'intégration de celui-ci entraîne une modification létale chez *V. tapetis*.

Comme pour la délétion du gène *virB4*, une étape d'optimisation de la température de conjugaison devra être développée de manière adaptée pour chaque gène cible afin de maximiser les chances d'obtenir un mutant de délétion des gènes *ompU* ou *gbpA*.

## Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons développé une technique de mutagenèse ciblée nous ayant permis d'obtenir une souche délétée pour le gène *virB4*. De cette façon, nous avons pu étudier l'influence du T4SS sur le développement de la MAB. Dans notre étude, nous avons démontré l'importance du T4SS dans la MAB ainsi que dans la dynamique des mortalités associées à l'injection de *V. tapetis* dans le muscle adducteur de la palourde japonaise. Nous avons aussi mis en évidence que le T4SS n'était pas impliqué dans le phénomène d'arrondissement des hémocytes et dans la baisse de l'activité lysosomale observées *in vitro* après exposition d'hémocytes de palourdes japonaises à *V. tapetis*. La tentative d'obtention de deux autres mutants de délétion ciblant les gènes *ompU* et *gbpA* nous a permis de confirmer l'efficacité des techniques mises en place pour la construction des plasmides intégratifs nécessaires aux expériences de mutagenèse. En revanche, il semble que la technique développée pour supprimer le gène *virB4* ne soit pas directement adaptable à d'autres gènes cibles. Un travail supplémentaire d'optimisation du protocole de conjugaison devra donc être réalisé selon le gène ciblée, dans le but de multiplier le nombre de mutant et donc d'explorer plus en détails les voies moléculaires impliquées dans la MAB.

## CHAPITRE 2

---

Existe-t-il des marqueurs hôtes-spécifiques de la virulence de *V. tapetis* ?



## Introduction

*V. tapetis* est une bactérie capable d'infecter un large spectre d'hôtes vertébrés comme invertébrés. Nous avons la chance d'avoir accès à des isolats provenant d'espèces telles que la palourde japonaise mais aussi de poissons comme le labre ou la limande (Vercauteren et al., 2018). Le second chapitre de cette thèse est axé sur la problématique visant à étudier la virulence de souches de *V. tapetis* ayant un spectre d'hôte très différents. Les isolats testés ont été isolés à partir de la palourde japonaise *R. philippinarum*, de la limande *Limanda limanda*, du labre *Symphodus melops* ou encore du flétant *Hippoglossus hippoglossus*. Notre objectif est de déterminer s'il existe des marqueurs de virulence hôte-spécifiques. Pour cela, menée une étude basée sur 2 approches distinctes. D'une part, nous avons effectué une analyse de la virulence de souches de *V. tapetis*, à partir du test d'adhérence *in vitro*, afin de caractériser la pouvoir d'arrondissement des hémocytes des nouveaux isolats issus de la limande. Dans un second temps, nous avons analysés l'ensemble des isolats grâce à la technique MALDI-TOF MS et développé une approche de « strains typing » afin d'identifier des marqueurs discriminant les souches de *V. tapetis* pathogènes de bivalves et de poissons. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la Ghent University (Belgique) et plus particulièrement avec ma collègue doctorante **Maaïke VERCAUTEREN**, sous la direction de Koen CHIERS et Annemie DECOSTERE.

# Identification de marqueurs de virulence hôte-spécifiques chez *V. tapetis* : étude comparative chez la palourde japonaise et la limande

## Résumé de l'article

*Vibrio tapetis* est l'agent étiologique de la maladie de l'anneau brun qui affecte principalement la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Bien que cette bactérie ait été principalement connue comme pathogène des palourdes, elle a été isolée chez plusieurs espèces de poissons. L'objectif principal de la présente étude était d'explorer la variabilité entre de 29 isolats de *V. tapetis* provenant de bivalves et de poissons, en considérant trois aspects différents : la virulence *in vitro* basée sur la perte des propriétés d'adhésion des hémocytes de palourdes, la détection du gène *virB4*, qui code une composante essentielle du système de sécrétion de type IV (T4SS) et la caractérisation MALDI-TOF MS. Enfin, ces approches ont été comparées et évaluées pour leur capacité à discriminer la pathogénicité potentielle des 29 isolats vis à vis de la palourde japonaise. Les isolats de poissons et de palourdes ont montré une virulence faible et élevée, respectivement, selon des expériences de virulence *in vitro*, vis à vis de la palourde japonaise. Parmi les 11 isolats de limande commune isolés en 2018 en Belgique, sept sont porteurs du gène *virB4* alors qu'aucun des isolats de poissons testés dans les études précédentes n'a montré la présence de ce gène particulier. Enfin, les profils de pics générés par l'analyse MALDI-TOF MS ont montré un regroupement clair des souches pathogènes de palourde. Par conséquent, nous pouvons supposer qu'un nouvel isolat qui se regrouperait avec des souches pathogènes de palourdes serait plus probablement pathogène pour la palourde japonaise.

Dans cette étude, nous avons démontré l'efficacité du typage MALDI-TOF MS pour discriminer les isolats de *V. tapetis* en fonction de leur virulence contre la palourde japonaise. Cette approche permet une identification rapide et très abordable des souches de *V. tapetis* et ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la virulence des isolats de *V. tapetis* mais aussi pour la surveillance environnementale afin de prévenir les foyers d'infection.

Article en préparation

## MALDI-TOF MS as a tool to characterize *V. tapetis* virulence profiles against the Manila clam

Alexandra Rahmani<sup>1†</sup>, Maaïke Vercauteren<sup>2†</sup>, Katleen Vranckx<sup>3</sup>, Filip Boyen<sup>2</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Vianney Pichereau<sup>1</sup>, Annemie Decostere<sup>2</sup>, Christine Paillard<sup>1, \*\*</sup> and Koen Chiers<sup>2, \*\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

<sup>2</sup>Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>3</sup> Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium

† Shared first authors

\*\* Shared last authors

## MALDI-TOF MS as a powerful tool to characterize *V. tapetis* virulence profiles against the Manila clam

Alexandra Rahmani<sup>1†</sup>, Maaïke Vercauteren<sup>2†</sup>, Katleen Vranckx<sup>3</sup>, Filip Boyen<sup>2</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Vianney Pichereau<sup>1</sup>, Annemie Decostere<sup>2</sup>, Christine Paillard<sup>1</sup>, \*\* and Koen Chiers<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

<sup>2</sup> Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>3</sup> Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium

† Shared first authors

\*\* Shared last authors

### ABSTRACT

*Vibrio tapetis* is the etiological agent of Brown Ring Disease mainly affecting the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Although this bacterium has been mainly known as a clam pathogen, it has been isolated from several fish species. The main aim of the present study was to further explore the variability between 29 *V. tapetis* isolates from bivalves and fish, considering three different aspects; *in vitro* virulence based on the loss of clam hemocyte adhesion properties, detection of the *virB4* gene, which encodes an essential

component of the Type IV Secretion System (T4SS), and MALDI-TOF MS characterization. Finally, these approaches were compared and evaluated for their ability to discriminate the potential pathogenicity of the 29 isolates against the Manila clams. The isolates from fish and clams showed low and high virulence, respectively, according to *in vitro* virulence experiments, against the Manila clam. Among the 11 isolates from the common Dab isolated in 2018 in Belgium, seven carry the *virB4* gene while none of the fish isolates tested in previous studies showed the presence of this particular gene. Finally, the peak profiles generated with MALDI-TOF MS analysis showed a clear clustering of clam pathogenic strains. Therefore, we can assume that a new isolate that would cluster with clam pathogenic strains is more likely pathogenic to the Manila clam as compared to a one that would not.

In this study, we demonstrated the efficacy of MALDI-TOF MS typing to discriminate isolates of *V. tapetis* according to their virulence abilities against the Manila clam. This approach allows rapid and very affordable identification of *V. tapetis* strains and opens new perspectives to study the virulence of *V. tapetis* isolates but also to perform environmental monitoring in order to prevent outbreaks.

**KEYWORDS:** *Vibrio tapetis*, MALDI-TOF MS, *virB4*, hemocyte cytotoxicity assay, Manila clam, fish

**ABBREVIATIONS**

BRD: Brown ring Disease

FSSW: Filtered Sterilized Sea Water

HPLC: High performance liquid chromatography

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

MLSA: Multilocus sequence analysis

RAPD-PCR: Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR

T4SS: Type IV secretion system

TSA: Tryptic Soy Agar

## INTRODUCTION

*Vibrio tapetis* is the etiological agent of Brown Ring Disease (BRD) mainly affecting Manila clam *Ruditapes philippinarum* and responsible for mass mortalities in cultured clams (Maes and Paillard, 1992; Paillard et al., 1994). BRD is characterized by a brown organic, conchiolin deposit, between the pallial line and the edge of the shell (Paillard and Maes, 1995). The reference strain *V. tapetis* CECT4600, first isolated from a cultured Manila clam exhibiting BRD in France, has been well characterized (Borrego et al., 1996; Paillard and Maes, 1990). Since 1990, *V. tapetis* was identified in BRD of various bivalve hosts such as the common cockle *Cerastoderma edule* (Novoa et al., 1998; Paillard and Maes, 1990), the rayed artemis *Dosinia exoleta* (Paillard, 2004), *Polititapes rhomboïdes* (Paillard, 2004), *R. decussatus* (Maes and Paillard, 1992; Novoa et al., 1998) and *Venerupis aurea* (Maes and Paillard, 1992). This suggests that *V. tapetis* is able to cross species barriers (Paillard, 2016).

Recent studies described the isolation of *V. tapetis* from cultivated or captive held aquatic vertebrates such as the corkwing wrasse *Symphodus melops* (Jensen et al., 2003), the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Reid et al., 2003), the Dover sole *Solea solea* (Declercq et al., 2015), the Fine flounders *Paralichthys adspersus* and the Red conger eel *Genypterus chilensis* (Levican et al., 2017). *V. tapetis* was also pinpointed as causative agent of ulcerative skin lesions in the wild-caught common Dab *Limanda limanda* (Vercauteren et al., 2019).

In the past, *V. tapetis* has been described as a homogenous taxon based on traditional methods such as bio- or serotyping (Castro et al., 1996; Figueras et al., 1996). More recently, more advanced genetic or experimental techniques revealed that this species is more heterogeneous. To date, three distinct subspecies of *V. tapetis* are described, i.e. subsp. *tapetis* (Balboa and Romalde, 2013), subsp. *britannicus* (Balboa and Romalde, 2013) and subsp. *quintayensis* (Levicán et al., 2017). Using genotyping methods, such as Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR (Romalde et al., 2002) and multilocus sequence analysis (MLSA) (Gulla et al., 2017) different clusters could be defined between *V. tapetis* isolates. Nevertheless, the phylogeny of *V. tapetis* is not yet completely unraveled. From an epidemical point of view, differences between *V. tapetis* isolates can provide valuable information regarding the diagnosis of BRD outbreaks and detection of virulent strains. Furthermore, typing of isolates can also help examining the geographical and host distributions supporting a more ecological approach for studying host-pathogen-environment interactions (Paillard, 2016; Rodríguez et al., 2006).

Several studies have indeed pointed towards differences between *V. tapetis* strains pathogenic and non-pathogenic to clam. *In vivo* experiments revealed that none of the strains isolated from fish are able to induce BRD in clam (Bidault et al., 2015; Choquet, 2004; Dias et al., 2018). In addition, these last authors have pointed out that genes coding for the Type IV Secretion System (T4SS) were only present in strains isolated from bivalves and pathogenic to the Manila clams (Dias et al., 2018).



The main aim of the present study was to further explore the variability between the 29 *V. tapetis* isolates from bivalves and fish, considering three different aspects; *in vitro* virulence based on the loss of hemocyte adhesion properties (Choquet et al., 2003), detection of the *virB4* gene (Bidault et al., 2015), coding an essential component of the Type IV Secretion System (T4SS) and MALDI-TOF MS characterization. Finally, these approaches were compared and evaluated for their ability to discriminate the potential pathogenicity of the 29 isolates against the Manila clams.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Bacterial isolates and cultivation***

The *V. tapetis* isolates used in this study were isolated from nine different host species (five bivalves and four fish species) in various countries between 1988 and 2017. Table 1 summarizes the information available on the year, place and host of first isolation in relation with the knowledge about virulence associated to isolates of *V. tapetis* in the context of this study.

In this study, *V. tapetis* isolates were usually cultivated on Tryptic Soy Agar (TSA; Difco™) supplemented with 1.5% NaCl and were allowed to grow for two days at  $16 \pm 1^\circ\text{C}$  (fish isolates) or  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  (clam isolates). In all experiments, the reference strain CECT4600 was used as the positive control.

***In vitro* toxicity assay against Manila clam hemocytes**

*In vitro* virulence of *V. tapetis* isolates derived from the common Dab was tested using the standardized *in vitro* hemocyte cytotoxicity bioassay (Choquet et al., 2003). The type strain CECT4600 was used as the positive control, and filter-sterilized seawater (FSSW) as the negative one. Animals used in this study were Manila clams from the SATMAR shellfish aquaculture site in Landeda (Finistère, France). Clams were allowed to acclimate in oxygenated seawater at 14°C for 14 days. Hemolymph was harvested from the adductor muscle, pooled after quality check and the hemocytes were enumerated using a Malassez cell. One hundred µl of hemolymph was added in 24-well plates and kept for a few minutes to let hemocytes to adhere to the bottom of the plate. Then, 100 µl of bacterial suspension prepared with FSSW, was added at a bacteria/hemocyte ratio of 25/1. Each bacterial exposure was performed in triplicates. In control samples, 100 µl of FSSW was added to the hemolymph. After 3 h of incubation, the number of non-adherent hemocytes was measured using flow cytometry after addition of 4 µl of SYBR–Green solution in DMSO (nucleic acid gel stain, dilution 1:10 000, Life Technology, USA) as already described (Choquet et al., 2003). Statistical analyses were performed using a pairwise Student test to determine significant differences in non-adherent cell ratios between bacterial suspensions and control samples (both positive and negative).

***Detection of the virB4 gene in isolates from the common Dab***

As the presence of the *virB4* gene was already known in most of all the other strains, PCR detection of the *virB4* gene was only performed in the common Dab isolates. A PCR assay was performed in which a fragment of 173 bp of the *virB4* gene was amplified using primers 170513 (5'-TTAAAAGTGGCGGAGGAATG-3') and 170514 (5'-AAGCTCTGCATCGGTTAGGA-3') and GoTAQ polymerase. Subsequently a Taqman real-time qPCR quantification was performed according to the standardized method previously described (Bidault et al., 2015).

***MALDI-TOF MS typing on the 29 V. tapetis isolates from bivalves and fish***

An ethanol formic acid extraction was performed, based on MALDI Biotyper protocol (Bruker Daltonics, Bremen Germany). Briefly, cultures were suspended in nuclease-free water aliquoted in 1.5 ml Eppendorf tubes. Ethanol dissolved in high performance liquid chromatography (HPLC) grade water was added to the suspension and tubes were centrifuged (20 000 x g, 2 min) twice upon which the ethanol was removed. Thereafter, 20 µl of 70% formic acid (in HPLC grade water) was added to the pellet. To finish the extraction, 20 µl of acetonitrile was added. One µl of each extract was spotted eight-fold (technical replicates) on a MALDI target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), air dried and covered with one µl of alpha- cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). All samples were processed in triplicate (technical replicates) with an Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF MS, recording masses ranging

from 2 000 to 20 000 Da. The obtained raw spectra were imported in BioNumerics 7.6.3 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) for data analysis. Preprocessing of the data was performed according to (Giacometti et al., 2018). After preprocessing, peaks were detected using the continuous wavelet transform method with a signal-to-noise threshold of two. The spectra were summarized in a single average spectrum per biological replicate and all replicates with less than 95% similarity to this summary spectrum were removed from the analysis. The resulting summary spectra were used to construct an UPGMA dendrogram using a Pearson similarity coefficient.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The wide host and geographic distribution of *Vibrio tapetis* and linked questions on possible variability of isolates have been discussed in previous research with a deep interest in finding a discriminative test for assessing pathogenicity of *V. tapetis* strains against clams (Bidault et al., 2015). Furthermore, the isolation of new isolates from skin ulcerations in the common Dab (Vercauteren et al., 2018) might urge for further explorations of pathogenic markers using available techniques.

***Most of the V. tapetis isolates from the common Dab are unable to induce a loss of Manila clam hemocytes adhesion properties***

To gain insight into the pathogenicity of *V. tapetis* to the Manila clam, an *in vitro* cytotoxicity assay was developed based on the cell-rounding and subsequent loss of adherence of hemocytes following exposure to *V. tapetis* (Choquet et al., 2003). This bioassay was previously performed for many *V. tapetis* strains pathogenic to clam (Table 1), whereby isolates IS9 and CECT4600 induced the highest loss of adhesion properties (i.e. *in vitro* cytotoxicity). Most of the other strains isolated from bivalves displayed intermediate cytotoxicity. Remarkably, the GDE and GTR-I strains, both isolated from bivalves but not from the Manila clam, showed no cytotoxicity *in vitro*. Complete genome analyses of these two particular isolates revealed strong differences with those from strains isolated from clam (Dias et al., 2018). Interestingly, genomes comparisons showed that they would rather be genetically closer to a strain initially isolated from fish (LP2).

Regarding the common Dab isolates tested in this study, non-adherent cells ratios after bacterial exposure were fluctuating around 1 for isolates 2AE, 2BG, 2AC and 2BM. The 2BU isolate displayed a ratio of  $0.85 \pm 0.14$  and remained clearly below 1 in all replicates. The ratios found with isolates 2AU, 2BW, 2BC, 2BT and 2BA ranged between 1 and 1.5. The isolate 2BB showed the highest cytotoxic activity with an average ratio of  $2.27 \pm 0.26$  (Figure 1). For almost all isolates, the ratios of non-adherent cells did not significantly differ from the FSSW control ( $pvalue > 0.05$  ; Fig. 3). The only exception was the isolate 2BB that showed a significantly higher ratio compared with the FSSW control ( $pvalue$ :

0.0005 ; Fig. 3). These results are consistent with previous results concerning strains isolated from fish that mostly showed negative cytotoxicity towards clam hemocytes (Dias et al., 2018).

The cytotoxicity assay, used with clam pathogenic strains, is not always clearly linked to *in vivo* pathogenicity as illustrated by virulence profile of strain RD0705 (Table 1). Indeed, this strain is not able to induce a loss of hemocytes adhesion properties *in vitro* but is able to induce BRD *in vivo* in the Manila clam (Dias et al., 2018; Novoa et al., 1998). Nevertheless, since this particular strain has been isolated from another species (i.e. *Ruditapes decussatus*), we can assume that this inconsistency might be related to host specificity regarding the cytotoxicity *in vitro*.

Beyond this exception, it should be recalled that the analysis of the virulence profiles of many *V. tapetis* strains already characterized for virulence *in vitro* and *in vivo* revealed a good correlation between the cytotoxic activity to clam hemocytes and the *in vivo* pathogenicity. Therefore, in view of the results obtained with the new common Dab isolates, it would be interesting to test whether the 10/11 isolates that display negative *in vitro* virulence tests are effectively not pathogenic (*in vivo*) to the Manila clam, and conversely whether the 2BB isolate is pathogenic *in vivo*.

***First detection of the virB4 gene in non-cytotoxic fish isolates***

Recently, a rapid and accurate Taqman real-time PCR assay for detection and quantification of *V. tapetis* in extrapallial fluids of the Manila clam has been developed, based on the presence of the *virB4* gene, which encodes an essential component of the T4SS (Bidault et al., 2015). Furthermore, among 17 fully sequenced *V. tapetis* genomes, the T4SS genes cluster was identified only in the genomes of strains virulent to the Manila clam, thus strongly suggesting a role for this T4SS system in *V. tapetis* pathogenicity (Dias et al., 2018). These results confirmed previous ones based on the screening performed on *V. tapetis* strains pathogenic vs non-pathogenic to clam (Table 1), which showed that the *virB4* gene was present only in clam pathogenic strains (Bidault et al., 2015). It should be noted that the only strain known to carry the *virB4* gene and not able to induce *in vitro* cytotoxicity to hemocytes is the strain RD0705. However, as previously evoked, while it was not isolated from the Manila clam, this strain is able to induce BRD *in vivo*, which can explain this inconsistency as described above.

Surprisingly, in the isolates from common Dab, the *virB4* gene was found to be present in seven out of the 11 isolates from the common Dab (2BM, 2AU, 2BA, 2BT, 2BU, 2AC and 2BG). This study is therefore the first one that provides evidence that *V. tapetis* isolated from fish that can carry the gene *virB4*. None of these isolates displayed *in vitro* virulence to clam hemocytes.

This finding challenges the idea that the presence of T4SS is systematically associated with virulence and questions the relevance of *virB4* as a pertinent marker in order to

discriminate strains according to their pathogenicity to clams.

### **MALDI-TOF MS analyses reveals 3 clusters of *V. tapetis* isolates**

All 29 *V. tapetis* isolates included in this study were analyzed using the MALDI-TOF MS method. This method allows sensitive and rapid identification of microorganisms and is now widely used in different fields such as clinical microbiology, epidemiological studies or water or food borne pathogens (Singhal et al., 2015). The technique is broadly used to identify microorganisms at the species level, but has recently been shown valuable for strain-typing (Sandrin et al., 2013).

The main peaks were found between 2000 and 7500 Da. Based on the peak profile generated by the MALDI-TOF MS, the constructed dendrogram (Figure 2) of the investigated spectra revealed some clearly delineated clusters. In total three distinct clusters (named A, B and C) and six sub-clusters could be defined, based on differences in 12 peaks (Figure 2). Peak intensities visualized by the heat map in figure 2 show that the differences between isolates are subtle. All strains that were isolated from BRD outbreaks in cultured Manila clam between 1988-1996 clustered together in cluster B with only a 29.6 % similarity with other isolates. The strains isolated from the common cockle (IS9) and from the carpet shell clam, *R. decussatus* (RD0705) were also included in this cluster. By contrast, the stains that were isolated from the rayed artemis, *D.exoleta* (GDE) and from *P. rhomboïdes* (GTR-I) were clustered together with isolates from fish, in



the cluster A. In all, the recent isolates from the common Dab all clustered together, except 2BW that formed a completely separate cluster, named cluster C.

Among the strains analyzed in the present study, some are of particular interest. GDE and GTR-I are two strains that were isolated from natural populations of *D. exoleta* and *P. rhomboïdes* in 2003 and 2008, respectively. Although the strain GTR-I is able to induce BRD on *P. rhomboïdes*, these two strains GDE and GTR-I are considered as non-pathogenic for the Manila clam, despite the fact that they were isolated from bivalves (Dias et al., 2018). The strain FPC1121 was isolated from cultivated Manila clam in Japan (Table 1, Matsuyama et al., 2010). The original report clearly described the brown deposit and mass mortalities of Manila clam due to this strain, which was confirmed by *in vivo* virulence assays (Matsuyama et al., 2010). Previous qPCR analysis was not able to detect the *virB4* gene in the FPC1121 strain and a possible explanation might be that the strain uses a different secretion system or that pathogenicity mechanisms might be different (Bidault et al., 2015). More research will be necessary to study this specific strain and its phylogenetic position.

The clustering that was deduced from the MALDI-TOF MS analyses, showed some similarities with previously reported data based on genome analyses (Dias et al., 2018). Indeed, previous results had shown that the strains isolated from the rayed artemis (GDE) and *P. rhomboïdes* (GTR-I) were genetically distant from *V. tapetis* strains isolated from clams. Furthermore, strain LP2 (isolated from *S. melops*) seemed to be genetically close to the strain GTR-I. The same clustering could be observed based on the MS profiles.

Finally, Dias and collaborators (2018) had also shown that strain HH6087, which belongs to the subspecies *britannicus* of *V. tapetis*, was highly distant from all the other studied strains of *V. tapetis* (that belong to the *subsp. tapetis*). Furthermore, the increase of *V. tapetis* fish isolates in this study, as compared to previous ones, allows us to better clarify the place of strain HH6087 in the species *V. tapetis*, thus questioning the subspecies associated to several isolates from the common Dab.

### ***Ecophysiological implications in the context of BRD***

Figure 3 synthesizes the relationship between the MALDI TOF MS clustering and the virulence (*in vitro*) for all the isolates used in this analysis, according to either this study or previous virulence profiles analyses.

First, we can show that all the strains that present the same virulence profile, i.e. positive virulence (*in vitro* or *in vivo*) associated to the *virB4* gene, clustered together in cluster B based on the MALDI-TOF MS analysis. Second, the strains GDE and GTR-I, clustered in cluster A with fish isolates, which is consistent with their virulence profiles, i.e. negative virulence *in vitro* or *in vivo* without the presence of *virB4* gene. Finally, all strains isolated from fish and presenting no virulence *in vitro*, clustered together, also in cluster A, despite the fact that 7 of them carry the gene *virB4*.

As already mentioned, a Taqman real-time PCR assay for the detection and quantification of *V. tapetis* in extrapallial fluids of the Manila clam has been developed, based on the

presence of the *virB4* gene (Bidault et al., 2015). Analyses of several *V. tapetis* strains have demonstrated that only the strains isolated from the Manila clams carry this particular gene, therefore suggesting an important role for the T4SS in the pathogenicity of *V. tapetis*. This postulate was recently reinforced by the study of several genomes of *V. tapetis* strains that demonstrated that the T4SS genes cluster was present only in strains pathogenic to and isolated from the Manila clam (Dias et al., 2018).

In the present study, we showed for the first time that some *V. tapetis* isolates from fish carry the gene *virB4*. This discovery challenges the way in which strains of *V. tapetis* to the Manila clam are analyzed and detected. Since the fish isolates carrying the *virB4* gene did not cause cytotoxic effects in clam hemocytes, the use of the *virB4* gene as a single tool to detect pathogenic strain seems not to be sufficient. By contrast, the MALDI-TOF MS analysis performed in this study on 29 isolates of *V. tapetis* allowed for a good segregation considering to their *in vitro* pathogenic activity against the Manila clam hemocytes. It is noteworthy that all the strains included in cluster B are also able to reproduce the Brown Ring Disease (BRD) *in vivo* in manila clams. Therefore, we can assume that an isolate that would cluster in cluster B is more likely pathogenic to the Manila clam as compared to a one that clusters in cluster A and vice versa.

It is important to bear in mind that strain-level identification using MALDI-TOF MS can be influenced by minor changes in growth conditions (Kern et al., 2014). To avoid such inconsistencies, all isolates have been cultured at both optimal growth temperature on the same media and the same timing was employed with all strains in this study. However,

when using this method at a broader scale, the same culture conditions need to be taken into account therefore complicating the applicability.

The information retrieved from the MALDI-TOF analysis is very sensitive to highly abundant proteins and peaks are therefore mainly based on ribosomal proteins (Sauer and Kliem, 2010). Those proteins are highly conserved and might therefore be quite similar between different strains, as seen in the peak intensity tables (Figure 2). Nevertheless, all fish and clam isolates could be separated based on the MALDI-TOF peak profile. This MS technique might therefore be regarded as a rapid and cost-effective tool to discriminate *V. tapetis* isolates more likely pathogenic to the Manila clam. Further research will be necessary to confirm the value and accuracy of this MALDI-TOF MS clustering.

Although the MALDI-TOF MS strain typing presented may be a rapid and powerful to identify *V. tapetis* strains, real-time qPCR Taqman is still required to quantify the *V. tapetis* load, but ultimately, the BRD reproduction experiments in Manila clams are the essential challenge to confirm the true pathogenicity of *V. tapetis* strains.

**CONCLUSION:**

In conclusion, although the currently used assays (toxicity to hemocyte and search of the *virb4* gene) were proved interesting to discriminate *V. tapetis* isolates pathogenic to clams, our results suggest that the MALDI-TOF MS analysis could be used as a valuable additional test to discriminate potentially pathogenic strains of *V. tapetis*, which would greatly limit the number of strains to be tested for *in vivo* reproduction of BRD. In this study, we showed the efficacy of the MALDI-TOF based technic to discriminate isolates of *V. tapetis* according to their virulence abilities against the Manila clam. This approach allows rapid and costless identification of *V. tapetis* species and opens new perspectives to study the virulence of *V. tapetis* isolates but also to perform environmental monitoring in order to prevent outbreaks.

**AUTHORS CONTRIBUTIONS:**

The collaboration has been initiated by AD, KC, CP and VP. *In vitro* virulence assays were performed by MV and AR. *virB4* detection was performed by MV, AR and AB. MALDI TOF MS experiments and analyses were performed by MV, FB and KV. The article was written by MV, AR, CP, VP, KC and AD.

**CONFLICTS OF INTEREST**

Katleen Vranckx is an employee of Applied Maths NV.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We warmly thank Annelies M. Declercq that provide us the first strains of *V. tapetis* at the beginning of this collaboration.

## REFERENCES

- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *Journal of invertebrate pathology* 76, 63–69. <https://doi.org/10.1006/jjpa.2000.494>
- Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of aquatic organisms* 48, 221–231.
- Balboa, S., Romalde, J.L., 2013. Multilocus sequence analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease: Description of *Vibrio tapetis subsp. britannicus subsp. nov.* *Systematic and Applied Microbiology* 36, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.12.004>
- Bidault, A., Richard, G.G., Le Bris, C., Paillard, C., 2015. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ* 3, e1484. <https://doi.org/10.7717/peerj.1484>
- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 480–484.
- Castro, D., Santamaria, J.A., Luque, A., Martinez-Manzanares, E., Borrego, J.J., 1996. Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80049-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80049-X)
- Choquet, G., 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l’anneau brun chez la palourde japonaise. Brest.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 57, 109–116.
- Declercq, A.M., Chiers, K., Soetaert, M., Lasa, A., Romalde, J.L., Polet, H., Haesebrouck, F., Decostere, A., 2015. *Vibrio tapetis* isolated from vesicular skin lesions in Dover sole *Solea solea*. *Diseases of aquatic organisms* 115, 81–86.
- Dias, G.M., Bidault, A., Le Chevalier, P., Choquet, G., Der Sarkissian, C., Orlando, L., Medigue, C., Barbe, V., Mangenot, S., Thompson, C.C., 2018. *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs. *Frontiers in microbiology* 9, 227.
- Figueras, A., Robledo, J.A.F., Novoa, B., 1996. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research* 15, 363–368.

Giacometti, F., Piva, S., Vranckx, K., De Bruyne, K., Drigo, I., Lucchi, A., Manfreda, G., Serraino, A., 2018. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *International Journal of Food Microbiology* 277, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.026>

Gulla, S., Rønneseth, A., Sørum, H., Vågnes, Ø., Balboa, S., Romalde, J.L., Colquhoun, D.J., 2017. *Vibrio tapetis* from wrasse used for ectoparasite bio-control in salmon farming: phylogenetic analysis and serotyping. *Diseases of Aquatic Organisms* 125, 189–197. <https://doi.org/10.3354/dao03140>

Jensen, S., Samuelsen, O.B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Bergh, Ø., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis.

Kern, C.C., Vogel, R.F., Behr, J., 2014. Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential. *Food Microbiology* 40, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.015>

Levican, A., Lasa, A., Irgang, R., Romalde, J.L., Poblete-Morales, M., Avendaño-Herrera, R., 2017. Isolation of *Vibrio tapetis* from two native fish species (*Genypterus chilensis* and *Paralichthys adspersus*) reared in Chile and description of *Vibrio tapetis* subsp. *quintayensis* subsp. *nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 716–723. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001705>

Maes, P., Paillard, C., 1992. Effect du *Vibrio* P1, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves, in: *Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture*, Brest (France), 9 Nov 1990.

Matsuyama, T., Sakai, T., Kiryu, I., Yuasa, K., Yasunobu, H., Kawamura, Y., Sano, M., 2010. First Isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathology* 45, 77–79. <https://doi.org/10.3147/jsfp.45.77>

Novoa, B., Luque, A., Castro, D., Borrego, J.J., Figueras, A., 1998. Characterization and Infectivity of Four Bacterial Strains Isolated from Brown Ring Disease-Affected Clams. *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 34–41. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4704>

Paillard, 2004. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Paillard, C., 2016. An ecological approach to understanding host-pathogen-environment interactions: the case of Brown Ring Disease in clams, in: *Oysters and Clams: Cultivation, Habitat Threats and Ecological Impact*.



- Paillard, C., Maes, P., 1990. Aetiology of brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie 310, 15–20.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. Annual Review of Fish Diseases 4, 219–240. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90030-2)
- Paillard, Maes, P., 1995. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. Journal of invertebrate pathology 65, 91–100.
- Reid, H.I., Duncan, H.L., Laidler, L.A., Hunter, D., Birkbeck, T.H., 2003. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 221, 65–74.
- Rodríguez, J.M., López-Romalde, S., Beaz, R., Alonso, M.C., Castro, D., Romalde, J.L., 2006. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. Diseases of aquatic organisms 69, 175–183.
- Romalde, J.L., Castro, D., Magariños, B., Lopez-Cortes, L., Borrego, J.J., 2002. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Vibrio tapetis*. Systematic and applied microbiology 25, 544–550.
- Sandrin, T.R., Goldstein, J.E., Schumaker, S., 2013. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review. Mass Spectrom. Rev. 32, 188–217. <https://doi.org/10.1002/mas.21359>
- Sauer, S., Kliem, M., 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nature Reviews Microbiology 8, 74–82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2243>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Vercauteren, M., De Swaef, E., Declercq, A.M., Polet, H., Aerts, J., Ampe, B., Romalde, J.L., Haesebrouck, F., Devriese, L., Decostere, A., Chiers, K., 2019. Scrutinizing the triad of *Vibrio tapetis*, the skin barrier and pigmentation as determining factors in the development of skin ulcerations in wild common dab (*Limanda limanda*). Vet Res 50, 41. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0659-6>
- Vercauteren, M., Swaef, E.D., Declercq, A., Bosseler, L., Gulla, S., Balboa, S., Romalde, J.L., Devriese, L., Polet, H., Boyen, F., Chiers, K., Decostere, A., 2018. First isolation of *Vibrio tapetis* and an atypical strain of *Aeromonas salmonicida* from skin ulcerations in common dab (*Limanda limanda*) in the North Sea. Journal of Fish Diseases 41, 329–335. <https://doi.org/10.1111/jfd.12729>

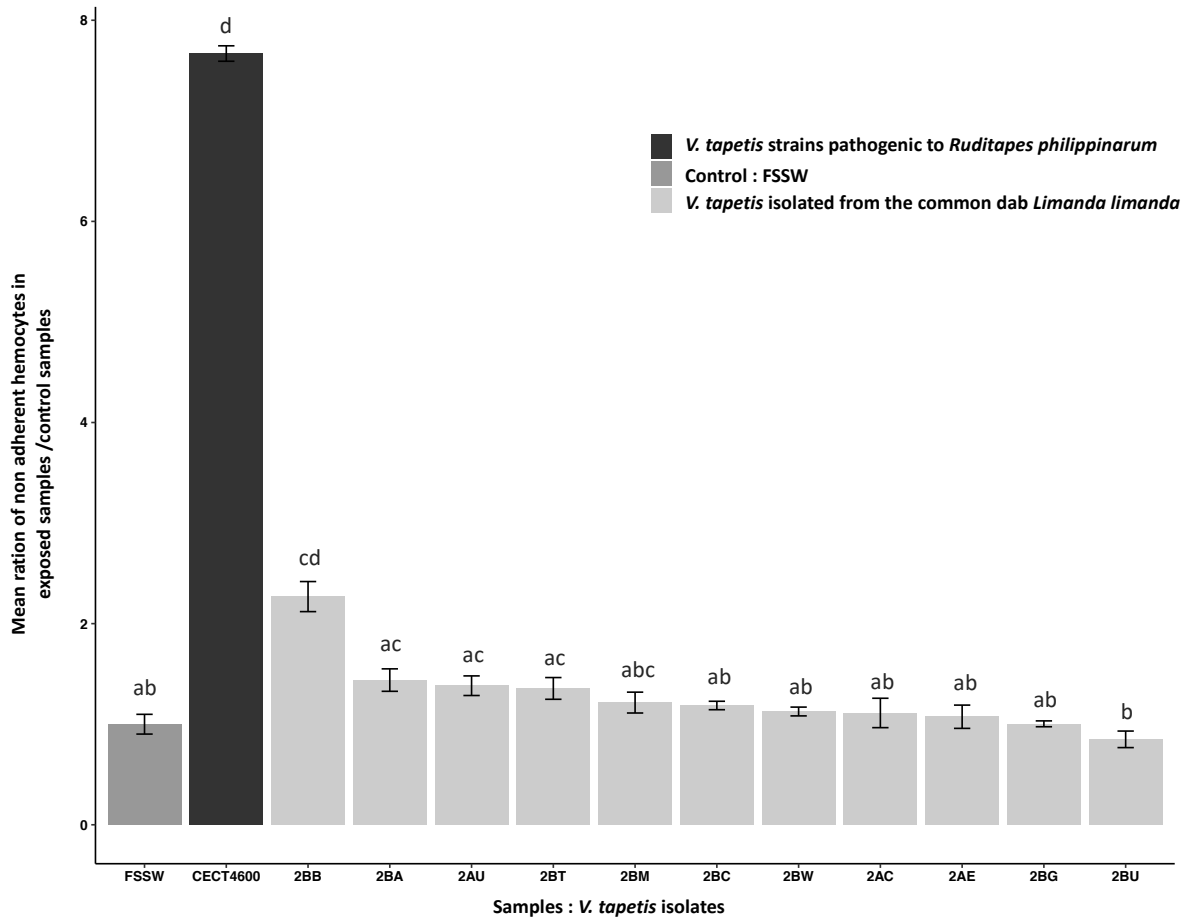
## TABLES AND FIGURES

**Table 1:** Synthesis of virulence associated to isolates of *V. tapetis*. \*: virulence against the Manila clam *Ruditapes philippinarum* ((-): no virulence, (±) intermediate virulence, (+): comparable virulence as the reference strain (CECT4600)). Nd: non determined a: negative in Dias et al, 2018 and intermediate in Choquet, 2004. b: negative in Dias et al, 2018 and intermediate in Choquet et al, 2003. \*\*: All *virB4* gene detection from Bidault et al., 2015; (+) : presence, (-): absence. All strains from bivalves were isolated from animals that present signs of BRD, except for strain IS9 isolated from cockles without signs of BRD, since this species is considered to be a reservoir for the pathogen.

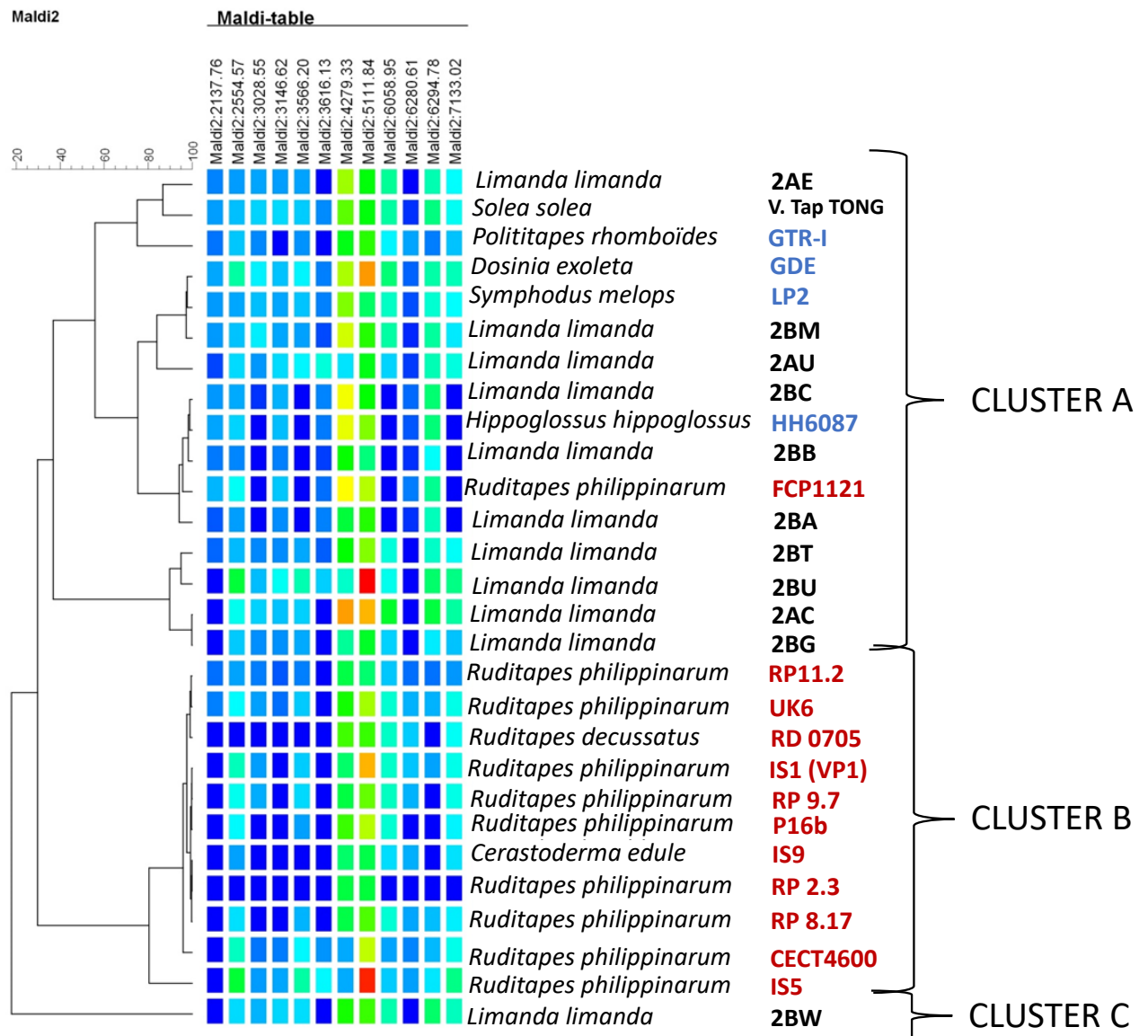
Strain	Host species	Common name	Year	Location	Isolate reference	<i>In vitro</i> virulence*	<i>In vivo</i> virulence*
GTR-I	<i>Politapes rhomboïdes</i>	nd	2008	France, Glénan	(Dias et al., 2018)	-	Nd
RD 0705	<i>Ruditapes decussatus</i>	European clam	1992	Spain, Galice	(Novoa et al., 1998)	-	+
CECT4600	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1990	France, Landeda	(Borrego et al., 1996; Paillard and Maes, 1995)	+	+
FPC1121	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	2008	Japan	(Matsuyama et al., 2010)	±	+
IS1 (VP1)	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1988	France, Landeda	(Paillard and Maes, 1990)	±	+
IS5	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1991	France, Landeda	(Borrego et al., 1996)	±	+
P16B	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1995	France, Golfe du Morbihan	(Allam et al., 2002)	±	+
RP 11.2	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1990	France, Landeda	(Borrego et al., 1996)	+	+
RP 2.3.	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1990	France, Landeda	(Borrego et al., 1996)	±	+
RP 8.17	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1990	France, Landeda	(Borrego et al., 1996)	±/- <sup>a</sup>	+
RP 9.7	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1990	France, Landeda	(Borrego et al., 1996)	±	+
UK6	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Manila clam	1996	Great Britain	(Allam et al., 2000)	±	+
IS9	<i>Cerastoderma edule</i>	Common cockle	1990	France, Quiberon	(Borrego et al., 1996)	+	+
GDE	<i>Dosinia exoleta</i>	Rayed artemis	2003	France, Glénan	(Dias et al., 2018)	-	-

## AXE DE RECHERCHE I : Étude de la virulence de *Vibrio tapetis* – CHAPITRE 2

LP2	<i>Symphodus melops</i>	Corkwing Wrasse	1999	Norway, Bergen	(Jensen et al., 2003)	±/° <sup>b</sup>	-
HH6087 (CECT 8161)	<i>Hipoglossus hipoglossus</i>	Atlantic halibut	2002	Great Britain, Glasgow	(Reid et al., 2003)	-	-
2AC	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2AE	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2AU	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BA	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BB	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BC	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BCT	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BG	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BM	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BT	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BU	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd
2BW	<i>Limanda limanda</i>	Common Dab	2017	Belgium (North sea)	(Vercauteren et al., 2018)	Nd	Nd

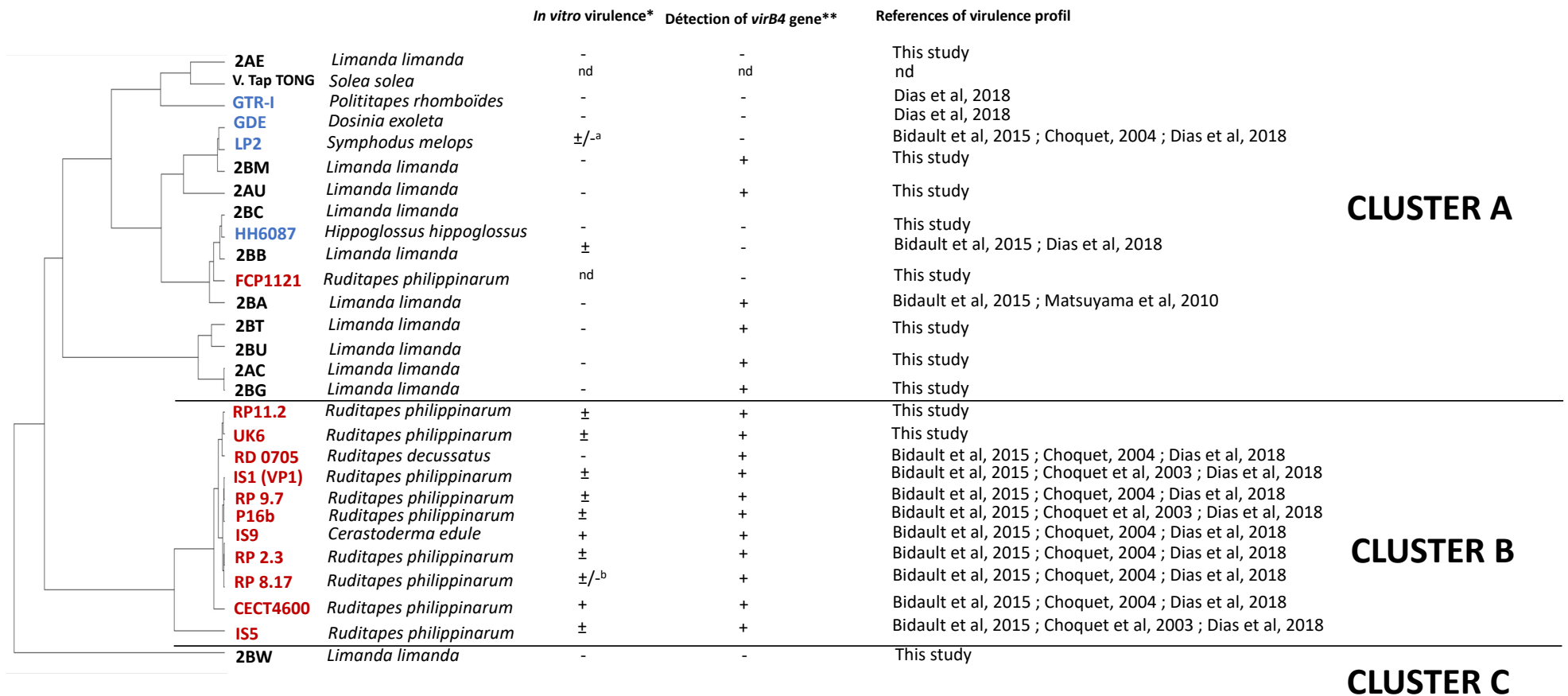


**Figure 1:** Effect of various strains of *V. tapetis* on non-adherent cell ratio. Incubation time: 3h. Results are presented by a mean ratio of non-adherent hemocytes (i.e. round hemocytes) in presence of bacteria to the number of non-adherent cells after incubation with FSSW. Letters depict significant differences (Pairwise Student test). Errorbar = Standard Deviation/  $\sqrt{n}$  ( $n = 3$  replicates)



**Figure 2:** MSP dendrogram of all *V. tapetis* isolates based on the complete spectra.

Peak intensity is represented using different colors ranging from blue (low intensity) to red (high intensity). In red : isolates that can induce BRD after injection in the pallial cavity. In blue : isolates that cannot induce BRD after injection in the pallial cavity. In black : isolates where no *in vivo* assay have been performed against the Manila clam



**Figure 3:** Dendrogram, based on the MALDI-TOF peak lists, of *Vibrio tapetis* strains isolated from bivalves and fish combined with *in vitro* virulence (hemocyte cytotoxicity assay) and presence of the *virB4* gene. In red : isolates that can induce BRD after injection

in the pallial cavity. In blue : isolates that cannot induce BRD after injection in the pallial cavity. In black : isolates where no *in vivo* assay have been performed against the Manila clam. \* (-): no virulence, ( $\pm$ ) intermediate virulence, (+): comparable virulence as the reference strain (CECT4600). \*\* (+): present; (-): absent.. nd: not determined. <sup>a</sup>: negative in Dias et al, 2018 but intermediate in Choquet et al, 2003. <sup>b</sup>: Intermediate in Chqquet, 2004 but negative in Dias et al, 2018

## Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence une technique permettant de discriminer les souches de *V. tapetis* ayant une probabilité plus importante d'être pathogènes vis à vis de la palourde japonaise. Basée sur l'analyse par MALDI-TOF MS, cette technique rapide et peu couteuse présente l'avantage de pouvoir comparer de nouveaux isolats de *V. tapetis* à la base de données déjà constituée des isolats décrits dans ce chapitre. De plus, nous avons démontré pour la première fois la présence du gène *virB4* dans des isolats issus de poissons, remettant alors en cause notre façon d'analyser la présence et la quantité de souches virulentes de *V. tapetis* vis à vis de la palourde japonaise. Cette étude permet ainsi de questionner l'efficacité de la technique q-PCR *virB4* dans la détection et la quantification de *V. tapetis* pathogènes de palourdes, dans un contexte de diversité grandissante des isolats de *V. tapetis*.





## AXE DE RECHERCHE II

### Étude de l'interaction hôte-pathogène

---

**Chapitre 3** : Quels sont les gènes exprimés chez l'hôte lors de l'infection ?

**Chapitre 4** : Quelles sont les modulations au sein de l'animal associées au pH et à la température lors de l'infection ?



## CHAPITRE 3

---

Quels sont les gènes exprimés lors de l'infection chez l'hôte ?

## Introduction

Dans le cadre de la MAB, l'étude des gènes régulés lors de l'infection a fait l'objet de trois principales études. Ces approches se sont basées sur différentes méthodes. Les études ayant utilisé la technique de SSH (Suppression Subtractive Hybridization) ont été réalisées à partir d'hémolymphe et de manteau de palourdes expérimentalement infectées par *V. tapetis* dans le but d'étudier la réparation coquillière (Jeffroy et al., 2013) ou sur de l'hémolymphe exposée à *V. tapetis* selon le protocole du test de virulence standardisé (Choquet et al., 2003) dans le but d'étudier l'influence du pathogène directement sur les cellules hématocytaires (Brulle et al., 2012). Elles ont respectivement mis en évidence la régulation de gènes impliqués dans le système immunitaire et la biominéralisation de la coquille pour la première et dans l'organisation du cytosquelette d'actine pour la seconde. Un troisième type d'étude basée sur la méthode oligoarrays (puces à ADN) s'est intéressée à des animaux prélevés dans l'environnement présentant des signes de MAB (Allam et al., 2014). Ces auteurs ont mis en évidence la régulation de gènes impliqués dans la reconnaissance du pathogène, l'apoptose ou encore la biominéralisation de la coquille chez les palourdes atteintes de MAB.

Bien que ces trois analyses aient permis de mieux comprendre les mécanismes liés à la MAB et la réparation coquillière chez la palourde japonaise, aucune donnée n'était disponible sur la régulation des gènes dans le compartiment extra-palléale, pourtant lieu de développement du pathogène et du dépôt brun caractéristique de la MAB.

Dans ce chapitre 3, nous avons réalisé une analyse transcriptomique de fluides extra-palléaux (FEP) provenant de palourdes expérimentalement infectées par *V. tapetis* par injection dans la cavité extra-palléale. L'objectif de ces recherches est d'identifier les modifications d'expression de gènes mises en jeu lors de l'infection de la palourde japonaise dans les premières étapes du développement de la MAB avec un échantillonnage à 7 jours post-infection, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à la virulence de *V. tapetis*. Les infections ont été réalisées dans le cadre du projet VIBALGO en collaboration avec l'Université de Rio de Janeiro (Brésil).

# Une analyse transcriptomique de fluides extra-palléaux révèle des altérations du système immunitaire et du cytosquelette dans la première semaine de la MAB

## Résumé de l'article

La maladie de l'anneau brun est une infection causée par la bactérie *Vibrio tapetis* sur la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Le processus d'infection, dans les fluides extra-palléaux (FEPs) des palourdes, implique une altération des fonctions immunitaires, en particulier des hémocytes qui sont les cellules responsables de la phagocytose. La désorganisation du cytosquelette d'actine des palourdes infectées est en partie responsable de cette altération. Cette étude est la première approche transcriptomique basée sur la récolte de fluides extra-palléaux à partir d'animaux vivants, infectés expérimentalement par *V. tapetis*. Nous avons effectué une analyse différentielle de l'expression de gènes dans les FEPs après deux traitements expérimentaux (palourdes saines contre infectées par *V. tapetis*), et avons montré la dérégulation de 135 gènes. Chez les palourdes infectées, une régulation à la baisse des transcrits impliqués dans les fonctions immunitaires (activité lysosomale et voies du complément et des lectines) a été observée pendant l'infection. Nous avons également montré une dérégulation des transcrits codant des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette de l'actine comme une surexpression de la  $\beta$ 12-Thymosine (qui est une protéine de séquestration de l'actine) ou une régulation négative des protéines qui interagissent étroitement avec les *capping proteins* comme la Coactosine, qui contrent l'action des *capping proteins*, ou la Profiline. Nous avons validé ces résultats transcriptomiques par des analyses physiologiques cellulaires qui ont montré une diminution des quantités de lysosomes et la désorganisation du cytosquelette d'actine dans les hémocytes infectés.

Article accepté et publié dans « Fish and Shellfish Immunology »

## Transcriptomic analysis of clam Extra Pallial Fluids reveals immunity and cytoskeleton alterations in the first week of Brown Ring Disease development

Alexandra Rahmani<sup>1\*</sup>, Erwan Corre<sup>2</sup>, Gaëlle Richard<sup>1</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Christophe Lambert<sup>1</sup>, Louisi Oliveira<sup>3</sup>, Cristiane Thompson<sup>3</sup>, Fabiano Thompson<sup>3</sup>, Vianney Pichereau<sup>1\*†</sup>, Christine Paillard<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

<sup>2</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS, FR2424, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France

<sup>3</sup>Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

\* Corresponding authors, [vianney.pichereau@univ-brest.fr](mailto:vianney.pichereau@univ-brest.fr) ; [alexandra.rahmani@univ-brest.fr](mailto:alexandra.rahmani@univ-brest.fr) ; [christine.paillard@univ-brest.fr](mailto:christine.paillard@univ-brest.fr)

†These authors contributed equally

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.025>

## Transcriptomic analysis of clam Extrapallial Fluids reveals immunity and cytoskeleton alterations in the first week of Brown Ring Disease development

Alexandra Rahmani<sup>1\*</sup>, Erwan Corre<sup>2</sup>, Gaëlle Richard<sup>1</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Christophe Lambert<sup>1</sup>, Louisi Oliveira<sup>3</sup>, Cristiane Thompson<sup>3</sup>, Fabiano Thompson<sup>3</sup>, Vianney Pichereau<sup>1\*†</sup>, Christine Paillard<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS, FR2424, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France

<sup>3</sup> Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

\* Corresponding authors, vianney.pichereau@univ-brest.fr ; alexandra.rahmani@univ-brest.fr ; christine.paillard@univ-brest.fr

†These authors contributed equally

### ABSTRACT

The Brown Ring Disease is an infection caused by the bacterium *Vibrio tapetis* on the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. The process of infection, in the extrapallial fluids (EPFs) of clams, involves alteration of immune functions, in particular on hemocytes which are the cells responsible of phagocytosis. Disorganization of the actin-cytoskeleton in infected clams is a part of what leads to this alteration. This study is the first transcriptomic approach based on collection of extrapallial fluids on living animals experimentally infected by *V. tapetis*. We performed differential gene expression analysis of EPFs in two experimental treatments (healthy- against infected- clams by *V. tapetis*), and showed the deregulation of 135 genes. In infected clams, a downregulation



of transcripts implied in immune functions (lysosomal activity and complement- and lectin-dependent PRR pathways) was observed during infection. We also showed a deregulation of transcripts encoding proteins involved in the actin cytoskeleton organization such as an overexpression of  $\beta$ 12-Thymosin (which is an actin sequestration protein) or a downregulation of proteins that closely interact with capping proteins such as Coactosin, that counteract action of capping proteins, or Profilin. We validated these transcriptomic results by cellular physiological analyses that showed a decrease of the lysosome amounts and the disorganization of actin cytoskeleton in infected hemocytes.

**Keywords:** Brown Ring Disease, *V. tapetis*, *R. philippinarum*, Hemocytes, Actin cytoskeleton,  $\beta$ -thymosin, Coactosin, Resting cells

### Abbreviations

ABP: Actin Binding Protein

BRD: Brown Ring Disease

EPF: Extrapallial Fluids

FSW: Filter Sterilized Seawater

## 1. INTRODUCTION

*Ruditapes philippinarum*, the Manila clam, has been imported in Europe from Indo-pacific coasts in the early 70's. Ten years later, a disease causing a brown organic deposit at the inner face of the shell, between the pallial line and the edge of the shell, spread mostly all over Northern coasts of Europe, causing mass mortalities to this species [1,2]. This infection has been called the Brown Ring Disease (BRD, according to its macroscopic manifestations) and is due to the bacterium *Vibrio tapetis* [3,4].

*V. tapetis* is a Gram-negative bacillus that acts, in most of cases, as an external microparasite, mainly in cold waters (optimal infection temperature of 14°C [5]) by spreading into the extrapallial fluids (EPF) of the Manila clam. Despite the fact that growth declines and shell deformations are frequently observed in this disease, tissue's infections are rare and only happen in case of pre-existing tissues lesions, then causing the death of animals. Nevertheless, BRD is a microparasitic infection which dynamics does not imply the death of animals [4,6].

A particular symptom of BRD is the rounding of hemocytes in infected clams, thus revealing damages to the clam's immune system [7,8]. Indeed, hemocytes are key effectors of the immune defenses of the clam that eliminate pathogens by phagocytosis [9]. In a normal phagocytosis process, hemocytes spread their pseudopods which encapsulate and internalize bacteria and, by a phagosome/lysosome fusion, destroy the pathogen. During BRD infection, it was shown that *V. tapetis* causes a disorganization of

the hemocyte actin cytoskeleton, resulting in the loss of hemocytes pseudopods (and thus, the rounding of cells) thus reducing its phagocytosis capacity [10]. *V. tapetis* is then able to multiply into hemocytes, finally resulting in cell membrane disruption. Bacteria can then spread into clams before being released by pseudo feces into the environment (sediments) where they can infect other clams [7,11–13].

This study is the first transcriptomic approach based on collection of extrapallial fluids (EPFs) on living animals experimentally infected by *V. tapetis*. This study led to the identification of a set of transcripts regulated during BRD infection, combined with physiological experiments performed in order to check the validity of some of the major interpretations raised from the differential expression analysis. This study gave new insights to understand the pathogenicity of *V. tapetis* to Manila clams.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Clams *in vivo* infection, RNA extraction and sequencing

Animals and experimental design are fully described in [14]. Two years-old clams were harvested in the Marennes-Oleron Bay (Charente Maritime, France) on May 5th, 2014. A first visual health diagnostic was performed on 50 clams *in situ* and no BRD clinical signs were observed. Clams were then transferred to Ifremer facilities in Plouzané (Finistère, France) and held in a 6-day quarantine with a chloramphenicol (8 mg.L<sup>-1</sup>) treatment to avoid local contamination. After quarantine, animals were randomly divided and

maintained in trays placed in eighteen 100 L-tanks equipped with air-lift systems (100 clams per tank). Water temperature was maintained at 13°C during the whole experiment so that infection by *V. tapetis* was favored [5]. Tanks were continuously supplied with filter sterilized seawater (FSW, filtered at 1 µm and UV-sterilized) at a renewal rate of 50% per day and cleaned every two days. Clams were fed *ad libitum* with T-iso. Manila clams, *R. philippinarum*, were injected in the extrapallial cavity with 100 µL of *V. tapetis* CECT4600 suspension at the concentration of 10<sup>7</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> (Infected, 900 clams) or by Filter Sterilized Seawater (FSW, Control, 900 clams) as described in Le Bris et al [15]. At 7 days post injection, EPFs of infected and control clams were harvested and total RNAs were extracted with TRI reagent® according to the procedure manufacturer (Sigma-Aldrich®). Presence or absence of the Brown Ring Disease have been diagnosed according to the standardized methodology established by Paillard et al [16] based on the presence and localization of brown deposit in clam shells. We performed this diagnosis by an image analysis method using a 50-mm CANON macroscopic lens and analyzed using Visilog 6.6 image analysis software, according to image analysis methodology already performed [14,16]. This method allows to visualize the shell and to analyze the presence of a brown deposit (BRD positive diagnosis) with an image analysis software. BRD was diagnosed in all infected clams whereas no BRD was found in control animals. As ribosomal RNA (rRNA) is the most abundant component in total RNA, while not being informative in this kind of RNAseq strategy, we performed two rRNA depletion steps, the

first one targeting bacterial rRNA and the second one targeting eukaryotic ones (by using the Ribo-Zero rRNA Removal Kits, bacteria and Human/Mouse/Rat, respectively, from Illumina). The RNAs from seven clams, 3 healthy and 4 infected, were subjected to cDNA libraries creation according to standard Illumina procedures (TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit). All the libraries were sequenced, by Illumina Miseq PE300, at the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. Other control and infected clams have been further analyzed for other questions [14].

## 2.2. Transcriptomic analysis

Raw data analysis and differential expression evaluation were carried out using the ABIMS Galaxy platform, Station Biologique de Roscoff, CNRS / Sorbonne Université, France (<http://galaxy.sb-roscoff.fr>, January 2019).

Reads have been trimmed using AdaptorRemoval v2 [17], Trimmomatic v0.36.3 [18] and Prinseq v0.20.4 [19] in order to remove read adaptors, low quality sequences and poly(A) tails. Persistent rRNA were removed with SortMeRNA v2.1b.4 [20]. For the differential analysis, all the reads were mapped to a dataset of 61 747 transcripts obtained from a combination of *R. philippinarum*'s stimulated hemocytes ESTs (expressed sequences tag) library [21], from *R. philippinarum*'s ESTs deposited in NCBI EST database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>) and sequences deposited in the Ruphibase database (<http://compgen.bio.unipd.it/ruphibase/>). Transcripts abundances were

estimated by using the "Align and Build expression matrix" pipeline (mapping with bowtie + reads estimation with RSEM) of the Trinity suite v2.4.0.2 [22]. The statistical analysis of differentially expressed transcripts were done using the "Differential expression analysis" pipeline of Trinity suite v2.4.0 (using DESeq2) and "Extract and cluster differentially expressed transcripts" pipeline of Trinity suite v2.4.0 [22]. We have set up parameters to exclude differential expression with a LogFoldChange between -2 and 2. Transcripts were considered as significantly differentially expressed if the p-value adjusted by FDR (false discovery rate) is  $<10^{-3}$ . The identified deregulated transcripts were subjected to blast2GO for re-annotation, including blastX vs the NCBI nr, refseq and swissprot (2018 version) non redundant databases, interpro, GO mapping and GO annotation, all with standard parameters. All the annotations and functions were carefully manually checked. The sequencing data have been made available at the European Nucleotide Archive (project PRJEB23385). The analysis data are given in Table S1.

### 2.3. Clams *in vitro* infection : bacterial exposure

Animals used in this study were Manila clams from the SATMAR shellfish aquaculture site in Marennes (Charente-Maritime, France). The clam pool was acclimatized in oxygenated seawater using a bubbler at 14°C. Hemolymph was harvested directly from the adductor muscle. Each hemolymph was sampled individually and the quality of the hemocytes present in this fluid was checked by observation under the microscope (presence of

pseudopods, few round-shaped hemocytes). Good quality hemolymph samples were pooled and the hemocytes enumerated by using a Malassez cell. For exposure assays, hemolymph was exposed to a bacterial suspension (in FSSW) of *V. tapetis* CECT4600, at a 25/1 : bacteria/hemocyte ratio. Hemocytes exposure were performed in at least 3 replicates and two independent experiments for each condition tested. Briefly, 100 µL of hemolymph was added in 24-well plates. After a few minutes, in order to let hemocytes attach on the bottom of the plate, 100 µL of bacterial suspension was added for the exposed samples, and 100 µL of FSSW for the controls.

#### 2.3.1. F-actin visualization by microscopy

To visualize F-actin in control and infected hemocytes, we used the fluorescent probe Rhodamine Phalloidin (Invitrogen). Exposure assays were performed as described above. After 3 hours of challenge, we collected the supernatant and added 30 µL of Triton X-100 0.1% for 15 minutes. Triton permeabilizes cells, thus allowing probes to enter the cell. 2 µL of Rhodamine-phalloidin (Stock solution dissolved in 1.5 mL methanol) was then added to each sample (hemolymph non exposed and exposed to *V. tapetis*) which were stained for 20 min, on ice, without light. Epifluorescence microscopy was then performed by using a ZEISS AXIO observer Z1 inverted microscope with a wavelength of excitation BP (band pass) 550/25 nm, Beam splitter 570 nm and of emission BP 605/70 nm. Cells were observed both in red epifluorescence and in bright field.

### 2.3.2. LysoTracker assay

The LysoTracker® probes (Molecular Probes ®) are fluorescent acidotropic probes for labeling and tracking acidic organelles in live cells, according to the manufacturer definition. We have developed and tested a method to characterize the amount of acidic organelles on hemocytes exposed to *V. tapetis* or FSSW for control. LysoTracker assay is performed during the *in vitro* bacterial exposure assay based on the rounding of hemocytes caused by *V. tapetis* previously developed by Choquet et al. [7]. Our protocol allows to perform both tests on the same sample, and then to correlate the rounding phenotype to the cell content in acidic organelles.

Hemocytes exposure were performed as described above. The 24 wells plates were incubated 1 hour at 18°C before addition of 4 µL of 50 µM LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen, emission from 550 to 700nm, final concentration 1 µM) to each well. The 24 wells plates were then let 2 hours more, in dark conditions at 18°C, to reach the 3 hours exposition. The contents of the wells were then transferred in 5-mL cytometry polystyrene tubes (Falcon®, BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

First, flow cytometry analyses were performed by using a BD FACSVerser flow cytometer using its blue laser (488 nm) as an excitation source. The mean red fluorescence level (LysoTracker fluorescence linked to acidic organelles) of the selected hemocytes was measured using the PerCP-Cy5.5 detector of the flow cytometer (700/54 nm).



Second, 2  $\mu$ L of a 100X dilution in ultra pure water of a commercial solution of SYBR-Green® I nucleic acid gel stain 10 000X in DMSO (Life Technology, USA) were added in each cytometry tube for 10 min, at room temperature, in dark condition, before a second flow cytometry analysis. Hemocytes were selected according to their green fluorescence (SYBR-Green, FITC detector of the flow cytometer 527/32 nm). Addition of SYBR-Green also allowed to quantify the number of non-adherent hemocytes in our sample.

This second flow cytometry analyses of red fluorescence were performed using a red laser (640 nm) as an excitation source and fluorescence was measured using the APC detector of the flow cytometer (660/10 nm). This detector was selected instead of the PerCP-Cy5.5 detector (700/54 nm) to overcome a possible SYBR-Green fluorescence overlapping. Results are expressed in mean red fluorescence level per hemocyte in arbitrary units (UA).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Transcriptomic results: differential expression analysis

The total number of reads was 29.3 million, with an average length of 262.5 bp, for a total coverage of 5.62X. Differential expression analysis revealed 135 differentially expressed genes, which 90 and 45 appeared down- and up- regulated, respectively, in the EPF treatment (*V. tapetis* infected clams), as compared to the control treatment. We

could obtain an annotation, and functional information, for 118 of them, which were classified according to their probable cellular role (Table S1, Table 1). In all, 85% of these transcripts belonged to four functional categories, ie. translation (34 transcripts), cytoskeleton (27), immune response (24) and metabolism (15) (Table 1). The deregulation of these transcripts in clams EPFs appears clearly related to the infection by *V. tapetis*. In the following section, we discuss the pathogen induced modulation of the immune response, which is a major point to better understand the host-pathogen interactions. Table 2 summarizes all the differentially expressed transcripts involved in cytoskeleton or immunity. It is noteworthy that the whole reads were also mapped against the recently released genome of *V. tapetis* CECT4600 [23], but no significant correspondence has been found with the pathogen.

Table 1: Number and functions of the transcripts differentially expressed in clams EPFs during *V. tapetis* infection

FUNCTIONS	Total number of transcripts	DOWN REGULATED IN INFECTED CLAMS	UP REGULATED IN INFECTED CLAMS
Translation	34	23	11
Cytoskeleton	27	18	9
Immunity	24	18	6
Metabolism	15	9	6
Proteins processing	6	4	2
Unknown / Hypothetical / Other	29	18	11

## AXE DE RECHERCHE II : Étude de l'interaction hôte pathogène – Chapitre 3

Table 2: Transcripts significantly regulated during infection by *V. tapetis* and implied in the clam immune system or in actin cytoskeleton organization. FDR : false discovery rate, LogFC : Log Fold-Change.

DOWN REGULATED IN INFECTED CLAMS			UP REGULATED IN INFECTED CLAMS		
Seq. Description	logFC	FDR	Seq. Description	logFC	FDR
<b>Immune system</b>			<b>Immune system</b>		
cathepsin K-like	-10.52	1.25E-05	complement C1q-like protein 4	11.02	4.29E-04
cathepsin K	-10.04	4.87E-04	cyclophilin-like protein	9.45	3.93E-04
cathepsin I	-9.93	4.16E-04	lysozyme	9.16	4.87E-04
cathepsin L1	-9.81	3.31E-04	cyclophilin A	7.60	8.56E-05
cathepsin I	-9.77	2.27E-11	dermatopontin	6.29	8.88E-04
saposin B domain-containing protein	-9.42	1.79E-11	cyclophilin-like protein	4.91	9.48E-04
saposin B domain-containing protein precursor	-8.74	2.95E-09			
cell death-inducing p53-target protein 1	-8.46	2.95E-09			
cathepsin S	-8.22	2.50E-05			
ferric-chelate reductase 1	-8.08	4.99E-04			
CD63 antigen	-7.51	1.44E-04			
defense protein 3-like	-7.30	5.66E-04			
complement C1q-like protein 4	-7.24	4.50E-05			
galectin-3 isoform 1	-7.20	6.22E-04			
c1q domain containing protein 1q13	-6.89	1.83E-06			
complement c1q TNF-related protein 3-like isoform 2	-6.34	3.82E-07			
complement c1q-like protein 2 precursor	-5.76	2.63E-04			
saposin B domain-containing protein	-5.04	1.25E-05			
<b>Actin cytoskeleton organization</b>			<b>Actin cytoskeleton organization</b>		
actin	-11.30	1.49E-04	actin	12.46	7.50E-05
actin	-11.21	8.94E-05	cytoplasmic actin	10.82	1.46E-04
actin	-10.49	5.02E-05	actin	10.82	1.49E-04
cytoplasmic actin	-10.18	4.81E-08	kinesin	10.33	4.34E-08
myophilin	-10.12	1.98E-05	actin	8.84	9.99E-04
cytoplasmic actin	-10.09	5.50E-05	thymosin beta-12	8.76	4.93E-04
coactosin-like protein	-9.73	2.07E-05	actin	8.57	6.14E-04
beta-actin	-8.86	1.27E-04	cytoplasmic actin	8.34	6.65E-04
cytoplasmic actin	-8.30	2.95E-09	myosin light chain	5.57	1.98E-05
actin 5c	-7.96	4.99E-04			
cytoplasmic actin	-7.45	4.99E-04			
cytoplasmic actin	-7.37	7.39E-04			
coactosin-like protein	-6.94	4.93E-04			
cytoplasmic actin	-6.84	2.82E-07			
cysteine and glycine-rich protein 3	-6.80	5.97E-04			
profilin	-6.63	9.08E-04			
cysteine and glycine-rich protein 3	-6.63	8.28E-04			
dynein light chain, cytoplasmic	-6.52	9.99E-04			

### 3.2. Immune response

Extrapallial fluids (EPFs) play an essential role in the biomineralization of the shell of bivalves. Given the particular etiology and symptoms of BRD, this compartment, containing numerous hemocytes [24], is particularly interesting to better understand both the infection process and how the clam's hemocytes fight against it. For this reason, in this study, *V. tapetis* infection was carried out directly inside the EPFs passing through the periostracal lamina barrier to accelerate the immune response, particularly in EPFs. A transcript encoding lysozyme was found to be upregulated in response to *V. tapetis* infection. In previous studies, lysozyme activities in cell lysates of extrapallial fluids were significantly higher 7 days after *V. tapetis* inoculation into the pallial cavity, as compared to control ones [24]. The antibacterial protein lysozyme, which is circulating in body fluids such as hemolymph and EPFs, is an important line of defense of the animal against bacterial pathogens because of their bacteriolytic properties [5,25].

Only five transcripts directly related to immunity were actually upregulated during *V. tapetis* infection. Beside the lysozyme, three genes belonging to the cyclophilin family, as well as dermatopontin, were upregulated (Table 2). Dermatopontin is a tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) that primarily acts as a structural component of the extracellular matrix. However, this protein was shown to modulate TGF- $\beta$  activity as well

as cell-cell aggregation during infection in invertebrates [26]. Dermatopontin was previously shown to be upregulated in the EPFs and hemolymph of clams during BRD [27]. Not less than 3 cyclophilin transcripts appeared upregulated following *V. tapetis* infection. Cyclophilin was shown to be transcriptionally upregulated during infection in the shrimp [28]. In the clam *R. philippinarum*, Chen et al. [29] previously showed that two cyclophilin genes were differentially expressed in hemolymph when exposed to pathogenic bacteria.

The cellular component of the innate immune system also includes more specific pathways that involve the recognition of specific Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) by pattern recognition receptor (PRRs). Most of these receptors are membrane proteins (eg. Toll like receptors), but they also include soluble proteins (eg. SAP, CRP) that are activated by the C1q proteins of the complement system [30–32]. When the pathogen is recognized by either C1q proteins or Mannose Binding Proteins (MBP), these proteins activate the complement pathway through the “classical pathway” or the “lectin pathway” resulting in phagocytosis with the formation of a phagosome. [30]. Pathogens are then degraded after the fusion of the phagosome and the lysosome by the action of low pH, acid hydrolases and by reactive oxygen species produced during the pathogen-induced oxidative burst [33].

In this study, 18 out of the 24 deregulated genes potentially involved in clams' immune defenses were downregulated. Nine of these transcripts encoded proteins clearly related to lysosome activity (ie., cathepsins, saposins), four were C1q complement proteins, while others encoded CD63 (a cell death-inducing P53-target protein), galectin 3, as well as two proteins annotated as Defense Proteins, that should be related to ferric iron chelation/reduction. Different transcripts of C1q proteins were also reported in the clam *R. decussatus* infected with *Perkinsus olseni* [34], and in *R. philippinarum* infected with *V. tapetis* [27].

Pathogens have developed many strategies to bypass the immune defenses of their hosts. In the particular case of BRD, it has been shown that the immune system of clams is not able to eliminate *V. tapetis* during infection, even if very high phagocytic rates of *V. tapetis* were measured when the pathogen is injected into the extrapallial space [35]. However, during phagocytosis by hemocytes, *V. tapetis* could persist and multiply within hemocytes and was also able to inhibit the phagosome-lysosome fusion, thus preventing its destruction [6]. The repression of nine genes encoding saposins (2) and cathepsins (7) could reflect the ability of the bacteria to inactivate the lysosomal functioning. Indeed, Cathepsins K, L, L1 and S are cysteine proteases [36][37] that belong to lysosomal acid hydrolases, that are normally released during the phagosome-lysosome fusion. Saposins are small lysosomal proteins that participate (stimulate/activate) to the hydrolysis of

sphingolipids and many other lipids [38]. Interestingly, the CD63 antigen belongs to the family of lysosomal associated proteins (LAMPs) and is also considered as an indicator of the phagosome-lysosome fusion [39]. In all, these results strongly suggest that lysosomal function plays a key role in the development of BRD.

In addition to the predominant role of lysosome inactivation, the repression of genes encoding three complement C1q/tumor necrosis factor proteins, and of the galectin 3, might suggest an important role for the complement- and lectin-dependent PRR pathways [40,41]. The downregulation of a cell death-inducing P53-target protein, which is known to regulate the TNF-alpha-mediated apoptosis, might also suggest a role for apoptotic processes during the infectious process [42].

Finally, the downregulation of a protein annotated as 'defense protein', that contains a ferric-chelate reductase domain, could reflect an important role for iron acquisition during the infectious process. Interestingly, the concomitant downregulation of ferritin, which is implied in iron storage [43] and reduction of reactive oxygen species (ROS) accumulation [44], could also be related to this, allowing then more availability of iron for the pathogen.

### 3.3. Ribosomal proteins

We also identified deregulated genes involved in functions other than immunity, but whose deregulation could strongly influence the host's immune response. This is

especially the case for cytoskeleton reorganization, thoroughly discussed thereafter, but also for translation proteins, which is the most modified category and, in other ways, for genes encoding proteins which function was categorized in metabolism and protein processes (Table 1).

A major reorganization of the translational apparatus may have occurred in response to *V. tapetis* infection as a result of gene expression reprogramming (32 ribosomal proteins and 2 translation elongation factors). Eleven genes were induced, while 23 genes had their expression reduced (Table 1). Ribosome inactivation resemble one of the major symptoms of the so-called 'metabolic depression' observed in many environmental stress responses in several marine mollusks [45,46]. However, it is noteworthy that the expression of several ribosomal proteins was increased during infection (S14, S21, S30, L21, SA, P0), and others appeared both repressed and induced (L3, L8, L27). For these last proteins, we presume that the protein exists as different alternate isoforms (with different regulations).

It is noteworthy that ribosomal proteins are increasingly studied for their alternate roles, ie. independent of their ribosomal function [45]. More specifically, it should be noted that the role of ribosomal proteins in the regulation of the innate immune response has been well documented in recent years [45], especially the major role of the ribosomal protein L13A in the GAIT complex, that selectively modulates the translation of some genes involved in the interferon- $\gamma$ -mediated inflammatory response [47]. However, many other



examples have been reported. For example, the ribosomal proteins S14 and L8, both found upregulated in our study, would be able to activate P53 and the major regulator NF- $\kappa$ B, respectively [48,49]. It would be particularly interesting to perform new focused investigations to better understand the role of the translation apparatus in the development of the BRD.

#### 3.4. Actin cytoskeleton organization

Actin filaments (F-actin) belong to the cell cytoskeleton and are dynamically polymerized and depolymerized from monomers of actin (G-actin) into the cell to enable cellular activities such as locomotion, exocytosis or phagocytosis. The actin cytoskeleton is also responsible for the cell shape. In this study, we showed that at least 27 transcripts involved in actin cytoskeleton organization were differentially expressed during infection, among which 9 were induced while 18 had their expression reduced. Genes downregulated during infection are mainly involved in actin filament stabilization such as myophilin, a member of calponin protein family [50,51], cysteine glycine rich protein (CSRP1) [52,53] and dynein light chain [54]. Furthermore, our results showed that expression regulation during infection also affected transcripts involved in cell motility such as up regulation of the Myosin light chain, which role in hemocytes phagocytosis in shrimp was already described [55].

Two transcripts downregulated during BRD might give additional information on the molecular mechanisms related to infection. The first one encodes a Coactosin like protein that counteracts the action of capping proteins that reduce or slow down actin polymerization [56]. The second one encodes Profilin, an 'actin binding protein' (ABP) which is known to interact with others ABPs such as  $\beta$ 4-thymosin [57]. The role of profilin in actin polymerization is quite complex. In the presence of molecules that stimulate actin assembly, profilin displaces  $\beta$ 4-thymosin, binds to G-actin and promotes actin polymerization [58]. Furthermore, profilin regulates the effects of capping proteins. Hopmann and Miller [59] demonstrated that balanced activities of capping protein and profilin are essential in the regulation of actin dynamics and organization in *Drosophila*. Capping proteins can be associated, in resting cells, with actin filament by electrostatic interactions on the barbed (+) end. By changing the conformation of the capping protein during this interaction, the + end is no longer available for G-actin and polymerization is then inhibited [60,61].

In this study, we also highlighted an overexpression of  $\beta$ 12 thymosin transcripts during infection by *V. tapetis*.  $\beta$ 12-thymosin belongs to the ABPs family. Fifteen variants of  $\beta$ -thymosin proteins have been described in many vertebrates and invertebrates, but not on prokaryotes and yeasts. They are able to bind ATP-G-actin complex (1:1), the monomeric form of actin, and stabilized it. This actin-monomer sequestration prevents

them from polymerization by changes in actin conformation [60,62]. Many factors are actually involved in the dynamics of actin in eukaryotic cells, such as e.g. the ATP concentration or the Critical Concentration (Cc) of G-actin monomers.

### 3.5. Physiological verification of differential expression analysis

Transcriptomics analysis is a very powerful tool to give, in a single experiment, a broad overview of the multiple processes potentially involved in a biological response. In our study, we showed the deregulation of many transcripts encoding proteins involved in immunity and in the dynamics of actin cytoskeleton, thus suggesting an important role for these biological processes during infection of *R. philippinarum* by *V. tapetis*. Therefore, we performed additional experiments in order to check the validity of some of the major interpretations raised from the differential expression analysis.

First, RNA-seq data showed a downregulation of many transcripts encoding proteins involved in the lysosomal activity, thus suggesting a crucial of related biological process during infection. We thus aimed at checking the actual effect of *V. tapetis* exposure on the lysosomal activity of *R. philippinarum* hemocytes, by using the LysoTracker assay, which is commonly recognized as an efficient proxy of the amount and activity of acidic organelles within eukaryotic cells.

As previously described [7,8], we first confirmed that the exposition to *V. tapetis* CECT4600 induces a loss of hemocytes adherence as compared to the control (Fig. 1), and results in a rounded phenotype. In these experimental conditions, we observed that the loss of adherence is accompanied by a two-fold decrease of acidic organelles in hemocytes exposed to *V. tapetis* CECT4600 as compared to the control (Fig. 2). As a consequence, we hypothesize that the general depletion of lysosomal transcripts observed in the RNAseq experiment should result from the decreased number of lysosomes in EPFs-derived hemocyte cells.

Second, as many transcripts involved in actin-cytoskeleton dynamics were deregulated, we aimed at observing the F-actin filaments in hemolymph that had been exposed or not to *V. tapetis* (Fig. 3), by performing a phalloidin staining experiment. Results presented in the Fig. 3 clearly show the loss of pseudopods and rounding of hemocytes after *V. tapetis* exposure (Fig. 3C and 3D). In these conditions, it is noteworthy that the F-actin filaments were clearly mainly located at the periphery of cells in healthy hemocytes (Fig. 3B), while phalloidin staining revealed a diffuse localization of F-actin in cells exposed to *V. tapetis* (Fig. 3D). These results are consistent with previous works showing F-actin network disorganization in diseased hemocytes in another clam species, *Mya arenaria* [63], as well as with the infection model developed by Paillard [6] considering that *V.*

*tapetis* induces a loss of phagosome-lysosome formation during infection of the Manila clam *R. philippinarum*.

### 3.6. Hypothetical model of clam-*Vibrio tapetis* interaction

We took advantage of our data to propose an hypothetical model that encompasses bacterium recognition (through microbe-associated molecular pattern [MAMP]) and some relevant metabolic processes overrepresented in the transcriptomic profile of clams EPFs in response to *V. tapetis*. Altogether, these results are consistent with the knowledge we have about the influence of the BRD on actin cytoskeleton [13]. Indeed, in the case of *R. philippinarum*'s infection by *V. tapetis*, the bacterium is phagocytosed into clam's hemocytes which leads to hemocytes actin-cytoskeleton disorganization. The result of this perturbation is the loss of pseudopods (ie. rounding phenotype) and then the loss of hemocytes adhesion properties. This consequence of *V. tapetis* infection on clams is commonly used to measure strains virulence by *in vitro* characterization [7].

The fact that transcripts such as coactosin or profilin, that interact with either capping proteins and/or ABPs, are downregulated during infection, let us to formulate different hypothesis. Considering our results and the knowledge on actin dynamics, we made the hypothesis that infection might trigger a deregulation of capping protein which would lead hemocytes to be blocked in a "resting cell state". According to our model, capping proteins would block the + end polymerization in infected hemocytes, then increasing

the levels of free G-actin [60]. In this case, Mannherz and Hannappel [60] described that in case of resting cells,  $\beta$ -thymosins massively bound to free G-actin, thus decreasing its concentrations, thus stalling net polymerization [60]. On the other hand, they also report that during this process, profilin concentration is low and most of it is inactivated. This hypothesis would need additional experiments but might explain the disorganization of the F-actin network observed during infection that gives to hemocytes this 'rounded' phenotype after challenge with *V. tapetis*.

Figure 4A to 4C represent the conceptual model of the Manila clam EPF infection by *V. tapetis* in order to understand functions and interactions between the proteins that were deregulated in our experiments, and their place in the immune response to infection and actin dynamics polymerization process. Figure 4A represent the immune response of healthy hemocytes to foreign bacteria. Foreign bacteria are opsonized and phagocytized by hemocyte. After fusion between the phagosome and the lysosome, bacteria are destroyed. Figure 4B represents early stage of hemocytes infection by *V. tapetis* and thus downregulation of transcripts related to pathogen recognition (C1q proteins and lectin) or to decrease of lysosomal activity as demonstrated in this study. Figure 4C represent the deregulation of the immune system in hemocytes infected by *V. tapetis* inducing a rounding phenotype related to infection with absence of pseudopods formation.

#### 4. CONCLUSION

This study presents the first transcriptomic approach on EPFs of experimentally infected clams. It brought novel insights on the interaction between *V. tapetis* and clam by exploring *in vivo* gene expression during the infection. This study revealed a downregulation of the immune response, especially the complement pathway and lysosomal activity, the disorganization of the actin cytoskeleton, accompanied by ribosomal genes deregulation.

## FUNDINGS

This project received grants from the H2020 European project "VIVALDI" (grant agreement N°678589), CNRS, France INSU EC2CO-MicrobiEn "MICROPAL", CAPES-COFECUB (MICROBIV) and PVE Brésil. This work was also supported by the 'Université de Bretagne Occidentale' (UBO, France), and the "investment for the future" programs LabexMER (ANR-10-LABX-19) and ISblue (ANR-17-EURE-0015).

## ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Fabien Fonteneau (EARL Les Claires de Bonsonge, Marennes, France) and Jean François Auvray (SATMAR Marennes, France) for providing the clams. We thank colleagues from the Federal University of Rio De Janeiro, Brazil who welcomed us (CP, VP, AB, GR) in Rio. We thank N. Le Goïc, F. Nunez, H. Hégaret, C. Fabioux, I. Paul-Pont, F. Le Grand, F. Riera, AL. Cassone, P. Le Souchu, A. Muir, E. Harney, Y. Epelboin, M. Fuhrmann, M. Provost, L. Frère, F. Boullot, B. Dubief, M. Czamanski, R. Morvezen, V. Foulon, M. Protat, C. Quéré, and A. Huvet for their help for animals conditioning, injections and samplings.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CP, FT and VP acquired funds and coordinated the study. GR, AB and CP designed and performed the experimental infection. AB performed RNA extractions and libraries



preparations, with the advices of LO. LO and FT performed DNA sequencing. AR and EC performed bioinformatics analysis, with inputs from VP. AR and CL performed the flow cytometry analyses. AR, VP and CP wrote the article (the original draft was written by AR). The article was carefully reviewed by other co-authors, who all approved the final version.

REFERENCES

- [1] C. Paillard, Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum*, 1992.
- [2] C. Paillard, L. Percelay, M. Le Pennec, D. Le Picard, Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve), Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Série 3, Sciences de La Vie. 309 (1989) 235–241.
- [3] P. Maes, C. Paillard, Effect du *Vibrio P1*, pathogene de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves, in: Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Brest (France), 9 Nov 1990, 1992.
- [4] J.J. Borrego, D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M.T. Garcia, A. Ventosa, *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 46 (1996) 480–484.
- [5] C. Paillard, B. Allam, R. Oubella, Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*, Diseases of Aquatic Organisms. 59 (2004) 249–262.
- [6] Paillard, Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves, Habilitation à Diriger Des Recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest. (2004).
- [7] G. Choquet, P. Soudant, C. Lambert, J.-L. Nicolas, C. Paillard, Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*, Diseases of Aquatic Organisms. 57 (2003) 109–116.
- [8] F. Jeffroy, C. Paillard, Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*, Fish & Shellfish Immunology. 31 (2011) 1137–1141. doi:10.1016/j.fsi.2011.10.008.
- [9] A.F. Rowley, A. Powell, Invertebrate Immune Systems-Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?, The Journal of Immunology. 179 (2007) 7209–7214. doi:10.4049/jimmunol.179.11.7209.
- [10] B. Allam, S.E. Ford, Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge, Fish & Shellfish Immunology. 20 (2006) 374–383. doi:10.1016/j.fsi.2005.05.012.
- [11] C. Paillard, An ecological approach to understanding host-pathogen-environment interactions: the case of Brown Ring Disease in clams, 2016. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01426301> (accessed February 22, 2017).
- [12] E. Lane, T.H. Birkbeck, Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes, Journal of Fish Diseases. 23 (2000) 275–279.
- [13] F. Brulle, F. Jeffroy, S. Madec, J.-L. Nicolas, C. Paillard, Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge, Developmental & Comparative Immunology. 38 (2012) 368–376. doi:10.1016/j.dci.2012.03.003.
- [14] G. Richard, Approche mécanistique de la réponse de la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*, exposée à la bactérie *Vibrio tapetis*: influence de la température et du régime algal, (2015).
- [15] C. Le Bris, G. Richard, C. Paillard, C. Lambert, C. Segueineau, O. Gauthier, F. Pernet, F. Guérard, Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection, Fish & Shellfish Immunology. 42 (2015) 16–24. doi:10.1016/j.fsi.2014.10.021.
- [16] C. Paillard, P. Maes, Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system, Diseases of Aquatic Organisms. 19 (1994) 137–146.
- [17] S. Lindgreen, AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads, BMC Research Notes. 5

(2012) 337.

- [18] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*. 30 (2014) 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- [19] R. Schmieder, R. Edwards, Quality control and preprocessing of metagenomic datasets, *Bioinformatics*. 27 (2011) 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026.
- [20] E. Kopylova, L. Noé, H. Touzet, SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data, *Bioinformatics*. 28 (2012) 3211–3217. doi:10.1093/bioinformatics/bts611.
- [21] R. Moreira, P. Balseiro, J.V. Planas, B. Fuste, S. Beltran, B. Novoa, A. Figueras, Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing, *PLoS One*. 7 (2012) e35009.
- [22] M.G. Grabherr, B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, et al, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nature Biotechnology*. 29 (2011) 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.
- [23] G.M. Dias, A. Bidault, P. Le Chevalier, G. Choquet, C. Der Sarkissian, L. Orlando, C. Medigue, V. Barbe, S. Mangenot, C.C. Thompson, *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs, *Frontiers in Microbiology*. 9 (2018) 227.
- [24] B. Allam, C. Paillard, M. Auffret, Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*, *Journal of Invertebrate Pathology*. 76 (2000) 63–69. doi:10.1006/jipa.2000.494.
- [25] C. López, M.J. Carballal, C. Azevedo, A. Villalba, Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca:bivalvia), *Fish & Shellfish Immunology*. 7 (1997) 595–608. doi:10.1006/fsim.1997.0112.
- [26] G. Wang, Z. Zhang, S. Lin, L. Zhang, B. Wang, S. Wang, Y. Wang, A homologue of dermatopontin from *Halotis diversicolor* and its response to pathogenic infection, *Aquaculture Research*. 46 (2015) 1537–1549. doi:10.1111/are.12305.
- [27] B. Allam, E. Pales Espinosa, A. Tanguy, F. Jeffroy, C. Le Bris, C. Paillard, Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease, *Fish & Shellfish Immunology*. 41 (2014) 2–11. doi:10.1016/j.fsi.2014.05.022.
- [28] L. Qiu, S. Jiang, J. Huang, W. Wang, C. Zhu, T. Su, Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Fish & Shellfish Immunology*. 26 (2009) 115–121. doi:10.1016/j.fsi.2008.03.022.
- [29] L. Chen, C. Mu, J. Zhao, C. Wang, Molecular cloning and characterization of two isoforms of cyclophilin A gene from *Venerupis philippinarum*, *Fish & Shellfish Immunology*. 31 (2011) 1218–1223. doi:10.1016/j.fsi.2011.07.001.
- [30] S.S. Bohlson, S.D. O'Conner, H.J. Hulsebus, M.-M. Ho, D.A. Fraser, Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization, *Frontiers in Immunology*. 5 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00402.
- [31] T.W. Du Clos, C. Mold, Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors., *Current Opinion in Organ Transplantation*. 16 (2011) 15–20. doi:10.1097/MOT.0b013e32834253c7.
- [32] W.-C. Song, Crosstalk between Complement and Toll-Like Receptors, *Toxicologic Pathology*. 40 (2012) 174–182. doi:10.1177/0192623311428478.
- [33] P. Parham, C. Janeway, The immune system, Fourth edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, NY, 2015.
- [34] R.B. Leite, M. Milan, A. Coppe, S. Bortoluzzi, A. dos Anjos, R. Reinhardt, C. Saavedra, T. Patarnello, M.

- Cancela, L. Bargelloni, mRNA-Seq and microarray development for the Grooved carpet shell clam, *Ruditapes decussatus*: a functional approach to unravel host -parasite interaction, BMC Genomics. 14 (2013) 741. doi:10.1186/1471-2164-14-741.
- [35] B. Allam, C. Paillard, S.E. Ford, Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams, Diseases of Aquatic Organisms. 48 (2002) 221–231.
- [36] J. Liu, G.-P. Shi, W.-Q. Zhang, G.-R. Zhang, W.-H. Xu, Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, Insect Molecular Biology. 15 (2006) 823–834. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00686.x.
- [37] D. Niu, K. Jin, L. Wang, B. Feng, J. Li, Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta*, Fish & Shellfish Immunology. 35 (2013) 581–588. doi:10.1016/j.fsi.2013.06.001.
- [38] A. Darموise, P. Maschmeyer, F. Winau, The Immunological Functions of Saposins, in: Advances in Immunology, Elsevier, 2010: pp. 25–62. doi:10.1016/S0065-2776(10)05002-9.
- [39] A. Welin, J. Raffetseder, D. Eklund, O. Stendahl, M. Lerm, Importance of Phagosomal Functionality for Growth Restriction of *Mycobacterium tuberculosis* in Primary Human Macrophages, Journal of Innate Immunity. 3 (2011) 508–518. doi:10.1159/000325297.
- [40] U. Kishore, C. Gaboriaud, P. Waters, A.K. Shrive, T.J. Greenhough, K.B.M. Reid, R.B. Sim, G.J. Arlaud, C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility, Trends in Immunology. 25 (2004) 551–561. doi:10.1016/j.it.2004.08.006.
- [41] G.R. Vasta, M. Quesenberry, H. Ahmed, N. O'Leary, C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway, Developmental & Comparative Immunology. 23 (1999) 401–420. doi:10.1016/S0145-305X(99)00020-8.
- [42] N.D. Marchenko, A. Zaika, U.M. Moll, Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria a potential role in apoptotic signaling, J. Biol. Chem. 275 (2000) 16202–16212. doi:10.1074/jbc.275.21.16202.
- [43] P. Ponka, C. Beaumont, D.R. Richardson, Function and regulation of transferrin and ferritin., Semin Hematol. 35 (1998) 35–54.
- [44] K. Orino, L. Lehman, Y. Tsuji, H. Ayaki, S.V. Torti, F.M. Torti, Ferritin and the response to oxidative stress, Biochemical Journal. 357 (2001) 241–247. doi:10.1042/bj3570241.
- [45] X. Zhou, W.-J. Liao, J.-M. Liao, P. Liao, H. Lu, Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome, Journal of Molecular Cell Biology. 7 (2015) 92–104. doi:10.1093/jmcb/mjv014.
- [46] M. Achard-Joris, P. Gonzalez, V. Marie, M. Baudrimont, J.-P. Bourdineaud, cDNA cloning and gene expression of ribosomal S9 protein gene in the mollusk *Corbicula fluminea*: a new potential biomarker of metal contamination up-regulated by cadmium and repressed by zinc, Environmental Toxicology and Chemistry. 25 (2006) 527. doi:10.1897/05-211R.1.
- [47] B. Mazumder, D. Poddar, A. Basu, R. Kour, V. Verbovetskaya, S. Barik, Extraribosomal L13a Is a Specific Innate Immune Factor for Antiviral Defense, Journal of Virology. 88 (2014) 9100–9110. doi:10.1128/JVI.01129-14.
- [48] L. Wang, J. Luo, Q. Nian, Q. Xiao, Z. Yang, L. Liu, Ribosomal protein S14 silencing inhibits growth of acute myeloid leukemia transformed from myelodysplastic syndromes via activating p53, Hematology. 19 (2014) 225–231. doi:10.1179/1607845413Y.0000000127.
- [49] H.-X. Zhang, Z.-X. Liu, Y.-P. Sun, J. Zhu, S.-Y. Lu, X.-S. Liu, Q.-H. Huang, Y.-Y. Xie, H.-B. Zhu, S.-Y. Dang, H.-F. Chen, G.-Y. Zheng, Y.-X. Li, Y. Kuang, J. Fei, S.-J. Chen, Z. Chen, Z.-G. Wang, Rig-I regulates NF- B activity through binding to Nf- b1 3'-UTR mRNA, Proceedings of the National Academy of Sciences. 110 (2013) 6459–6464. doi:10.1073/pnas.1304432110.
- [50] R.M. Martin, N.B. Chilton, M.W. Lightowlers, R.B. Gasser, *Echinococcus granulosus* myophillin--relationship with protein homologues containing "calponin-motifs," Int. J. Parasitol. 27 (1997) 1561–1567.

- [51] A. Goodman, B.L. Goode, P. Matsudaira, G.R. Fink, The *Saccharomyces cerevisiae* Calponin/Transgelin Homolog Scp1 Functions with Fimbrin to Regulate Stability and Organization of the Actin Cytoskeleton, *Molecular Biology of the Cell*. 14 (2003) 2617–2629. doi:10.1091/mbc.e03-01-0028.
- [52] T.C. Tran, C. Singleton, T.S. Fraley, J.A. Greenwood, Cysteine-rich protein 1 (CRP1) regulates actin filament bundling, *BMC Cell Biology*. 6 (2005) 45. doi:10.1186/1471-2121-6-45.
- [53] H.A. Louis, J.D. Pino, K.L. Schmeichel, P. Pomiès, M.C. Beckerle, Comparison of Three Members of the Cysteine-rich Protein Family Reveals Functional Conservation and Divergent Patterns of Gene Expression, *Journal of Biological Chemistry*. 272 (1997) 27484–27491. doi:10.1074/jbc.272.43.27484.
- [54] A. Ghosh-Roy, B.S. Desai, K. Ray, Dynein Light Chain 1 Regulates Dynamin-mediated F-Actin Assembly during Sperm Individualization in *Drosophila*, *Molecular Biology of the Cell*. 16 (2005) 3107–3116. doi:10.1091/mbc.e05-02-0103.
- [55] F. Han, Z. Wang, X. Wang, Characterization of myosin light chain in shrimp hemocytic phagocytosis, *Fish & Shellfish Immunology*. 29 (2010) 875–883. doi:10.1016/j.fsi.2010.07.030.
- [56] U. Röhrig, G. Gerisch, L. Morozova, M. Schleicher, A. Wegner, Coactosin interferes with the capping of actin filaments, *FEBS Letters*. 374 (1995) 284–286. doi:10.1016/0014-5793(95)01130-7.
- [57] E. Korenbaum, P. Nordberg, C. Björkegren-Sjögren, C.E. Schutt, U. Lindberg, R. Karlsson, The Role of Profilin in Actin Polymerization and Nucleotide Exchange †, *Biochemistry*. 37 (1998) 9274–9283. doi:10.1021/bi9803675.
- [58] H. Lodish, ed., *Molecular cell biology*, 4. ed., [Nachdr.], Freeman, New York, NY, 2002.
- [59] R. Hopmann, K.G. Miller, A Balance of Capping Protein and Profilin Functions Is Required to Regulate Actin Polymerization in *Drosophila* Bristle, *Mol Biol Cell*. 14 (2003) 118–128. doi:10.1091/mbc.E02-05-0300.
- [60] H.G. Mannherz, E. Hannappel, The  $\beta$ -thymosins: Intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family, *Cell Motil. Cytoskeleton*. 66 (2009) 839–851. doi:10.1002/cm.20371.
- [61] A. Weber, Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer-polymer distribution by different mechanisms, *Molecular and Cellular Biochemistry*. 190 (1999) 67–74.
- [62] M. Hertzog, E.G. Yarmola, D. Didry, M.R. Bubb, M.-F. Carlier, Control of Actin Dynamics by Proteins Made of  $\beta$ -Thymosin Repeats - The actobindin family, *J. Biol. Chem*. 277 (2002) 14786–14792. doi:10.1074/jbc.M112064200.
- [63] C.A. Moore, N. Beckmann, M. Patricia Morse, Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria*, *Journal of Invertebrate Pathology*. 60 (1992) 141–147. doi:10.1016/0022-2011(92)90087-K.

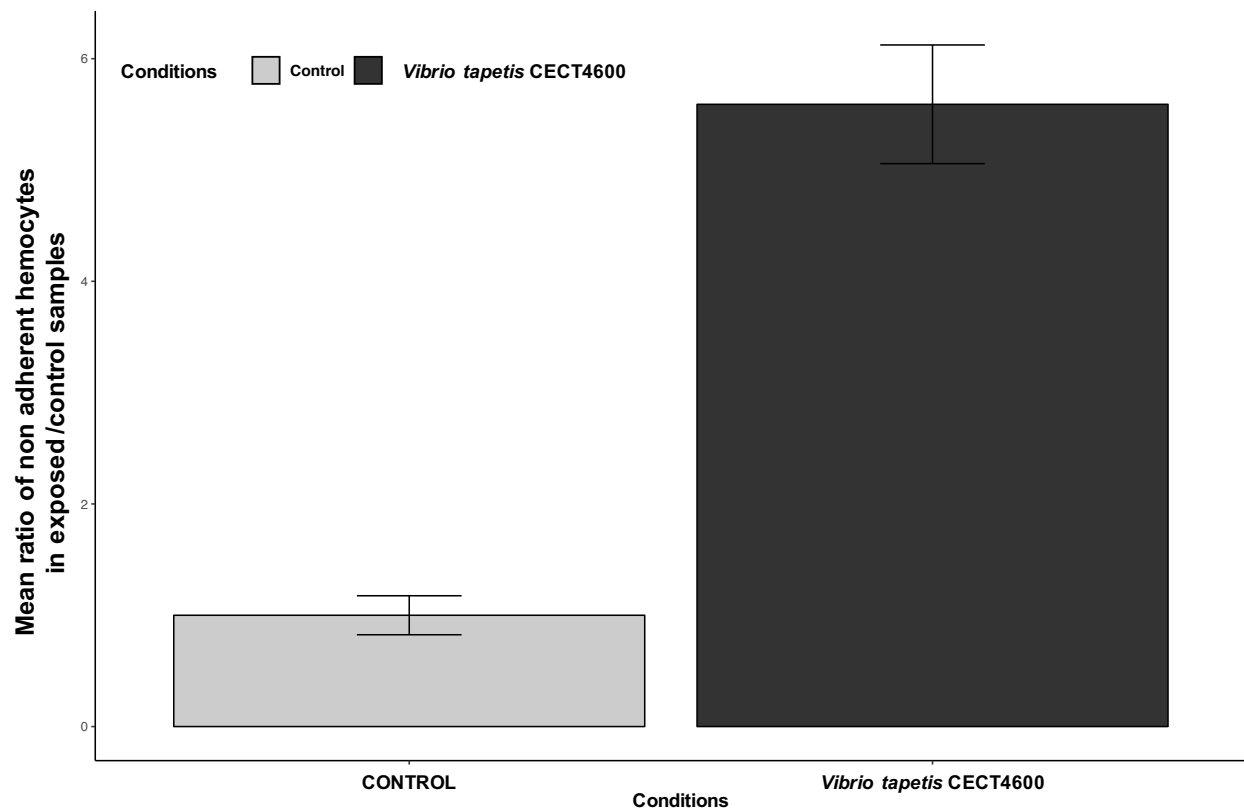


Figure 1: Adherence test on hemocytes exposed to *Vibrio tapetis* CECT4600 (black) or non-exposed (grey) representing the mean ratio of non-adherent hemocytes on exposed / control samples. Error bars = Standard error.

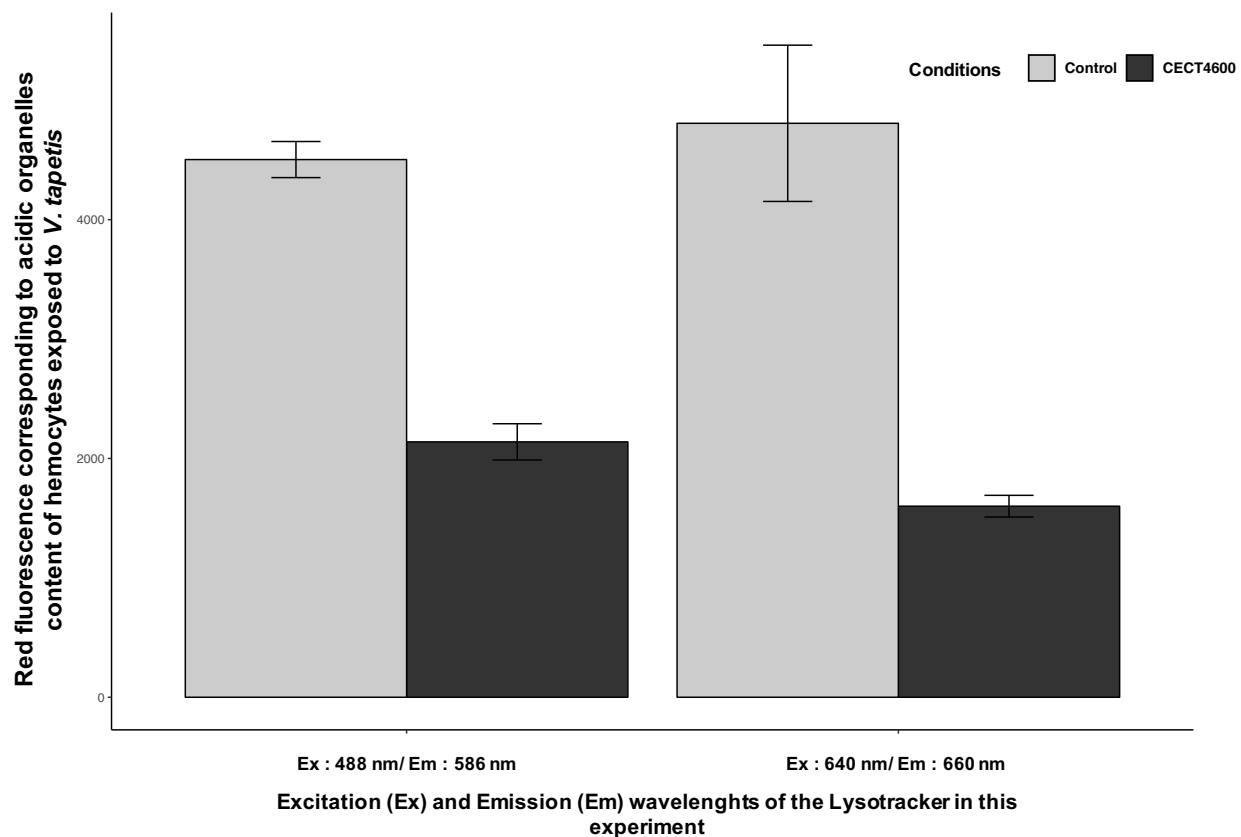


Figure 2: Mean red fluorescence of Lysotracker red used as a measure of the amount of acidic organelles in hemocytes, exposed to *V. tapetis* CECT4600 (black) or non-exposed (grey). Error bars = Standard error.

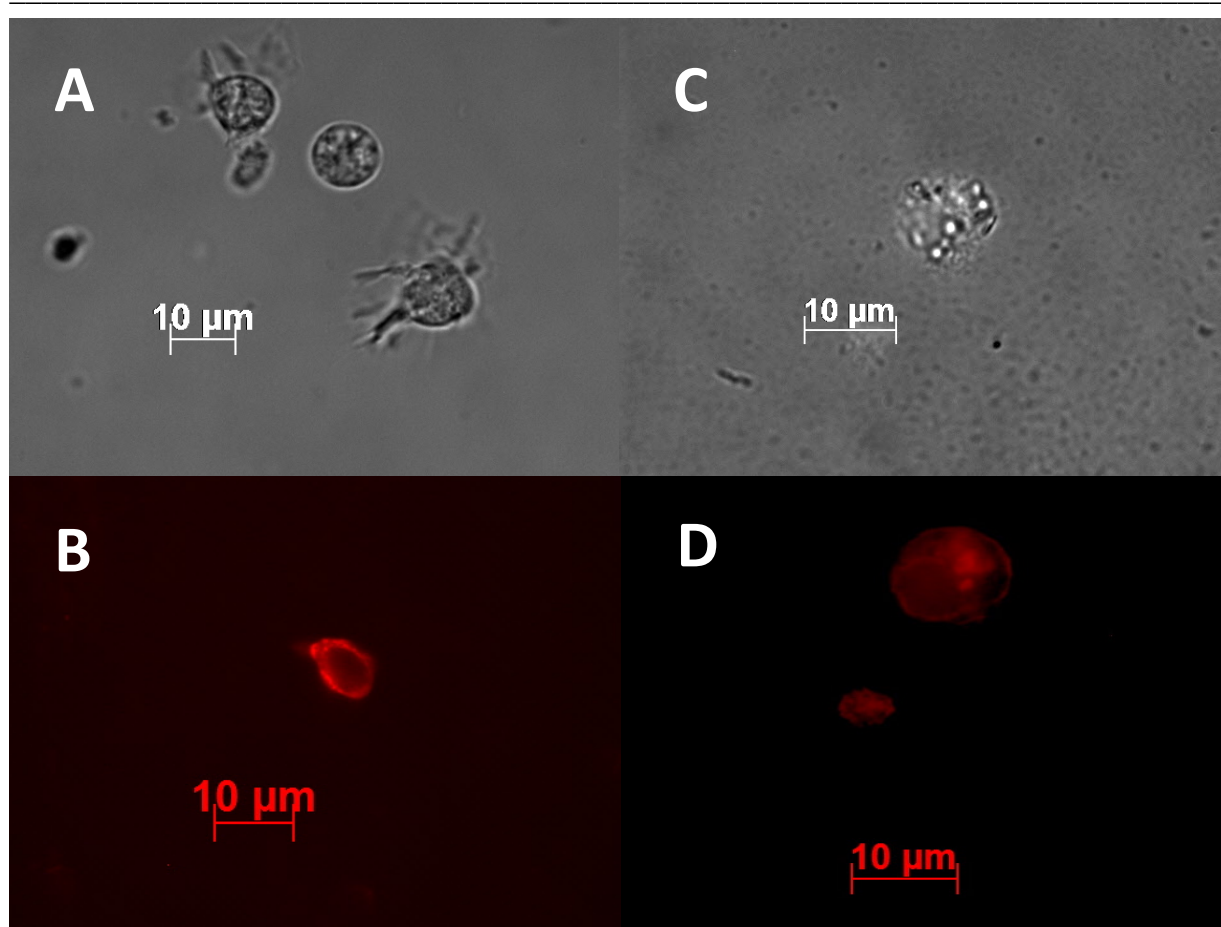
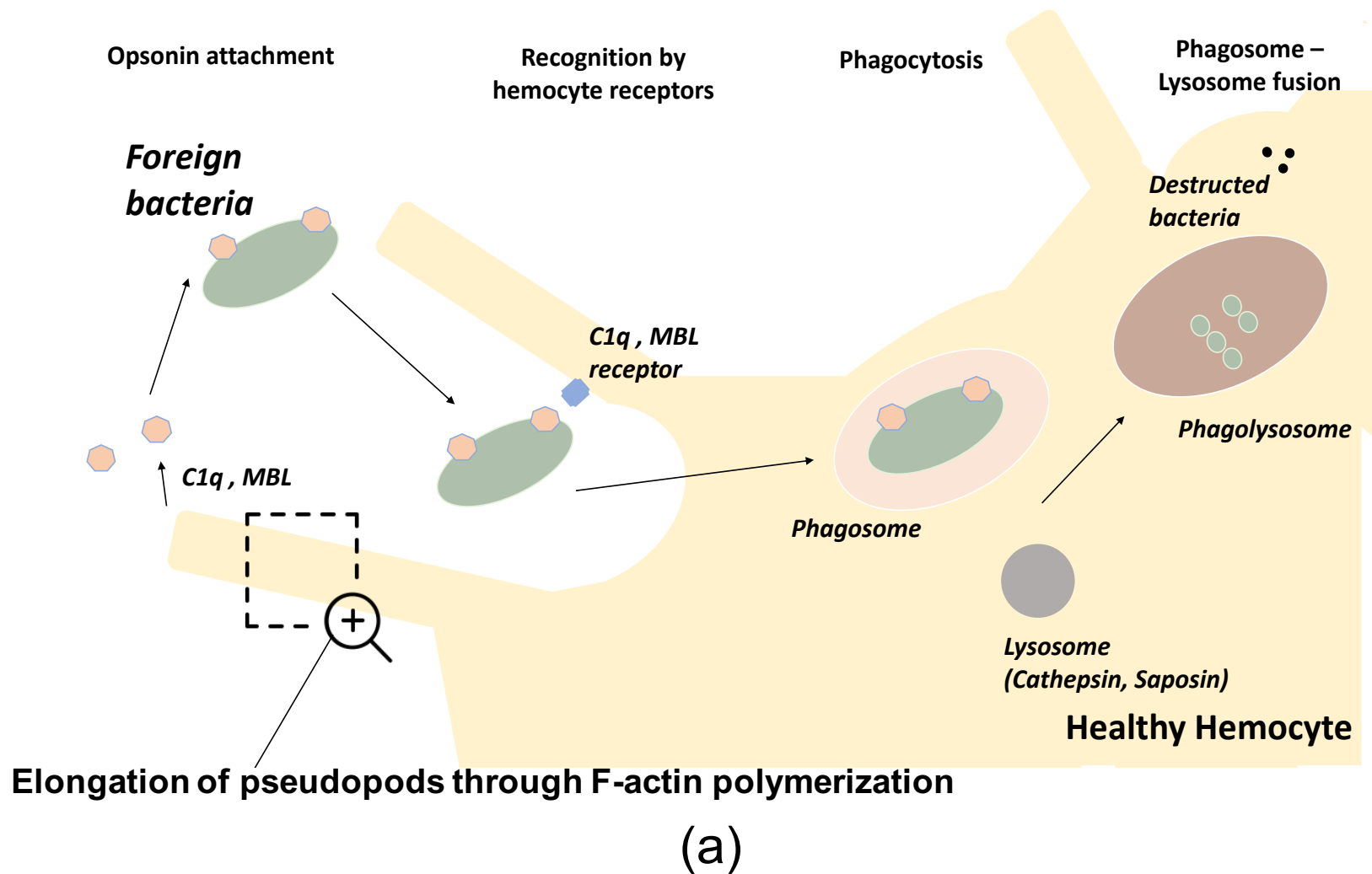
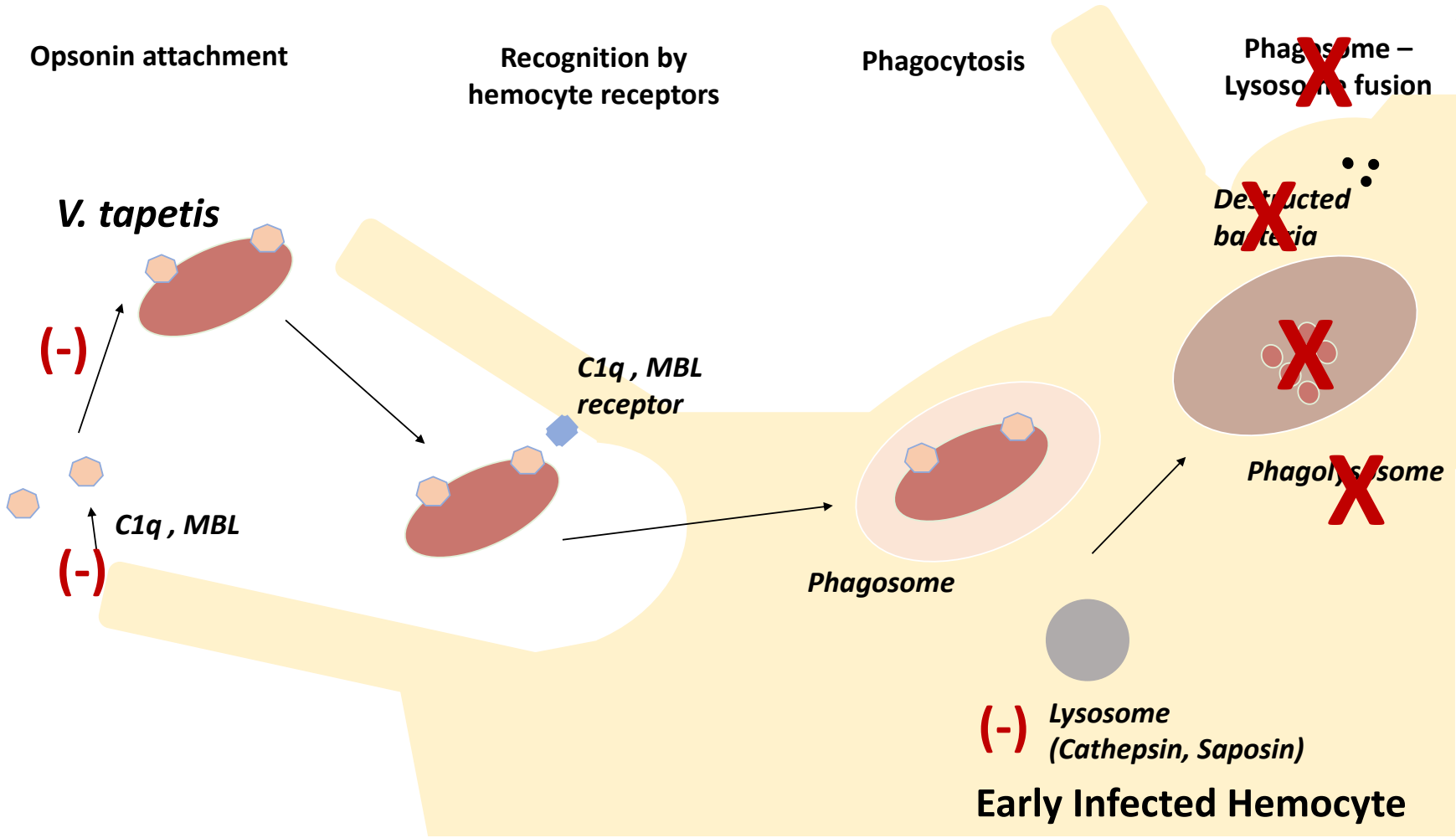


Figure 3: Rhodamine phalloidin staining of F-actin filaments in hemocytes that had been exposed (C, D) or not (A, B) to *V. tapetis* CECT4600. A, C: bright field microscopy observations of control (A) and exposed (C) hemocytes. B, D: epifluorescence observations of control (B) and exposed (D) hemocytes. Wavelengths: excitation, 550 nm; emission, 605 nm. The scale bars (2cm=10 µm) correspond to the pictures A, B, C & D

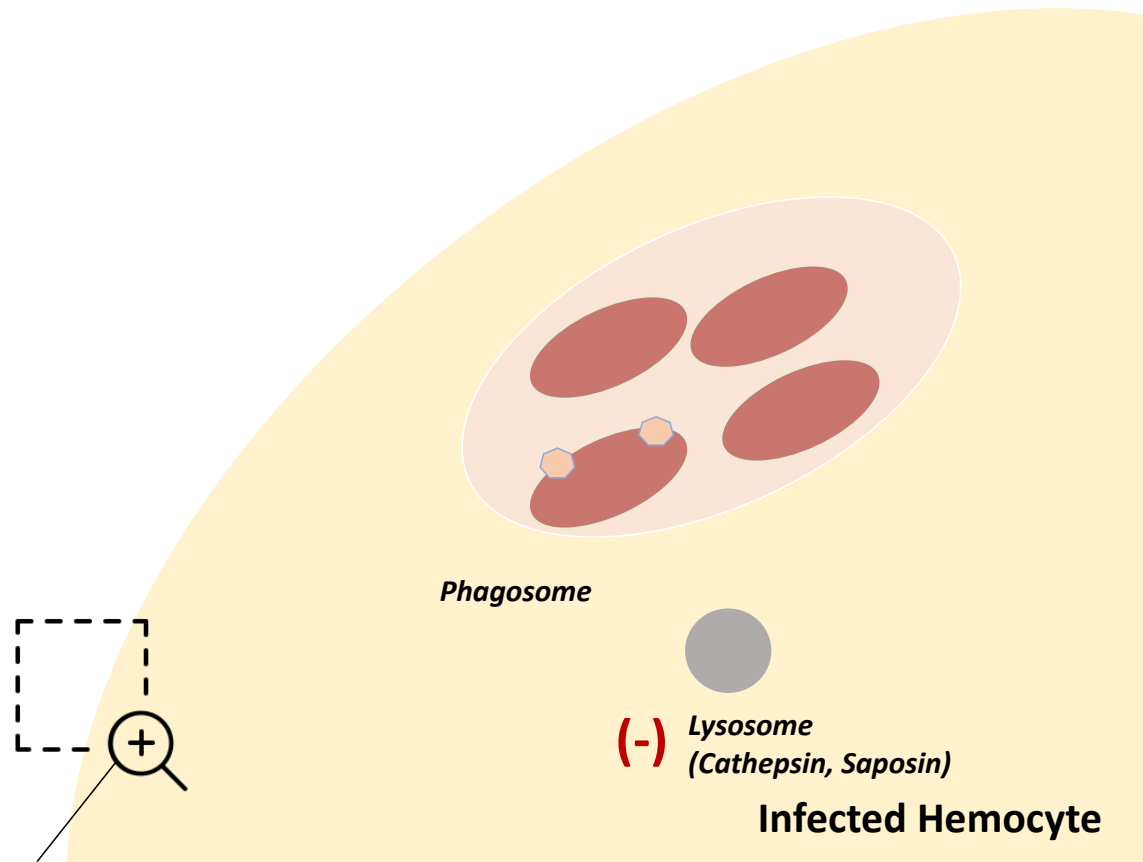


Figure 4: The hypothetical model of clam – *V. tapetis* interaction. a) Immune response of clams to foreign bacteria in healthy, functional and active hemocytes. b) Immune response of clams to *V. tapetis* on the first steps of infection in early Infected Hemocytes. c) Immune response of clams to *V. tapetis* on the late steps of infection in infected, non-functional and, according to our model, resting hemocytes. (–) represent down regulated genes in this study.





(b)



**No pseudopods formation : disorganization of F-actin after challenge with *V. tapetis***

(c)

## Conclusion et perspectives

Dans le cadre de la MAB, au sein des FEPs, les gènes codant des protéines liées à la destruction du pathogène par la voie du complément sont sous-exprimés, tels que les C1q protéines ou les galectines. Nous avons également observé une baisse d'expression de transcrits impliqués dans la fonction lysosomale, pouvant suggérer une diminution d'activité de celle-ci. Les expériences réalisées à l'aide du LysoTracker sur des hémocytes infectés par *V. tapetis* ont permis de confirmer la diminution de l'activité lysosomale liée à l'exposition des hémocytes à *V. tapetis*. Enfin, nous avons démontré une dérégulation de transcrits impliqués dans la synthèse et la stabilisation d'actine. Une des hypothèse et perspective d'analyse résultant de cette étude est une possible sous-régulation de gènes impliqués dans la synthèse de protéines régulant l'effet des *capping proteins*. Ces molécules, inhibant la synthèse d'actine, si elles n'étaient plus régulées, entraîneraient une inhibition de la synthèse d'actine et pourraient entraîner le cellule hémocytaire dans un état de quiescence. Après marquage de l'actine-F, nous avons pu observer que la localisation de l'actine changeait au cours de l'exposition à *V. tapetis*, étant plus diffuse chez les hémocytes exposés. Dans ce chapitre, nous avons ainsi mis en évidence d'une part la régulation de l'expression des gènes dans le compartiment extra-palléal, lieu clé de l'infection par *V. tapetis* et d'autre part les modifications physiologiques liées au pathogène qui n'avaient, jusqu'à présent, jamais été démontrées expérimentalement.



## CHAPITRE 4

---

Quelles sont les modulations au sein de l'animal associées au pH et à la température lors de l'infection ?

## Introduction

Dans la cadre de la MAB, *V. tapetis* colonise et dégrade le périostracum de la palourde japonaise dans le but de pénétrer dans le compartiment extra-palléale (Paillard and Maes, 1995). Cette vibriose est accompagnée d'une inhibition de la biominéralisation de la coquille entraînant occasionnellement des déformations de celle-ci (Paillard et al., 1994). La coquille des palourdes japonaises est constituée de cristaux de carbonate de calcium de type aragonite (Taylor, J D et al., 1973; Trinkler, 2009). La biominéralisation est un processus étroitement lié au pH. L'état de saturation des cristaux de carbonate de calcium détermine si la réaction de biominéralisation de la coquille est favorisée ou dépend de la dissolution celle-ci. L'acidification a pour effet de réduire le taux de saturation des cristaux de carbonate de calcium et favorise ainsi la réaction de dissolution (Gattuso and Hansson, 2011).

Chez la palourde japonaise, la réaction de biominéralisation de la coquille s'effectue dans les FEPs (Trinkler, 2009). Bien que le lien entre la MAB et l'inhibition de la biominéralisation de la coquille ait été prouvé (Paillard et al., 1994), aucune étude ne s'était encore intéressée à la relation entre la MAB et le pH chez la palourde japonaise.

Dans ce chapitre, notre objectif était dans un premier temps de caractériser la capacité de *V. tapetis* à croître une large gamme de pH et de températures. Dans un second temps, nous avons étudié les modifications de pH liées à l'interaction *V. tapetis* – hémocytes en modifiant le test de virulence classiquement utilisé pour pouvoir tester, *in vitro*, la capacité du pathogène à influencer le pH des fluides de palourdes japonaises. Enfin, nous avons mesuré les variations de pH dans les FEPs et l'hémolymphe de palourdes japonaises infectées expérimentalement *in vivo* dans le but de comprendre si le développement de la MAB entraîne des modifications de pH chez les animaux malades.

## Modification du pH des fluides extra-palléaux et de l'hémolymphe lors de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise *R. philippinarum*

### Résumé de l'article

La maladie de l'anneau brun (ou MAB) est une affection touchant la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et due au pathogène *Vibrio tapetis*. Durant la MAB, les palourdes sont confrontées à une immunodépression et à une altération de la biominéralisation de la coquille. Dans cet article, nous avons choisi d'étudier le rôle du pH sur la croissance de l'agent pathogène et sur l'établissement du MAB. Nous avons mis en évidence la capacité de *V. tapetis* à réguler le pH durant sa mise en culture vers une valeur optimale de 7,70. Chez la palourde, lors de la MAB, *V. tapetis* est également capable d'influencer le pH des fluides extra-palléaux et de l'hémolymphe *in vitro* dans les premières heures d'exposition et *in vivo* après 3 jours d'infection. Les modulations du pH peuvent être dues à un mécanisme actif du pathogène pour coloniser l'hôte ou peuvent être une conséquence du fort taux de développement du pathogène durant la vibriose. Cette étude est la première observation de l'évolution du pH dans le cadre de la MAB et pourrait orienter de futures recherches sur les mécanismes associés à la MAB.



Article under review pour « Journal of Applied Microbiology » depuis le 13.09.2019

**External pH modulation during the growth of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease**

Alexandra Rahmani<sup>1#</sup>, Clémentine Mathien<sup>1</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Nelly Le Goïc<sup>1</sup>, Christine Paillard<sup>1#†</sup>, Vianney Pichereau<sup>1#†</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

# Corresponding authors, alexandra.rahmani@univ-brest.fr ; christine.paillard@univ-brest.fr ;  
vianney.pichereau@univ-brest.fr

† These authors contributed equally

## External pH modulation during the growth of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown Ring Disease

**Running head:** External pH modulations by *Vibrio tapetis*

Alexandra Rahmani<sup>1#</sup>, Clémentine Mathien<sup>1</sup>, Adeline Bidault<sup>1</sup>, Nelly Le Goïc<sup>1</sup>, Christine Paillard<sup>1#†</sup>, Vianney Pichereau<sup>1#†</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 LEMAR, F-29280 Plouzane, France

<sup>†</sup> These authors contributed equally

<sup>#</sup> Corresponding authors : [alexandra.rahmani@univ-brest.fr](mailto:alexandra.rahmani@univ-brest.fr) ; [vianney.pichereau@univ-brest.fr](mailto:vianney.pichereau@univ-brest.fr) ; [christine.paillard@univ-brest.fr](mailto:christine.paillard@univ-brest.fr)

### **Abbreviations**

BRD: Brown Ring Disease

d.p.i.: Days Post-Infection

EPFs: Extrapallial Fluids

FSSW: Filtered Sterilized Seawater

OD: Optical Density

**Keywords:** BRD, *V. tapetis*, *R. philippinarum*, pH, modulation effect, pH evolution, neutralizing activity

## **Abstract**

### **Aims**

Brown Ring Disease (BRD) is an infection of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* due to the pathogen *Vibrio tapetis*. During BRD, clams are facing immunodepression and shell biomineralization alteration. In this paper, we studied the role of pH on the growth of the pathogen and on the establishment of BRD.

### **Methods and Results**

In this study, we monitored pH evolution during growth of *V. tapetis* a range of pH and temperatures. We also measured pH of Manila clam hemolymph and extrapallial fluids during infection by *V. tapetis*. We highlighted that *V. tapetis* is able to regulate the external pH during its growth, to a value of 7.70. During the development of BRD, *V. tapetis* is also able to influence extrapallial fluids and hemolymph pH *in vitro* in the first hours of exposure and *in vivo* after 3 days of infection.

### **Conclusions**

Our experiments have shown a close interaction between *V. tapetis* CECT4600, a pathogen of Manila clam that induces BRD, and the pH of different compartments of the animals during infection. These results tend to prove that the bacterium, through a direct mechanism or as a consequence of physiological changes encountered in the animal during infection, alters the pH of the hemolymph and extrapallial fluids, and could by this way promote the infection process or at least create an imbalance within the animal, that would favor its persistence.

**Significance and Impact of Study**

This study is the first observation of the pH evolution in the case of BRD and might orient future research on the fine mechanisms of pH modulation associated to BRD.

## INTRODUCTION

The Manila clam *Ruditapes philippinarum* is a mollusk bivalve imported in France in the early 70's for aquaculture. Ten years later, mortalities have been observed in clam's cultures, caused by an infection called the Brown Ring Disease or BRD (Paillard et al., 1989). Indeed, infected clams were characterized by a brown deposit in the inner face of the shell between the pallial line and the edge of the shell (Paillard et al., 1994). BRD is caused by a Gram negative bacteria, *Vibrio tapetis* (Borrego et al., 1996; Paillard and Maes, 1990).

*V. tapetis* is a microparasite acting in two modes. In the case of BRD, the bacterium is referred to as an external microparasite because it degrades the periostracal lamina of the clam to enter the extrapallial compartment without invading the tissues. In this case, the pathogen induces BRD in Manila clams. In some cases, when tissues are damaged, *V. tapetis* acts as an internal microparasite by infiltrating the animal's tissues, resulting in mortality within days (Paillard, 2004a).

Manila clam is a species of significant economic interest with a world production mainly from China, followed by European countries such as Italy, Spain and France (Paillard, 2004b). However, BRD has caused significant economic losses in livestock farms on the Northern European coasts because the pathogen has an optimum infection rate in cold waters at around 14°C. For example, in France, Manila clam

production decreased from 500 tons in 1987 to 200 tons in 1989, the production being mainly located in area highly sensitive to BRD (Paillard, 2004b).

Many factors are involved in economic losses related to BRD. Indeed, some alterations on the inner shell have significant impacts on the functioning of the affected clams. Impeding the functioning of adductor muscles and siphons, they result in abnormal positioning of the clam in the sediment and prevent the proper closure of valves that can lead to mortality when fishing or directly in the sediment, as clams can no longer retain their inter-valve water (Gouletquer et al., 1989; Paillard, 2016).

Furthermore, infected clams are facing an immunodepression caused by *V. tapetis*. Hemocytes, which are key effectors of the immune defenses of clams, are altered in BRD by actin cytoskeleton disorganization causing rounding of hemocytes and downregulation of pathogen recognition effectors. Consequently, infected hemocytes are no more able to ensure phagocytic progress to degrade the pathogen (Allam et al., 2014; Choquet et al., 2003; Rahmani et al., 2019).

During infection by *V. tapetis*, the pathogen therefore colonizes the periostracum and degrades it in order to infiltrate peripheral or even central extrapallial fluids (EPFs). As a result, it inhibits the biomineralization of the shell, preventing the formation of calcium carbonate crystals of aragonite and thus leads to the accumulation of the organic brown deposit.

Shell biomineralization is characterized by the formation of Calcium-Carbonate crystals ( $\text{CaCO}_3$ ) from calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ions.  $\text{CaCO}_3$  crystals are

the main constituent of shellfish. In the Manila clam, the shell is composed of aragonitic crystals (Taylor, J D et al., 1973; Trinkler et al., 2011). The saturation state of this mineral in seawater determines whether the biomineralization reaction is favored in the direction of crystal formation or dissolution. It is defined by the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  ions.

This process is often studied in the context of ocean acidification because pH is a factor that considerably influences this crystals formation. Indeed, acidification has the effect of reducing the saturation rate of calcium carbonate crystals through the reduction in available  $\text{CO}_3^{2-}$  ions, thus promoting the dissolution of the shell (Gattuso and Hansson, 2011).

The pH is a factor that strongly influences the physiology of different bivalves. Ocean acidification has therefore significant impacts on these filter feeders. In the mussel *Mytilus edulis*, decrease in pH leads to a decrease in the net calcification rate,  $\text{Ca}^{2+}$  ion content and, in general, in a change in the ultrastructure of the shell and a decrease in amino acid content (Li et al., 2015). Combination of temperature and  $\text{pCO}_2$  increase results in a decreased shell hardness in the clam *Mercenaria mercenaria* and in the American oyster *Crassostrea virginica*, indicating major changes in the biomineralization process (Ivanina et al., 2013). In the brittle stars *Amphiura filiformis*, authors showed that the animal was able to compensate, in the short term, for the effects of pH decline by accelerating calcification and metabolism at the expense of certain functions such as growth and reproduction because of the high energy cost

required for this mechanism (Wood et al., 2008). However, most of the studies reflect that ocean acidification reduces the calcification rates of animals composed of calcitic or aragonitic crystal shells by promoting the dissolution reaction of these crystals.

In the Manila clams, the shell biomineralization reaction occurs in extrapallial fluids: ie the mantle secretes the shell components, the organic matrix (conchiolin) and the calcium carbonate that form the shell (Paillard and Le Pennec, 1993; Trinkler, 2009).

The periostracum (outer part of the shell) is made of a sclerotized organic matrix.

Shell organic matrix is mainly composed under normal conditions of aspartic acid, glycine and serine, responsible for binding with calcium ions: chelation by sulphate ester groups on polysaccharide chains would initiate biomineralization. When BRD develops, affected clams have deficiencies in amino acid such as glutamic acid, aspartic acid, serine, and alanine, which can lead to poor binding to Calcium - Carbonate (Gouletquer et al., 1989).

Given the importance of pH homeostasis in the biomineralization process, it seems likely that pH plays a significant role in the pathogenicity of *V. tapetis* in the case of BRD. In this paper, we chose to investigate the role of pH in BRD and we present elements that may allow us to consider phenomena causing pH variations as a potential pathogenicity factor. This study is the first investigation of pH implication in the case of BRD.



## MATERIALS AND METHODS

### 1) Monitoring of the pH evolution during growth of *V. tapetis* in culture media

Culture media and bacterial strain: The bacterial strain used in these experiments is *V. tapetis* CECT4600, grown in Zobell medium (Zobell, 1941) and incubated at 18°C. The first objective was to monitor the growth of this strain at 7 different pH values and 4 different temperatures. The 7 liquid culture media used in this experiment were obtained from Zobell media supplemented with NaOH 1 M or HCl 0.1 M until the expected pH is obtained. After autoclave sterilization, the pHs of the 7 media were 6.00, 6.45, 7.00, 7.55 (not modified, control medium, CM), 7.86, 8.12 and 8.70, respectively. pH of the cultures/media were measured by using a Mettler Toledo® InLab Micro electrode after calibration of the electrode with pH buffers 4, 7 and 9 at the beginning and the end of each experiment. The 4 temperatures tested were 14°C (optimal infection temperature), 18°C (optimal growth temperature), 21°C (temperature at which the clam is able to initiate nacrezation) and finally 27°C (temperature at which the bacteria die).

Growth experiments: colonies of strain CECT4600 were resuspended in 2 ml of Zobell medium (unmodified pH, control medium CM). The Optical Density (OD) was measured at a wavelength of 492 nm and the suspension concentration was adjusted to an OD of about 0.1, i.e. to a cell density of  $9.4 \times 10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup>. The suspension was diluted at 1:100 in 3 ml of Zobell medium at the desired pH. The control samples were the same sterile media. 400 µL of inoculated media or controls were distributed in a

Bioscreen© 100-wells plate (5 replicates per tested condition), allowing a sterile, thermally controlled culture with an OD measurement at regular intervals under stirring. This protocol was repeated twice; each experiment was run for 24 hours (except at 14°C where the experiment ran for 30 h to take into account the reduced bacterial growth), in a shaking mode, with measurement of OD every 20 minutes at a wavelength of 492 nm ; temperature was set up at either 14°, 18°, 21° or 27°C.

pH monitoring during the bacterial growth: Two precultures of *V. tapetis* CECT4600 were performed in Zobell broth during 15 h at 18°C and 24 h at 14°C in order to reach an OD of 0.98. Each preculture was diluted 12 times (initial OD = 0.08) with fresh Zobell medium at the different pHs (from 6.00 to 8.70). With these new cultures, bacterial growth was performed under shaking at 14°and 18°C, respectively from the corresponding pre-culture, in three replicates. The pH was measured, from 200 µL-samples, at the beginning of the experiment, every hour during the exponential growth phase, and finally in the stationary phase (i.e. 48 h of growth at 14°C and 24 h of growth at 18°C).

**2) Monitoring of the pH in extrapallial fluids (EPFs) and hemolymph of Manila clams during infection by *V. tapetis***

Animals: Animals used in this study were adult Manila clams (about 40 mm) from Landeda (Finistère, France), kindly provided by the company SATMAR. 1 pool of 40 clams (for the *in vitro* study of fluids) and 2 pools of 100 clams (for the *in vivo* infection study) were acclimatized for 3 and 2 weeks, respectively, in oxygenated seawater at 14°C.

Fluids and shell sampling: The fluids chosen for this experiment were hemolymph and EPFs. Hemolymph, EPFs and shell were randomly collected extemporaneously from 10 clams. The quality of the hemolymph samples was checked under the microscope (presence of pseudopods, unrounded hemocytes, serum and hemocytes without microorganism contaminations) then the samples were pooled and the number of hemocytes was determined by using a Malassez counting grid. Shell parts were broken with a hammer to obtain small pieces and were sterilized by UV (wavelength 254 nm) for 15 minutes. EPFs were also pooled. The hemocytes concentration in the hemolymph pool was  $5.45 \times 10^5$  cells.ml<sup>-1</sup>.

For *in vitro* experiments, 150 µl of FSSW, hemolymph or EPFs were placed in 1.5 ml sterile tubes, with supplementation of powdered Manila clam shell in order to design

an *in vitro* experiment that is as close as possible of natural conditions and to allow ions exchanges between fluids and shell that might be dependent of the *V. tapetis* growth. Then, 200  $\mu\text{L}$  of a *V. tapetis* CECT4600 suspension in FSSW was added to each tube, in order to reach a final bacteria:hemocytes ratio of 25:1 ( $1.37 \times 10^7 \text{ CFU.ml}^{-1}$ ); 200  $\mu\text{L}$  of FSSW was added for the controls. Each condition was tested in triplicates. pH measures were performed at times 0 h, 3 h, 24 h, 48 h and 72 h.

For *in vivo* infection experiments, the animals were first kept out of the water during the night before infection to allow the valves to open spontaneously in water, and then injected with 100  $\mu\text{l}$  of FSSW for 50 control individuals, or 100  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension ( $5 \times 10^8 \text{ CFU.ml}^{-1}$  in FSSW) for 50 infected individuals, in the pallial cavity. The injected animals were left out of water for 3 additional hours to allow the pathogen to colonize them, and then were transferred again into their respective seawater tanks. Animals were sampled at different time points after infection, ie. after 15 hours, 1 day, 3 days, 7 days, 14 days and 21 days post injection (d.p.i.). pH of the EPFs and hemolymph samples were measured by using the Mettler Toledo microelectrode calibrated with pH 4, 7 and 9 buffers. The initial sample (T0) was taken just before injection.

Statistical analyses: Statistical analyses were performed by using a Student test or a Mann Whitney Wilcoxon test, depending of data normality.

## RESULTS

### *V. tapetis* CECT4600 modulates the pH of Zobell culture medium during its growth.

*V. tapetis* was cultured in Zobell broths which pH were adjusted from 6.00 to 8.70, at 4 different temperatures ranging from 14°C to 27°C. The results obtained are reported in Table 1. First, we observed that the bacterium is able to grow at temperatures ranging from 14°C to 21°C, in the pH range tested, but not at 27°C. In addition, consistently with the results previously published by Borrego et al (1996), the optimal growth temperature seems to be 18°C.

*V. tapetis* seems to have a high tolerance to pH because we observed a growth in all the tested culture media. However, at 14°C, the fastest growth was obtained for the control medium (pH 7.4, DT = 3.15 h), but very good growths were observed over a pH range from 6.45 to 8.12, with doubling times from 3.15 to 3.5 and max ODs greater than 1, while these parameters significantly dropped at the extreme pHs tested, ie. 6 and 8.7 (Table 1). Interestingly, at the growth temperatures 18 and 21°C, the best growth parameters were obtained for more acidic pHs, the lowest DTs being observed for the pH value 6.45 (DTs = 1.85 and 1.93 h, respectively at 18 and 21°C).

The pHs of the culture media have been measured at both the beginning (T<sub>0</sub>) and the end (T<sub>F</sub>) of bacterial growth in all the conditions tested. Results are presented in Figures 1 to 3. In the control samples (no bacteria), the pHs did not change

significantly between the measurements made at T0 and TF (Fig. 1 to 3). By contrast, after growth of *V. tapetis* at 14, 18 and 21°C, the pH changed during growth to reach an average value of 7.90 in all media tested (Fig. 1 and 2). We did not observe such a pH modification of the culture medium at 27°C, a condition where no growth of the bacterium was observed (Fig. 3).

Figure 2 shows the statistical distribution of pH values measured at T0 and TF in all media. The mean and variance of this distribution differed significantly during the experiment only when the bacterium was able to grow (*pvalue* < 0.0001). Overall, these results show that *V. tapetis* is able to modify the pH of its culture medium during its growth towards a pH close to 7.90.

We measured the evolution of medium pH all along the exponential growth phase of *V. tapetis* at 14°C (Fig. 4) and 18°C (Fig. 5). In the control samples, the pH changed only slightly during the experiment, resulting in very low slope curves (data not shown). By contrast, in the experimental samples, during the growth of *V. tapetis*, the pHs of the media (which were initially 6 to 8.7) converged to an average value of 7.71, whatever the temperature of growth (Fig. 4 and 5). Therefore, our experiments show that *V. tapetis* is able, during its growth, to modify the pH of its culture medium. More precisely, *V. tapetis* tends to 'neutralize' culture media during its growth, by acidifying alkaline media and alkalinizing acidic media, to make it reach a mean value of 7.7-7.9 whatever the initial pH of the culture medium. However, this effect can be due to either a passive or an active mechanism of this bacterium.

*V. tapetis* CECT4600 modulates external pH during in vitro growth in clams extrapallial fluids or hemolymph.

*V. tapetis* is a marine bacterium mainly studied for its role as a mollusk pathogen, more precisely as the etiologic agent of the Brown Ring Disease which affects the manila clam. Therefore, we aimed at determining whether the bacterium can also modulate the pH of clam biological fluids in which *V. tapetis* is known to proliferate during the infection, ie. the EPFs and the hemolymph. In these experiments, FSSW was used as the reference fluid because it does not allow any growth of *V. tapetis*. Powdered shell fragments were added to each sample in order to design an *in vitro* experiment that is as close as possible of natural conditions and to allow ions exchanges between fluids and shell that might be dependent of the *V. tapetis* growth. The obtained results are shown in the Figure 6. Our experiments showed that in FSSW, to the presence of *V. tapetis* did not lead to any significant change in pH over time. By contrast, in EPFs and hemolymph, exposure to *V. tapetis* led to a significant decrease of pH as compared to the initial conditions after 3 hours of exposure ( $pvalue < 0.001$ ). Indeed, for both clam biological fluids (ie. EPFs and hemolymph), the pH significantly dropped from 7.6 to 7.4 after three hours of *Vibrio* exposure, and then stabilized at approx. 7.25. However, for longer times, the pH also tended to decrease in the controls, so as no significant difference appears between the control samples and the samples exposed to *V. tapetis* for the last time points, thus revealing an interaction only in the first hours of exposure.

***V. tapetis* CECT4600 modulates the pH of extrapallial fluids and hemolymph during *in vivo* infection of the Manila clams.**

EPFs and hemolymph are involved in shell biomineralization and in immunity, respectively, and have therefore a crucial importance in the development of BRD in clams. The previous demonstration that the presence of *V. tapetis* can interfere *in vitro* with the pH of these clam biological fluids led us to hypothesize that this could happen *in vivo*, and that the modulation of pH of these fluids could be an important aspect of the infection process. Monitoring of pH evolution in EPFs and hemolymph after Manila clams infection by *V. tapetis* is presented in Figures 7 and 8, respectively. Both fluids displayed a relatively similar pH evolution following the injection of FSSW or *V. tapetis* in the animals. Considering the whole *in vivo* infection experiment (22 days), we did not observe any significant difference in pH between the control and infected animals. However, we observed a weak but significant difference between the pHs of the EPFs and hemolymph from control and infected clams at 3 days post injection (dpi). Indeed, the pH of these fluids revealed higher (of approx. 0.2 pH unit) in both cases in clams injected with a suspension of *V. tapetis*, as compared to clams injected with FSSW (*pvalue* < 0.02).



## DISCUSSION

pH homeostasis is an essential aspect of cell physiology. It is also one of the main environmental factors controlling the biomineralization of calcified organisms. This explains, at least in part, the current abundance of studies dealing with the impact of ocean acidification on marine mollusks and other calcified marine organisms (Gattuso and Hansson, 2011). The relation between decrease of pH and increase of temperature has been studied in several bivalves species, showing that these two factors can affect the immune response of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Matozzo et al., 2012) and was also shown to influence the abundance of parasites and incidence of bacteria in the blue mussel *Mytilus edulis* (Mackenzie et al., 2014). Finally, pH adaptation is a crucial component of virulence of many pathogenic bacteria which, in addition to having to survive the acid digestive barriers in some hosts, must be able to tolerate acid stress resulting from lysosomal activity after being phagocytized by immune system cells such as macrophages or hemocytes (Asplund et al., 2014).

BRD is typically a disease of clam biomineralization (Paillard et al., 1994). It is also a bacterial disease, in which the phenomenon of phagocytosis, and more specifically the phagosome-lysosome fusion, has a particular importance in the animal's immunity (Paillard, 2004b; Rahmani et al., 2019). For all these reasons, it is surprising that the effect of pH on *V. tapetis* has never been considered to date in the context of the BRD.

In this study we observed that *V. tapetis*, the bacterial etiological agent of BRD, is capable of growing over a wide range of pHs, including at a cold temperature (14°C) which is an optimum for BRD development. Interestingly, we showed that the bacterium, during its growth, had the ability to modify the pH of its environment, increasing it in acidic media, or acidifying it in alkaline ones, and systematically replaced the external pH to a value close to 7.7 during its growth in a kind of 'neutralizing activity'.

The regulation of the internal pH is a necessity for all cell types. Bacteria regulate their intracellular pH by using proton pumps, or by transporting and/or metabolizing several acid or base compounds. For example, *Escherichia coli* response to acid stress involves *amino acid decarboxylase antiporter pairs* and *proton-pumping respiratory chains complexes* causing H<sup>+</sup> ion efflux outside the cell. On the contrary, during alkaline stress, *E. coli* was found to have a strong activation of *NhaA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter*, an up-regulation of ATP synthetase leading to a strong entry of H<sup>+</sup> ion into the cell (Krulwich et al., 2011). *NhaA antiporter* is also present in the genome of *V. tapetis* CECT4600 according to the recently published annotation (Dias et al., 2018), as well as calcium or potassium proton antiporters. Furthermore, the presence of an enzyme such as arginine deiminase in the genome of this pathogen might explain alkalization of external pH observed during acidic stress as already shown in another bacterium (Budin-Verneuil et al., 2006).

Regardless of this internal pH regulation, many bacteria modify the pH of their environment as a result of their energy metabolism. This is particularly the case for many fermentative bacteria producing large quantities of organic acids (e.g. lactic acid, propionic acid, formic acid, etc.) leading to an acidification of their environment (Nuryana et al., 2019). Other bacteria are known to alkalinize their environment, by using organic acids (e.g. lactate, aspartate, glutamate) as carbon and energy sources (Stancik et al., 2002). Nevertheless, these metabolisms are very dependent on the nature of the substrates used by the bacteria, and there are no case, to our knowledge, of bacteria capable of being both acidifying and alkalinizing in the same culture medium, only depending on the initial pH of that medium.

This discovery raises many questions about the bacterium's adaptation mechanisms to pH stress, as well as about the energy metabolism(s) it uses, and the substrates it degrades from the Zobell medium, at the different pHs. This also raises important questions regarding the involvement of this 'neutralizing activity' in the expression of its pathogenicity, in the context of BRD development. We further characterized this last point, by measuring *in vitro* the impact of the bacterial growth on the pH of the main biological fluids of the Manila clams, ie. extrapallial fluids and hemolymph, and then *in vivo*, the pH of these fluids in a context of infection.

First, we observed that in the first three hours after exposure to *V. tapetis*, the pH of the two fluids decreased significantly more than that of the control. EPFs and hemolymph contain hemocytes, which are the main cellular actors of the immune

system and one of the main targets of the pathogen. In a previous study, the authors demonstrated that the cytotoxicity of the bacterium to hemocytes was maximal, *in vitro*, after three hours of exposure to the pathogen (8). *V. tapetis* is able to induce deregulations of hemocytes physiology as reorganization of actin cytoskeleton, reduction of lysosomal activity and down regulation of genes related to the complement pathway (Rahmani et al., 2019). The decrease in pH in the first three hours of exposure could be due to the growth of the pathogen and could be related (either as a cause or a consequence) to its cytotoxic effect on clam hemocytes where the influence of the bacterium is maximum.

Second, after a 21 days infection by *V. tapetis*, monitoring of pH evolution in the EPFs and hemolymph revealed that pH significantly increased at 3 d.p.i. in infected clams, as compared to control ones, in these two-particular fluid compartments. BRD is a chronic infection, as the pathogen does not induce mortalities in the classical way of infection and can persist in infected animals (Paillard, 2016). Indeed, the acute phase of the infection is divided into two parts: a first one characterized by an increase of *V. tapetis* concentration followed by the production of a brown deposit on the inner part of the shell, and a second one, which is not always present, characterized by shell repair that can lead to the complete remission of clams (Paillard, 2016). Based on the mode of infection chosen during our experiment, we are able to recreate the first stages of BRD by allowing the pathogen to reproduce all the early steps of BRD and

then induce an acute phase of infection until formation of the brown deposit. The fact that *V. tapetis* is able to modulate the pH of such compartments of the Manila clam during BRD questioned the impact of this factor in the development of BRD itself. Indeed, pH is known to modulate the virulence of many pathogenic bacteria. In *Vibrio cholerae*, for example, it has been shown that the protein ToxR, which is responsible for the regulation of many virulence genes, is also strongly involved in the response to acid stress, suggesting a close relationship between the virulence and the acid stress response in this pathogen (Lund et al., 2014; Merrell and Camilli, 2002). In *Pseudomonas aeruginosa*, it has been shown that the infection was attenuated at pH 6 rather than pH 7.6, and that the bacterium expresses genes that allow it to alkalinize the medium at acidic pH, while at neutral pH, it preferentially expresses iron metabolism-related genes (Romanowski et al., 2011).

Dynamics of BRD and kinetics of *V. tapetis* in EPFs have been well characterized. In the first hours of infection, the pathogen colonizes and degrades the periostracal lamina in order to enter extrapallial fluids, and then colonizes the shell secretion (Paillard and Maes, 1995). This period corresponds to an increase of *V. tapetis* concentration in this compartment (Bidault et al., 2015). Between 2 days and 7 days d.p.i. the EPFs concentration of *V. tapetis* reaches its maximum value (Bidault et al., 2015), which corresponds to an increase of pH in EPFs according to our study where significant differences of pH have been observed in infected animals after 3 days (*in*

*vivo*). It should also be noted that an increase of pH has also been reported in hemolymph at 3 d.p.i., thus probably revealing the changes that occurs in this compartment at the biochemical level during BRD (Allam et al., 2006).

In addition, we know that during infection, major changes occur in EPFs at the enzymatic level with, for example, an increase in the activity of phenoloxidase, an enzyme involved in the humoral response and melanization which leads to the brown deposit production (Söderhäll and Cerenius, 1998). Previous studies showed that phenoloxidase activity is sensitive to abiotic factors such as pH. Indeed, phenoloxidase activity decrease with pH in a range of physiological values in the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus*, mostly in the hemolymph compartment (Le Bris, 2013; Tanner et al., 2006). Thus, increasing the pH in a range of physiological values in both hemolymph and EPFs would modulate phenoloxidase activity in these two compartments and then probably the melanization process associated to the bacterial embedding within shell matrix.

After the first week of infection, the concentration of *V. tapetis* in EPFs decreases as the bacteria are encapsulated in the newly-formed brown deposit (Bidault et al., 2015). After 2 to 3 weeks of infection, the pathogen can be detected again in EPFs, but in lower concentration than during the first week (Bidault et al., 2015), suggesting a new equilibrium between the formation of the brown deposit and the persistence

of *V. tapetis* in EPFs. This phenomenon could explain the absence of pH modification during the end of the experiment.

Finally, we can formulate the hypothesis that the change in pH of Manila clam EPFs, in the first days of BRD development might be in correlation with the increase of *V. tapetis* concentration in this compartment, the bacterium inducing major changes that allow the pathogen to enter the extrapallial compartment and to hijack the immune function of hemocytes in order to grow and to persist in the Manila clam.

Our experiments have shown a close interaction between *V. tapetis* CECT4600, a pathogen of Manila clam that induces BRD, and the pH of different compartments of the animals during infection. This pathogen is able, *in vitro*, to influence the pH of its culture medium during its growth, towards a so-called "neutralizing activity" that allows to reach a pH value lower than the pH of seawater. Under *in vitro* and *in vivo* conditions, we were able to observe a change in the pH of the extrapallial fluids and hemolymph of the animal that should be related to the dynamics of the pathogen during infection of the Manila clam. These results tend to prove that the bacterium, through a direct mechanism or as a consequence of physiological changes encountered in the animal during infection, alters the pH of the hemolymph and extrapallial fluids, and could by this way promote the infection process or at least create an imbalance within the animal, that would favor its persistence.

## **AUTHORS CONTRIBUTIONS**

AR designed the protocols with help of AB, NLG and CP and VP. AR performed *in vitro* experiments on *V. tapetis*. AR and CM performed *in vitro* and *in vivo* experiment on Manila clams challenged by *V. tapetis*. AR, VP and CP wrote the article (the original draft was written by AR). This article was carefully reviewed by other co-authors, who all approved the final version.

## **FUNDINGS**

This project received grants from the H2020 European project "VIVALDI" (grant agreement N°678589). This work was also supported by the "Université de Bretagne Occidentale" (UBO, France), and the "investment for the future" programs LabexMER (ANR-10-LABX-19) and ISblue (ANR-17-EURE-0015).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We warmly thank Jean François AUVRAY from the SATMAR company of Landeda (Finistère, France) for providing the clams. We also warmly thank Eric DABAS for helping with zootechnical support.



## CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest declared.

## REFERENCES

- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: II. Cellular and biochemical changes following *in vivo* challenge. *Fish & shellfish immunology* 20, 384–397.
- Allam, B., Pales Espinosa, E., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C., Paillard, C., 2014. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease. *Fish & Shellfish Immunology* 41, 2–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.022>
- Asplund, M.E., Baden, S.P., Russ, S., Ellis, R.P., Gong, N., Hernroth, B.E., 2014. Ocean acidification and host–pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environ Microbiol* 16, 1029–1039.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12307>
- Bidault, A., Richard, G.G., Le Bris, C., Paillard, C., 2015. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ* 3, e1484. <https://doi.org/10.7717/peerj.1484>
- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 480–484.
- Budin-Verneuil, A., Maguin, E., Auffray, Y., Ehrlich, D.S., Pichereau, V., 2006. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Can. J. Microbiol.* 52, 617–622.  
<https://doi.org/10.1139/w06-009>
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 57, 109–116.
- Dias, G.M., Bidault, A., Le Chevalier, P., Choquet, G., Der Sarkissian, C., Orlando, L., Medigue, C., Barbe, V., Mangenot, S., Thompson, C.C., 2018. *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs. *Frontiers in microbiology* 9, 227.
- Gattuso, J.-Pierre., Hansson, Lina., 2011. Ocean acidification. Oxford University Press, Oxford ;
- Gouletquer, P., Héral, M., Béchemin, C., Richard, P., 1989. Anomalies de calcification chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*: caractérisation et comparaison des compositions en acides aminés de différentes parties de la coquille analysées par HPLC. *Aquaculture* 81, 169–183.
- Ivanina, A.V., Dickinson, G.H., Matoo, O.B., Bagwe, R., Dickinson, A., Beniash, E.,

Sokolova, I.M., 2013. Interactive effects of elevated temperature and CO<sub>2</sub> levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166, 101–111.

Krulwich, T.A., Sachs, G., Padan, E., 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9, 330–343.

Le Bris, C., 2013. Le système phénoloxydase: caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*. Université de Bretagne occidentale-Brest.

Li, S., Liu, C., Huang, J., Liu, Y., Zheng, G., Xie, L., Zhang, R., 2015. Interactive effects of seawater acidification and elevated temperature on biomineralization and amino acid metabolism in the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Biology* 218, 3623–3631. <https://doi.org/10.1242/jeb.126748>

Lund, P., Tramonti, A., De Biase, D., 2014. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 38, 1091–1125. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076>

Mackenzie, C.L., Lynch, S.A., Culloty, S.C., Malham, S.K., 2014. Future Oceanic Warming and Acidification Alter Immune Response and Disease Status in a Commercial Shellfish Species, *Mytilus edulis* L. *PLOS ONE* 9, e99712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099712>

Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Finos, L., Bressan, M., Marin, M.G., 2012. First Evidence of Immunomodulation in Bivalves under Seawater Acidification and Increased Temperature. *PLOS ONE* 7, e33820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033820>

Merrell, D., Camilli, A., 2002. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 5, 51–55. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00285-0)

Nuryana, I., Andriani, A., Lisdiyanti, P., Yopi, 2019. Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 251, 012054. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/251/1/012054>

Paillard, 2004a. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467–475. <https://doi.org/10.1051/alr:2004053>

Paillard, 2004b. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest.

Paillard, C., 2016. An ecological approach to understanding host-pathogen-environment interactions: the case of Brown Ring Disease in clams, in: J.L. Romalde (Ed.), *Oysters and clams: cultivation, habitat threats and ecological impact*, 7

Microbiology Research Advances, Nova Publishers, 2016:228p.

Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue and Cell* 25, 183–194. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(93\)90018-G](https://doi.org/10.1016/0040-8166(93)90018-G)

Paillard, C., Maes, P., 1990. Aetiology of brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series 3, Sciences de la Vie* 310, 15–20.

Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 219–240. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90030-2)

Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 309, 235–241.

Paillard, C., Maes, P., 1995. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*. Part 1. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 91–100. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1015>

Rahmani, A., Corre, E., Richard, G., Bidault, A., Lambert, C., Oliveira, L., Thompson, C., Thompson, F., Pichereau, V., Paillard, C., 2019. Transcriptomic analysis of clam extrapallial fluids reveals immunity and cytoskeleton alterations in the first week of Brown Ring Disease development. *Fish & Shellfish Immunology* 93, 940–948. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.025>

Romanowski, K., Zaborin, A., Fernandez, H., Poroyko, V., Valuckaite, V., Gerdes, S., Liu, D.C., Zaborina, O.Y., Alverdy, J.C., 2011. Prevention of siderophore-mediated gut-derived sepsis due to *P. aeruginosa* can be achieved without iron provision by maintaining local phosphate abundance: role of pH. *BMC Microbiology* 11, 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-212>

Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)

Stancik, L.M., Stancik, D.M., Schmidt, B., Barnhart, D.M., Yoncheva, Y.N., Slonczewski, J.L., 2002. pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 4246–4258. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4246-4258.2002>

Tanner, C.A., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2006. The effects of hypoxia and pH on phenoloxidase activity in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144, 218–223.

Taylor, J D, Kennedy, W J, Hall, A, 1973. The Shell Structure and Mineralogy of the Bivalvia. II. Lucinacea-Clavagellacea. Conclusions. *Bulletin of the British Museum*

(Natural History), Zoology, London 22, 253–294.

Trinkler, N., 2009. La guérison coquillière: un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest.

Trinkler, N., Bardeau, J., Marin, F., Labonne, M., Jolivet, A., Crassous, P., Paillard, C., 2011. Mineral phase in shell repair of Manila clam *Venerupis philippinarum* affected by brown ring disease. Dis. Aquat. Org. 93, 149–162.  
<https://doi.org/10.3354/dao02288>

Wood, H.L., Spicer, J.I., Widdicombe, S., 2008. Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 275, 1767–1773.

Zobell, C., 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J Mar Res 4, 41–75.

FIGURES AND TABLES

Figure 1: pH evolution of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 14°C, 18° and 21°C in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates) ..... 230

Figure 2: pH variance of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 14°, 18° and 21°C in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates) ..... 231

Figure 3: pH evolution of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 27° in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates) ..... 232

Figure 4: pH evolution of a culture of *V. tapetis* during exponential growth phase at 14°C, in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) ..... 233

Figure 5: evolution of a culture of *V. tapetis* during exponential growth phase at 18°C, in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) ..... 234

Figure 6: pH evolution after *V. tapetis* exposure in FSSW (Filtered sterilized Seawater), EPF (extrapallial fluids) and Hemolymph (He) mixed with Manila clam shell. \*\* : pvalue=0.0017 ; \*\*\*=pvalue=0.0007, Student test ..... 235

Figure 7: pH evolution in EPFs (extrapallial fluids) after infection by *V. tapetis* of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. ..... 236

Figure 8: pH evolution in Hemolymph after infection by *V. tapetis* of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. ..... 237

Table 1: growth parameters of *V. tapetis* after growth in different range of pH and temperature. DT : doubling Time ; OD : Optic Density, T° : Temperature; h: hour ..... 238

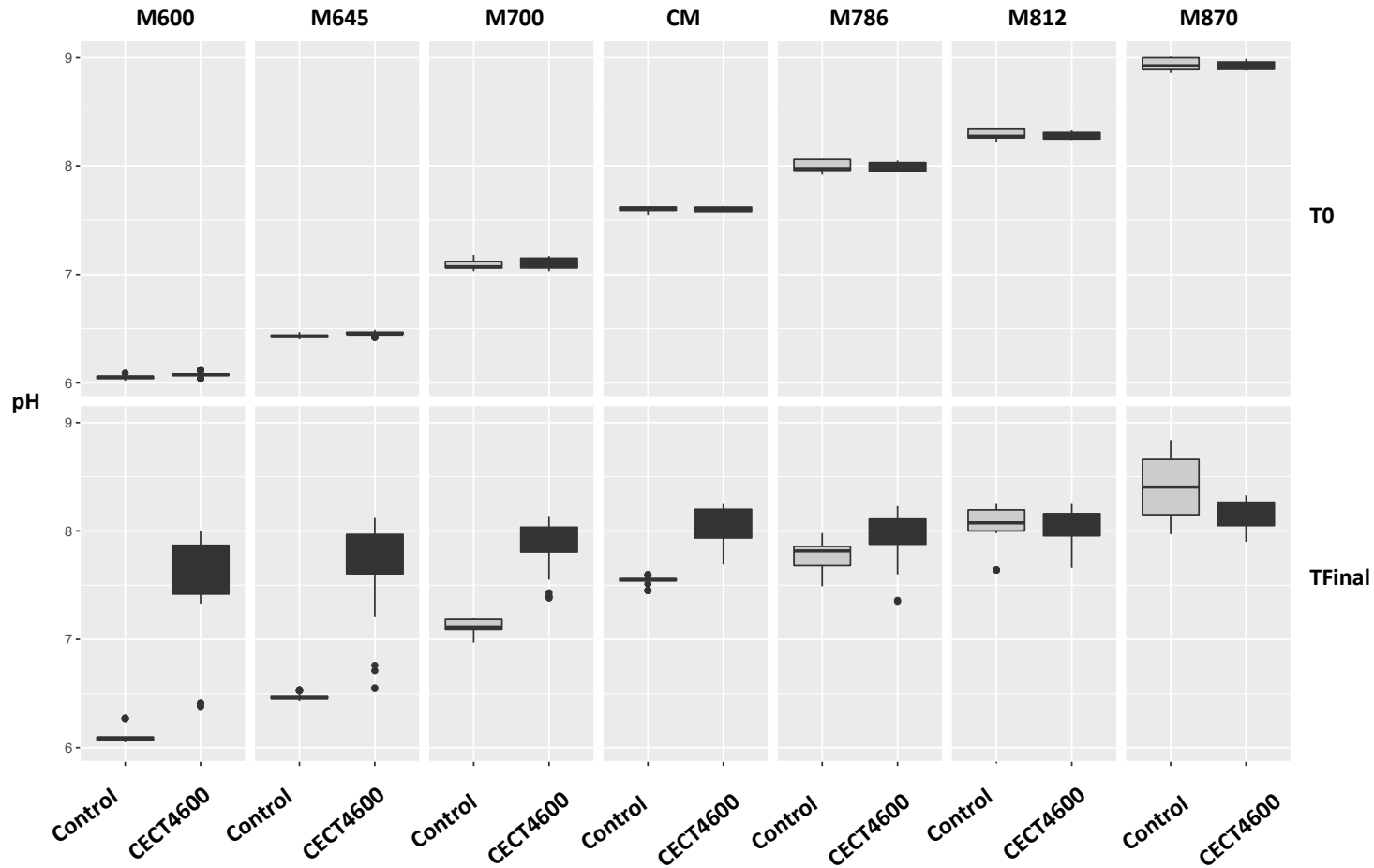


Figure 1: pH evolution of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 14°C, 18° and 21°C in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates)

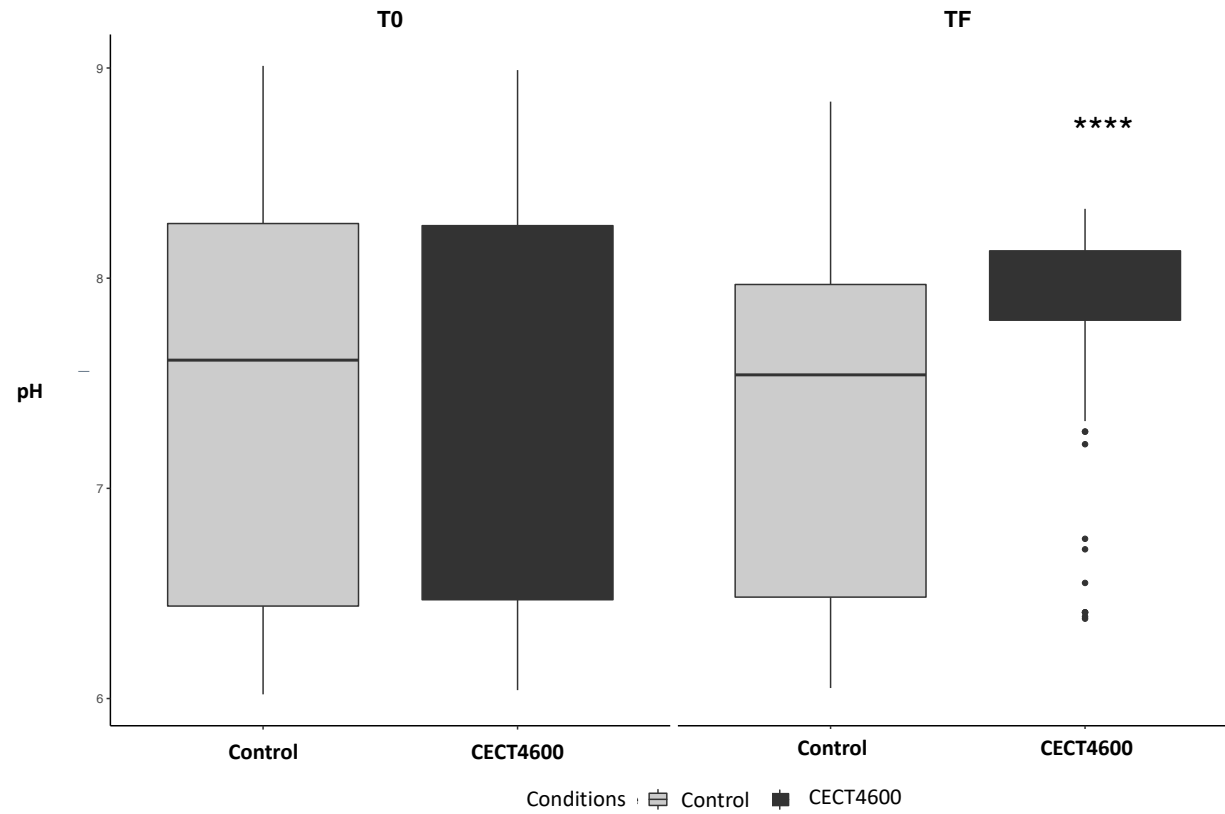


Figure 2: pH variance of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 14°, 18° and 21°C in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates)

\*\*\*\* : pvalue < 0.0001, Student test



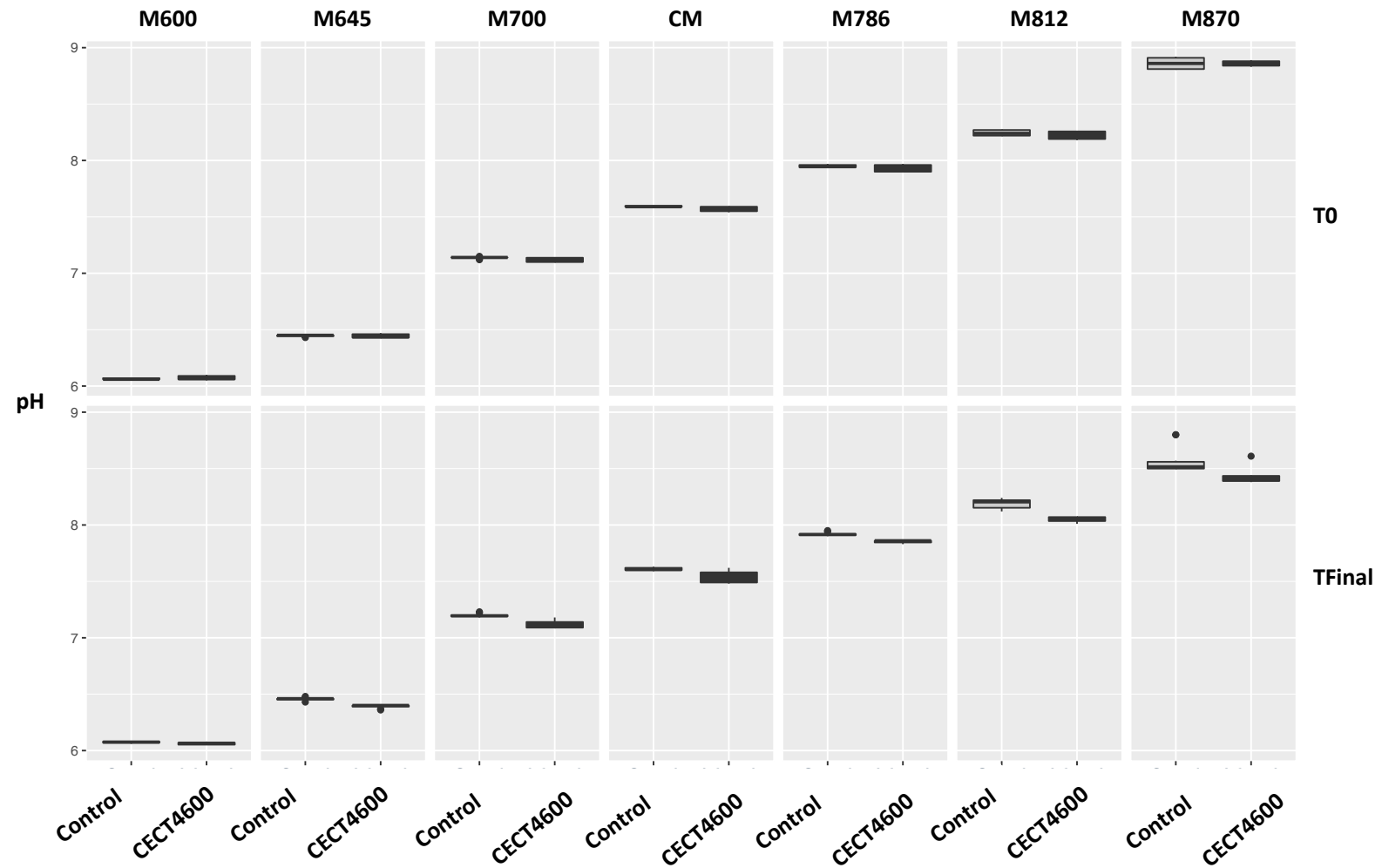


Figure 3: pH evolution of a *V. tapetis* CECT4600 culture after growth at 27° in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870) (15 replicates)

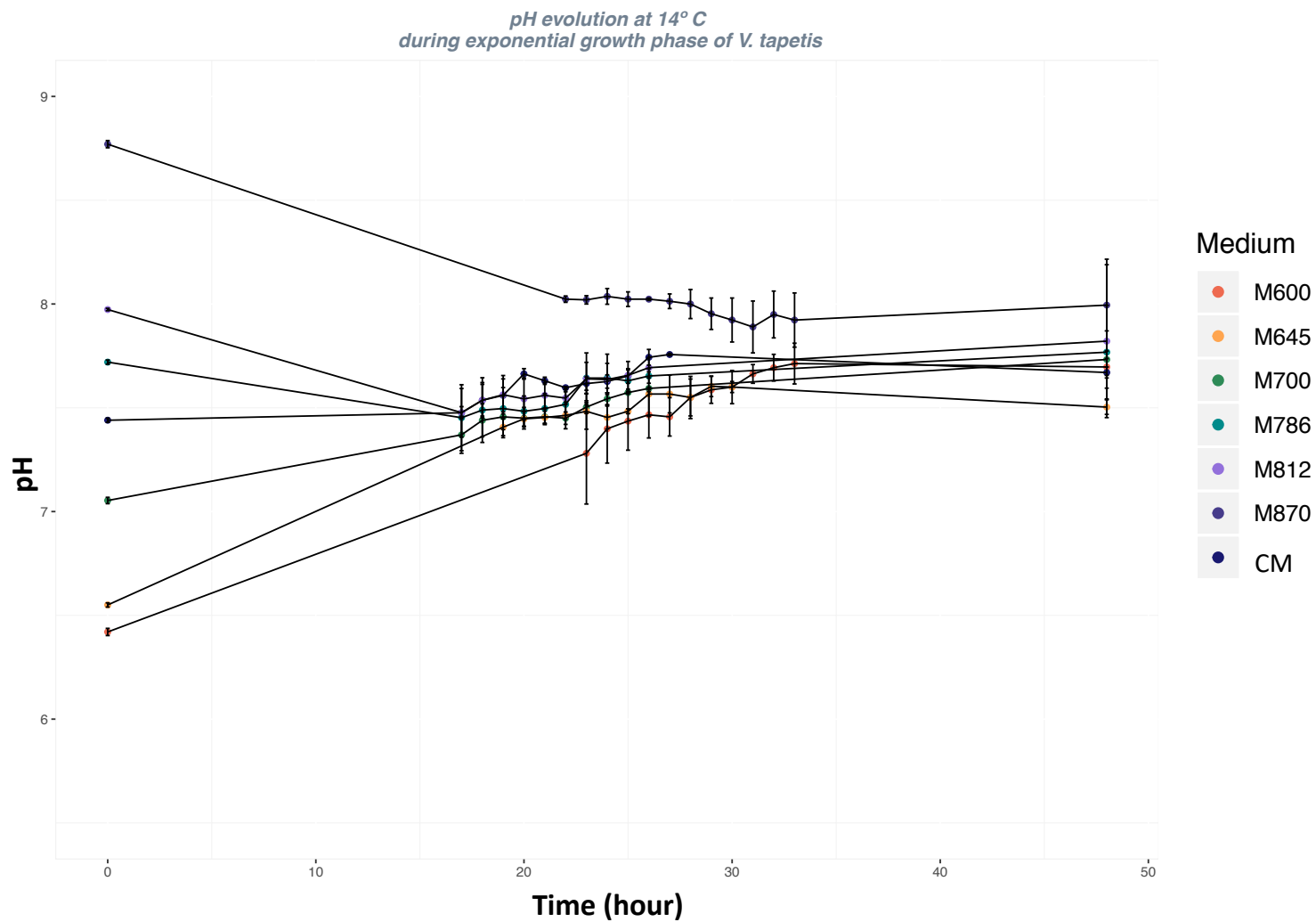


Figure 4: pH evolution of a culture of *V. tapetis* during exponential growth phase at 14°C, in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870)

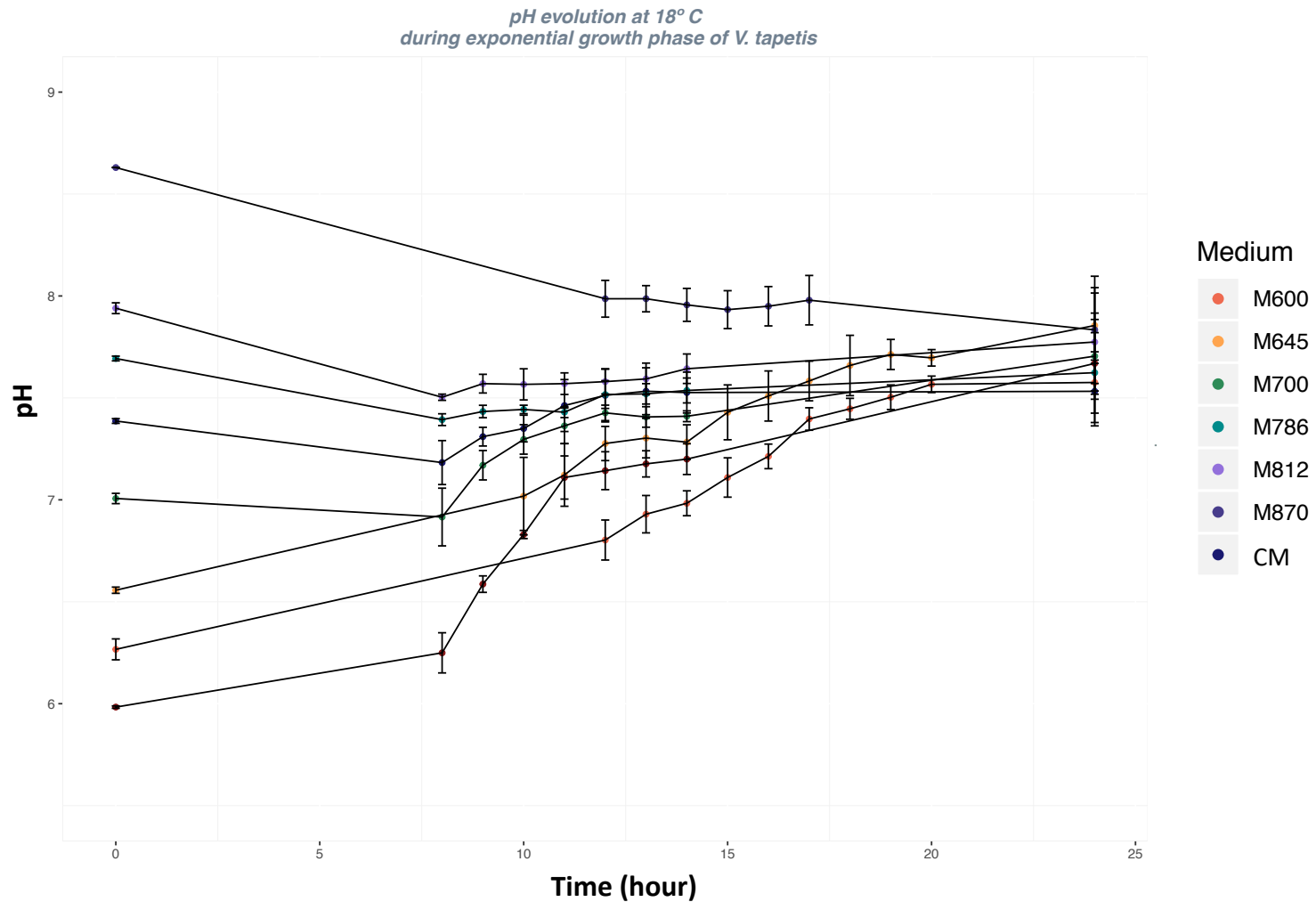


Figure 5: evolution of a culture of *V. tapetis* during exponential growth phase at 18°C, in pH adjusted Zobell media from 6.00 (M600) to 8.70 (M870)

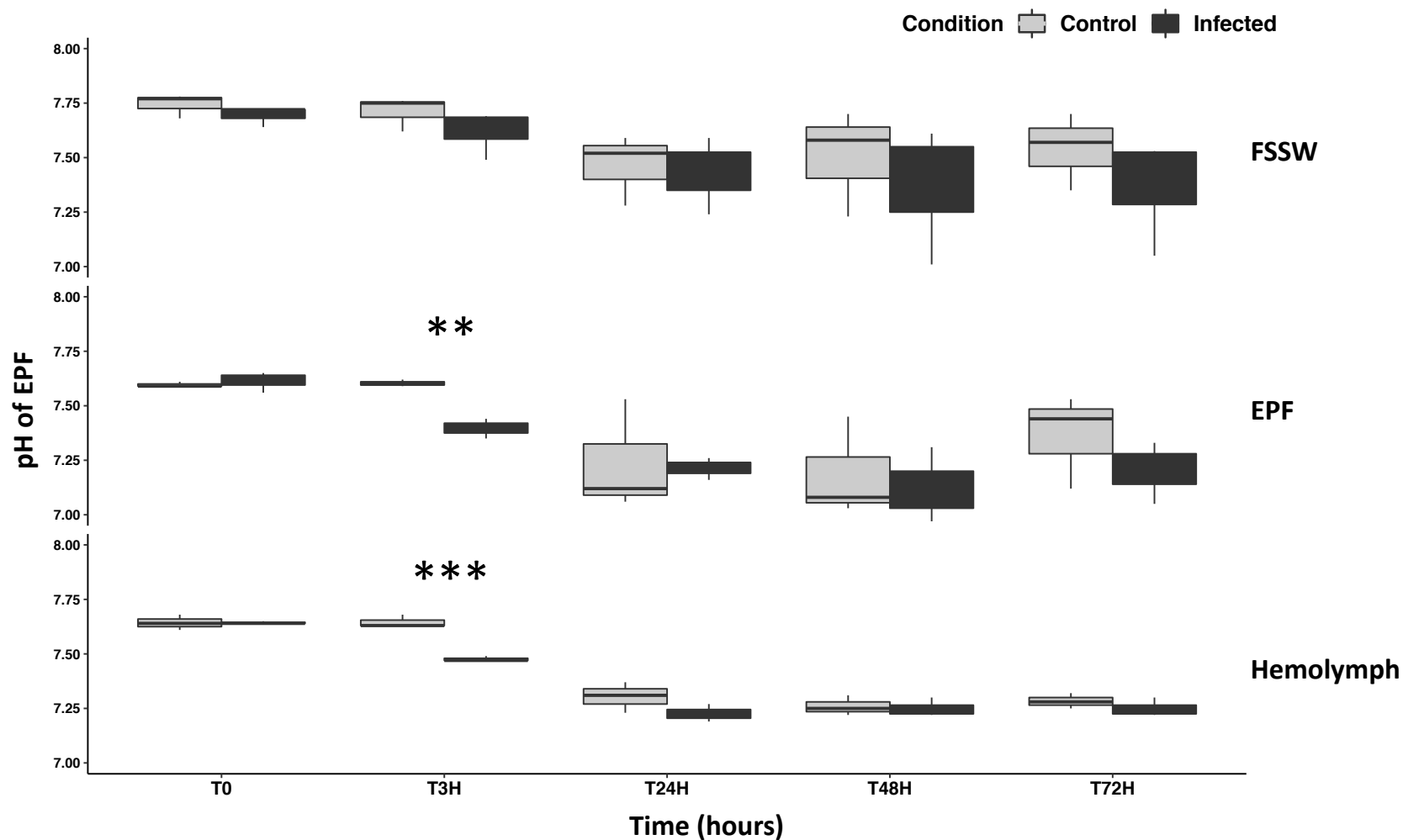


Figure 6: pH evolution after *V. tapetis* exposure in FSSW (Filtered sterilized Seawater), EPF (extrapallial fluids) and Hemolymph (He) mixed with Manila clam shell. \*\* : pvalue=0.0017 ; \*\*\*=pvalue=0.0007, Student test

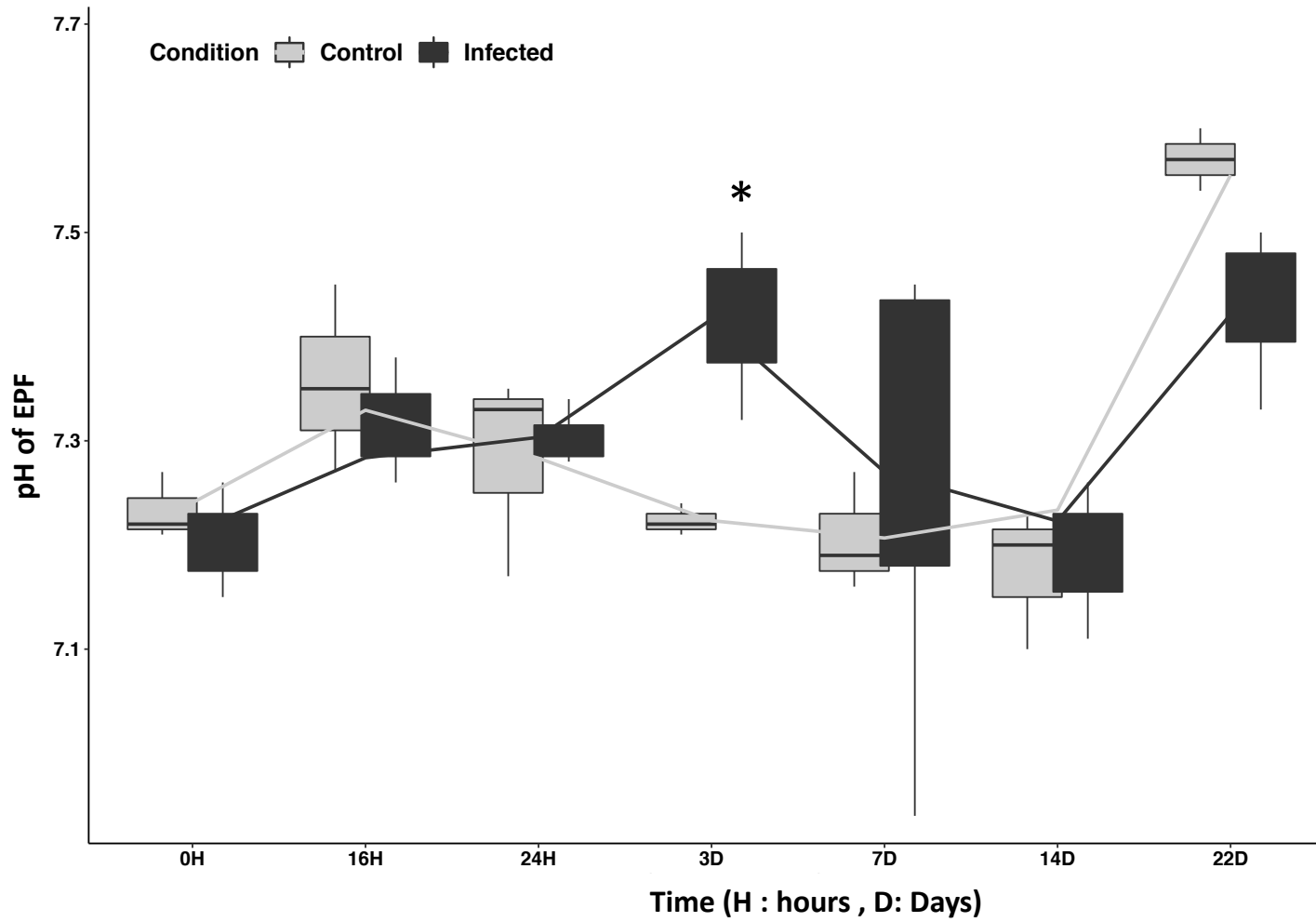


Figure 7: pH evolution in EPFs (extrapallial fluids) after infection by *V. tapetis* of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

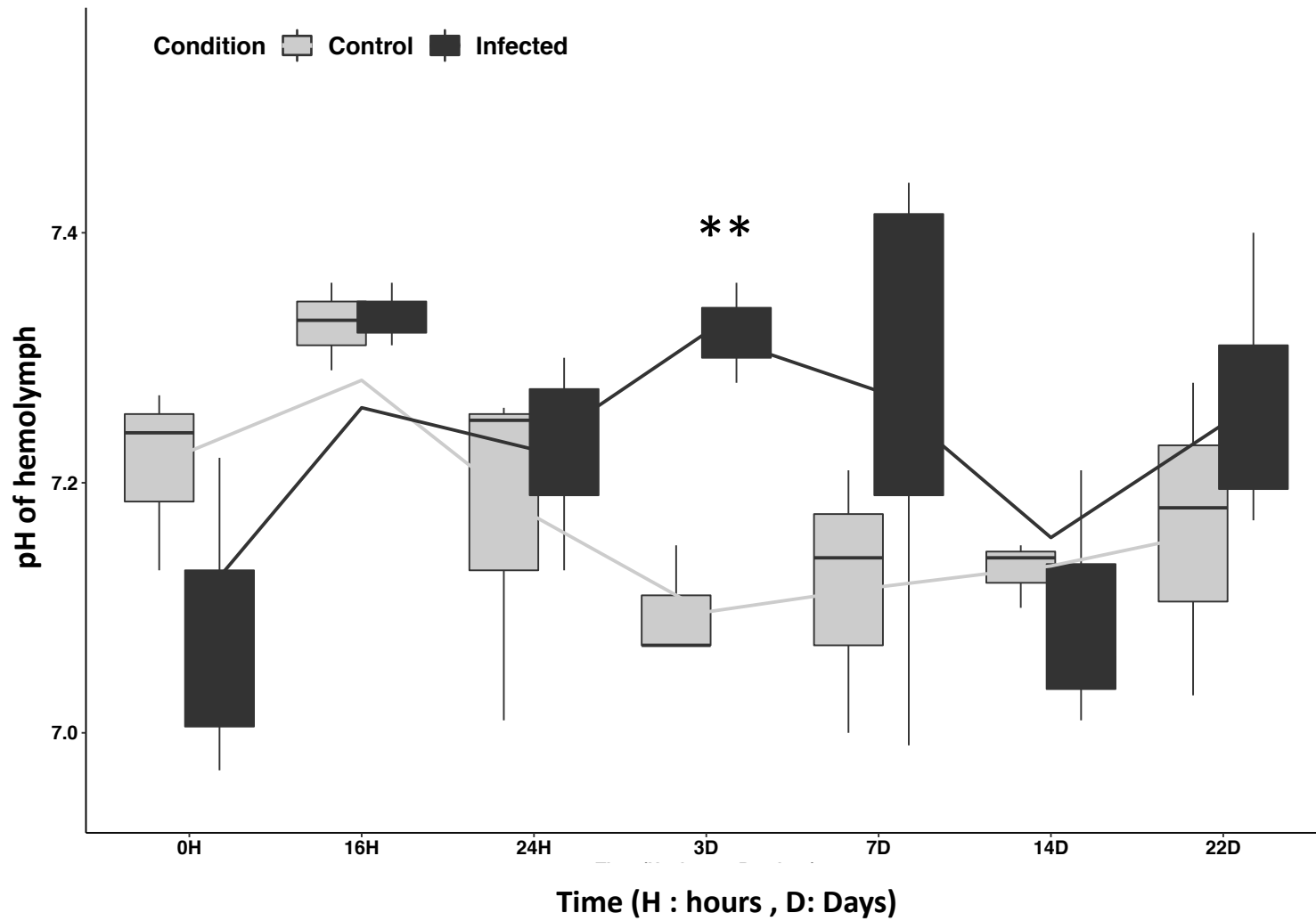


Figure 8: pH evolution in Hemolymph after infection by *V. tapetis* of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*.

Table 1: growth parameters of *V. tapetis* after growth in different range of pH and temperature. DT : doubling Time ; OD : Optic

Density, T° : Temperature; h: hour

<i>V. tapetis</i> CECT4600 growth															
T°	Time of growth	M600		M645		M700		MC		M786		M812		M870	
		DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>	DT (h)	Maximum OD <sub>492</sub>
14°C	31H	5,00	0,945	3,31	1,121	3,39	1,155	3,15	1,047	3,50	1,128	3,16	1,143	7,03	0,946
18°C	24H	2,37	1,201	1,85	1,220	1,95	1,214	2,00	1,120	1,79	1,178	2,42	1,245	3,54	1,010
21°C	24H	2,19	1,231	1,93	1,204	2,30	1,207	2,50	1,167	2,83	1,201	2,52	1,223	3,97	1,061
27°C	24H	0	0,012	0	0,024	0	0,033	0	0,06	0	0,021	0	0,021	0	0,031

## Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence la capacité de *V. tapetis* à modifier le pH lors de sa croissance vers une valeur proche de 7.70 dans un milieu de culture riche. En présence de fluides et de fragments de coquille provenant de palourdes japonaises, la pathogène est alors capable de faire baisser le pH des fluides de l'animal après 3H d'exposition. Cette modification est probablement en étroite corrélation avec la capacité de *V. tapetis* à induire des modifications chez les hémocytes justement après 3H d'exposition. Enfin, après avoir mesuré le pH des fluides de palourdes expérimentalement infectées, nous avons démontré la capacité de la bactérie à augmenter le pH dans les fluides chez les animaux infectés. Ces modifications suivent la dynamique du pathogène déjà démontrée dans les FEPs avec des modifications significatives du pH *in vivo* dans la période où la concentration du pathogène est la plus élevée dans les FEPs. Cette étude est la première à s'intéresser à la relation pH – MAB et ouvre la voie à de nouvelles expérimentations dans le but de mieux comprendre les mécanismes liés à ces modifications dues à *V. tapetis*.





## DISCUSSION GENERALE

---

L'étude de la maladie de l'anneau brun, touchant les palourdes japonaises de l'espèce *Ruditapes philippinarum*, a débuté dans les années 80 avec les thèses de doctorat de Christine Paillard (Paillard, 1992) et Philippe Maes (Maes, 1992) à l'Université de Bretagne Occidentale. Grâce à l'isolement de *Vibrio tapetis*, la bactérie responsable de cette maladie, de nombreuses études ont permis depuis lors de mieux caractériser d'une part les conséquences de la maladie sur les palourdes japonaises infectées et d'autre part de mieux comprendre la dynamique de cette maladie. La souche de référence dans le cadre de la MAB est *V. tapetis* CECT4600. Cette souche a été l'objet de la majorité des études sur cette espèce bactérienne. Néanmoins, de nombreuses souches de *V. tapetis* ont été isolées à travers le monde depuis les années 80, associées à des symptômes de MAB ou à des lésions touchant différentes espèces de poissons. Si les symptômes et les conséquences physiologiques de la maladie chez la palourde japonaise sont aujourd'hui bien caractérisés, les facteurs permettant au pathogène d'induire cette infection sont aujourd'hui encore peu connus. **La problématique principale de cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes mis en place par le pathogène induisant le développement de la MAB chez la palourde japonaise.** Pour y répondre, nous avons développé un travail de recherche basé sur quatre problématiques, contenues dans 2 axes de recherches, virulence et interaction hôte-pathogène, ciblant des étapes clés de l'infection et visant à mieux comprendre les mécanismes de la MAB.

La première problématique était : **Quels sont les gènes impliqués dans la virulence de *V. tapetis* ?**

### Le T4SS est impliqué dans le développement de la MAB et dans la dynamique des mortalités après injection dans le muscle adducteur

Pour cela, nous avons développé des outils de mutagenèse ciblée nous permettant de supprimer un gène d'intérêt, afin de travailler sur des souches isogéniques de *V. tapetis* ne différant que d'un seul et unique gène. Mettre en place les outils permettant d'obtenir une souche dite « mutante » fut la principale difficulté, puisqu'un seul 1 mutant de délétion (*V. tapetis*  $\Delta$ *djla*, (Lakhal et al., 2008)) avait été obtenu chez *V. tapetis* plus de 10 ans auparavant. En effet, la technique nécessite l'intégration d'un plasmide au génome de la bactérie, ce qui s'est révélé particulièrement difficile, probablement en raison de la présence de nombreux système de restriction modification de type I dans le génome de *V. tapetis* lui permettant de reconnaître et dégrader l'ADN exogène. Néanmoins, grâce au

---

développement d'une technique de conjugaison en conditions sub-létales, nous avons réussi à obtenir une souche dans laquelle le gène *virB4*, codant une ATPase du système de sécrétion de type IV (T4SS), est absent. Grâce à cela, nous avons pu mieux comprendre les mécanismes liés au développement de la MAB en démontrant que le T4SS n'était pas impliqué dans l'arrondissement des hémocytes au cours de l'infection, ni dans la diminution de l'activité lysosomale *in vitro*. Néanmoins, nous avons prouvé que l'absence de T4SS induit une réduction de 50% de la MAB au cours de l'infection ainsi qu'une diminution des taux de mortalités lors de l'injection du pathogène dans le muscle adducteur *in vivo* chez la palourde japonaise. Ces résultats peuvent être comparés aux infections *in vivo* réalisées à partir de souches de *V. tapetis* ne portant pas le cluster de gènes codant pour le T4SS. Par exemple, lorsque la souche *V. tapetis* LP2 est injectée dans la cavité palléale, elle n'induit pas de MAB (Choquet, 2004; Dias et al., 2018). En revanche, lorsque cette barrière est traversée, à savoir l'injection directement dans la cavité extra-palléale, cette souche est capable d'induire jusqu'à 75% de MAB quand la souche de CECT4600 induit, elle, 100% de MAB (Le Bris et al., 2015).

Ainsi, nos résultats permettent d'émettre l'hypothèse que le T4SS, qui est présent spécifiquement dans les souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes, pourraient être impliqué dans les premières étapes de colonisation du pathogène ou bien dans le processus de mélanisation des matrices organiques coquillières, entraînant le dépôt brun en réaction à l'infection. En revanche, nous ne connaissons pas l'influence du T4SS dans la capacité de survie du pathogène dans les vacuoles ni même au sein des hémocytes. Il est aussi possible d'émettre des hypothèses quant à l'importance du T4SS dans la capacité de survie du pathogène au sein du compartiment extra palléal. En effet, ce système de sécrétion pourrait être impliqué dans la manipulation du système immunitaire, au travers d'effecteurs agissant sur des processus tels que la phagocytose ou l'autophagie, entraînant alors une capacité de survie réduite à l'intérieur des hémocytes chez la souche ne possédant plus le T4SS. Cette dernière serait alors éliminée plus rapidement, entraînant alors une prévalence de MAB plus faible. Le développement de protocoles couplant des techniques de cytométrie en flux à de la microscopie permettrait d'étudier plusieurs de ces processus afin de mieux comprendre le rôle du T4SS dans la MAB.

Nous avons ainsi démontré que le T4SS, bien que jouant un rôle important dans l'infection, n'était pas essentiel au développement de la MAB. Récemment, une étude comparant les mécanismes d'infections de différentes espèces de *Vibrios* pathogènes chez l'huître a démontré que les mécanismes moléculaires d'infections d'un même

hôte pouvaient être dépendants de l'espèce pathogène, mettant en exergue que les mécanismes d'échappement du système immunitaire pouvaient être différents selon l'espèce pathogène concernée (Rubio et al., 2019). Ici, nous avons mis en exergue une cause probablement multigéniques de la MAB au sein d'une même espèce. Ces travaux remettent alors en cause le postulat selon lequel les souches de *V. tapetis* capables d'induire la MAB possèderait nécessairement les gènes du T4SS. Le travail décrit dans la section précédente est donc en étroite relation avec la seconde problématique étudiée au cours de cette thèse : **Existe-t-il des marqueurs hôtes-spécifiques de la virulence de *V. tapetis* ?**

### La technique MALDI-TOF permet de discriminer les souches de *V. tapetis* en fonction de leur pouvoir pathogène vis à vis de la palourde japonaise

Pour répondre à cette problématique, nous avons travaillé en collaboration avec une équipe du département de bactériologie, pathologie et maladies aviaires de l'université de Gand (Belgique). Cette collaboration s'inscrit dans le cadre de l'émergence d'isolats appartenant à l'espèce *V. tapetis* à partir de poissons présentant des ulcérations de la peau. En effet, pas moins de 12 souches de *V. tapetis* ont été isolées à partir de la limande commune *Limanda limanda* (Vercauteren et al., 2019, 2018). Nous avons pu allier le savoir-faire de nos deux laboratoires en matière de biotests appliqués aux palourdes japonaises et aux poissons pour étudier la virulence de ces souches pathogènes au travers de tests *in vitro*. De plus, nous avons pu corrélérer ces résultats avec l'analyse de 29 isolats de *V. tapetis* grâce à la technique MALDI-TOF. Grâce à cette collaboration, nous avons pu développer une approche de « strains typing » nous permettant de discriminer les souches de *V. tapetis* en fonction de leur pouvoir pathogène vis à vis de la palourde japonaise. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois la présence du gène *virB4* chez des souches de *V. tapetis* issues de poissons et ne présentant pas la capacité d'induire un arrondissement des hémocytes (i.e. non virulente *in vitro*).

En mettant en perspectives ces deux études, nous avons pu d'une part déterminer des marqueurs hôtes spécifiques de virulence et d'autre part améliorer notre compréhension du T4SS dans le développement de la MAB. **Le fait que certaines souches non cytotoxiques portent le gène *virB4* est en corrélation avec les résultats de mutagénèse ciblée indiquant que le T4SS n'est pas impliqué dans la perte d'adhérence des hémocytes découlant de la perte des pseudopodes, *in vitro*.** Néanmoins, ces souches seraient-elles capables d'induire la MAB *in vivo* ? Les

---

expériences d'infections réalisées avec d'autres souches de *V. tapetis* isolées d'espèces de poissons différentes (Bidault et al., 2015; Choquet, 2004; Le Bris, 2013) ont démontré que ces souches ne sont pas capables d'induire la MAB lors de l'injection dans la cavité palléale de l'animal. Néanmoins, aucune de ces souches ne portait le gène *virB4*. Ce dernier est important mais pas essentiel dans le développement de la MAB ainsi, les isolats de limande commune seraient peut-être capables d'induire des symptômes de MAB à un taux plus faible que la souche CECT4600. Toutefois, mise à part la souche 2BB présentant un niveau de virulence intermédiaire *in vitro*, le fait que les isolats de limande ne présentent pas de capacités d'arrondissement des hémocytes, comme les précédentes souches de poissons isolées, laisse à penser que ces souches ne sont probablement pas capables d'induire la MAB dans la dynamique classique de l'infection. De plus, ces recherches questionnent sur la robustesse de l'outil de détection du gène *virB4* pour la mise en évidence de souches pathogènes de palourde dans un contexte de diagnostic. Ainsi, la technique MALDI-TOF, en plus d'être rapide et reproductible, pourrait être un outil plus adapté à des usages diagnostiques.

La perte d'adhérence est un élément clé de l'étude de la virulence chez les isolats de *V. tapetis*. Elle fait partie des modifications physiologiques associée à la MAB et au détournement du système immunitaire. Cependant, les mécanismes moléculaires associés à ces changements étaient encore peu connus. Dans l'étude de l'interaction hôte-pathogène, nous avons voulu caractériser les voies moléculaires impliquées dans la MAB en répondant à la problématique : **Quels sont les gènes exprimés lors de l'infection chez l'hôte ?**

#### La MAB implique une dérégulation du système immunitaire à travers la voie du complément et une réorganisation du cytosquelette d'actine

Grâce à une approche transcriptomique de type RNA-seq, nous avons étudié les gènes différentiellement exprimés lors de l'infection de palourdes japonaise dans les fluides extra-palléaux. Cette approche est la première analyse se basant sur l'ensemble des transcrits différentiellement exprimés après une infection expérimentale directement dans le compartiment extra-palléal. En effet, de précédentes études ont utilisé une approche de SSH (Suppression Subtractive Hybridization) appliquée à l'hémolymphe ou au manteau de palourdes infectées par *V. tapetis* CECT4600 dans un contexte de réparation coquillère (Jeffroy et al., 2013), ou bien appliquée à de l'hémolymphe directement exposée à ce pathogène (Brulle

et al., 2012). Ces études ont démontré respectivement une dérégulation de gènes impliqués dans le système immunitaire et dans la biominéralisation de la coquille, mais aussi dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Une seconde approche en Oligoarrays (puce à ADN) appliquée à des animaux récoltés dans l'environnement et présentant des symptômes de MAB à révéler une dérégulation des gènes impliqués dans la reconnaissance du pathogène, la régulation de l'apoptose ou encore la biominéralisation (Allam et al., 2014).

Dans notre étude, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la transcription de gènes impliqués dans le système du complément via les protéines *C1q* et *Galectine*, toutes deux étant des opsonines permettant la reconnaissance du pathogène et les réponses immunitaires associées. Nous avons aussi démontré la sous expression de gènes impliqués dans l'activité lysosomale, codant des protéines telles que plusieurs types de cathepsines ou de saposines. Enfin, en corrélation avec les précédentes études menées sur la régulation de l'expression de gènes associée à la MAB, nous avons également mis en évidence la dérégulation de transcrits impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine, codant pour la profiline, la coactosine ou encore la  $\beta$ -thymosine, régulant étroitement la synthèse d'actine.

Grâce à des techniques de microscopie à épifluorescence et de cytométrie en flux, nous avons cherché à visualiser l'évolution du cytosquelette d'actine et à analyser les variations de l'activité lysosomale dans des hémocytes exposés à *V. tapetis*. D'une part, nous avons ainsi pu démontrer que la dérégulation des fonctions associées au système immunitaire est en partie liée à une diminution de l'activité lysosomale dans les hémocytes infectés par *V. tapetis* CECT4600. D'autre part, nous avons pu visualiser la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les hémocytes infectés, avec une localisation d'actine-F en périphérie de la cellule pour les hémocytes sains et diffuse dans les cellules hémocytaires infectées.

La compréhension de l'arrondissement des hémocytes joue un rôle clé dans la compréhension de la MAB. Néanmoins, certains aspects de cette maladie sont encore aujourd'hui très peu étudiés. La MAB doit son nom au dépôt brun observable sur la face interne des valves, résultant d'une inhibition de la biominéralisation de la coquille. Le pH joue un rôle prépondérant dans la production de coquille chez les organismes calcifiants. Cependant, aucune étude à ce jour ne s'est intéressée aux modulations de pH pouvant être associées à cette affection. Dans le chapitre 4 de cette thèse, nous avons choisi d'étudier la problématique : **Quelles sont les**

---

modulations au sein de l'animal associées au pH et à la température lors de l'infection ?

**Le pathogène *V. tapetis* est capable de moduler le pH du milieu environnant lors de sa croissance, entraînant des variations de pH dans les premiers jours de la MAB**

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les capacités de croissance du pathogène dans des milieux de cultures dont le pH avait été ajusté pour couvrir une gamme de 6.00 à 8.70 et nous avons couplé cette analyse à une mesure de l'évolution du pH au cours de la croissance bactérienne. Ces expériences ont été effectuées à 4 températures, représentant des paramètres clés dans la MAB (14°C la température optimale d'infection, 18°C la température optimale de croissance, 21°C la température permettant la mise en place de la réparation coquillère et enfin 27°C température à laquelle le pathogène est incapable de croître). **De manière intéressante, notre étude a révélé la capacité de *V. tapetis* à réguler le pH lors de sa croissance autour d'une valeur proche de 7.70 dans tous les milieux testés.** En revanche, en l'absence de croissance de *V. tapetis*, aucune modification du pH n'est observée en comparaison avec la condition contrôle sans bactérie, aux différentes températures testées.

Chez les bactéries, le métabolisme peut entraîner une modification du pH du milieu lors de la croissance, résultant de l'excrétion de produits de fermentation et/ou de l'utilisation d'une source de carbone (et/ou d'azote) acide ou basique. Néanmoins, le pH a tendance à diminuer ou à augmenter dans ces conditions. Ici, le pH évolue pour tendre vers une valeur neutre en abaissant ou en élevant le pH au cours de la croissance. Ce phénomène a déjà été décrit chez des champignons portant des gènes leur permettant de « sentir » le pH environnant et de réguler celui-ci pour favoriser leur croissance, comme par exemple chez le champignon pathogène *Candida albicans* en lui permettant de s'adapter aux conditions environnantes afin d'assurer sa croissance (Davis, 2009). Ainsi, le fait que le pathogène soit capable de réguler le pH environnant lors de sa croissance en milieu de culture nous a amené à nous interroger sur la présence d'un mécanisme pouvant induire une modification du pH au sein de la palourde japonaise lors de l'infection. Nous avons donc mesuré le pH des fluides extra-palléaux et d'extraits d'hémolymphe exposés à *V. tapetis* selon le test de virulence *in vitro* standardisé reproduit plusieurs fois au cours de cette thèse, et avons mesuré le pH de ces mêmes fluides extraits de palourdes infectées *in vivo*. Nos résultats ont permis de démontrer que ***V. tapetis* est également capable d'influencer le pH des fluides extra palléaux et de l'hémolymphe *in vitro* dans les premières heures**

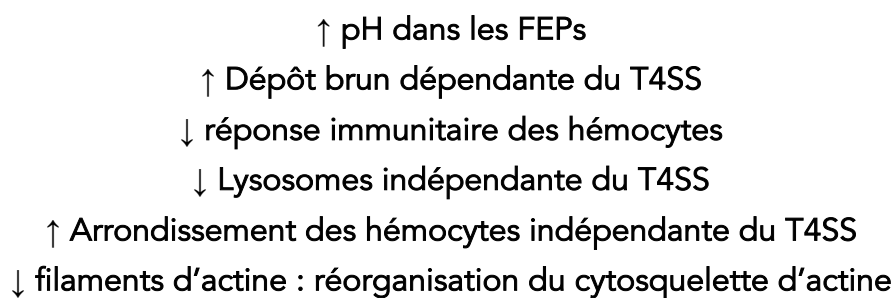


d'exposition et *in vivo* après 3 jours d'infection. Les modulations du pH peuvent être dues à un mécanisme actif du pathogène pour coloniser l'hôte ou peuvent être une conséquence du fort taux de développement du pathogène durant la vibriose.

### Hypothèses et futures recherches

L'ensemble de ces travaux a eu pour ambition de mieux identifier les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués dans la maladie de l'anneau brun et de manière plus large dans la virulence de l'espèce *V. tapetis*. Grâce aux différentes études menées au cours de cette thèse, nous avons schématisé dans la figure 28 un modèle global d'infection. Lors de nos études, nous avons ciblé différentes étapes du processus d'infection. Toutes ces étapes mettent en œuvre des processus en étroite interaction permettant dans leur ensemble le développement de la MAB. Cependant, de nombreuses questions émanent de nos recherches quant aux mécanismes d'interactions entre ces processus. De futures recherches axées sur ces problématiques pourraient permettre de mieux comprendre l'interaction hôte-pathogène dans le cadre de la MAB.

Notre modèle (Fig. 28) se base sur la dynamique d'infection du pathogène. Dans un premier temps, il rappelle les principales conclusions de cette thèse dans l'interaction hôte-pathogène :



- ↑ pH dans les FEPs
- ↑ Dépôt brun dépendante du T4SS
- ↓ réponse immunitaire des hémocytes
- ↓ Lysosomes indépendante du T4SS
- ↑ Arrondissement des hémocytes indépendante du T4SS
- ↓ filaments d'actine : réorganisation du cytosquelette d'actine

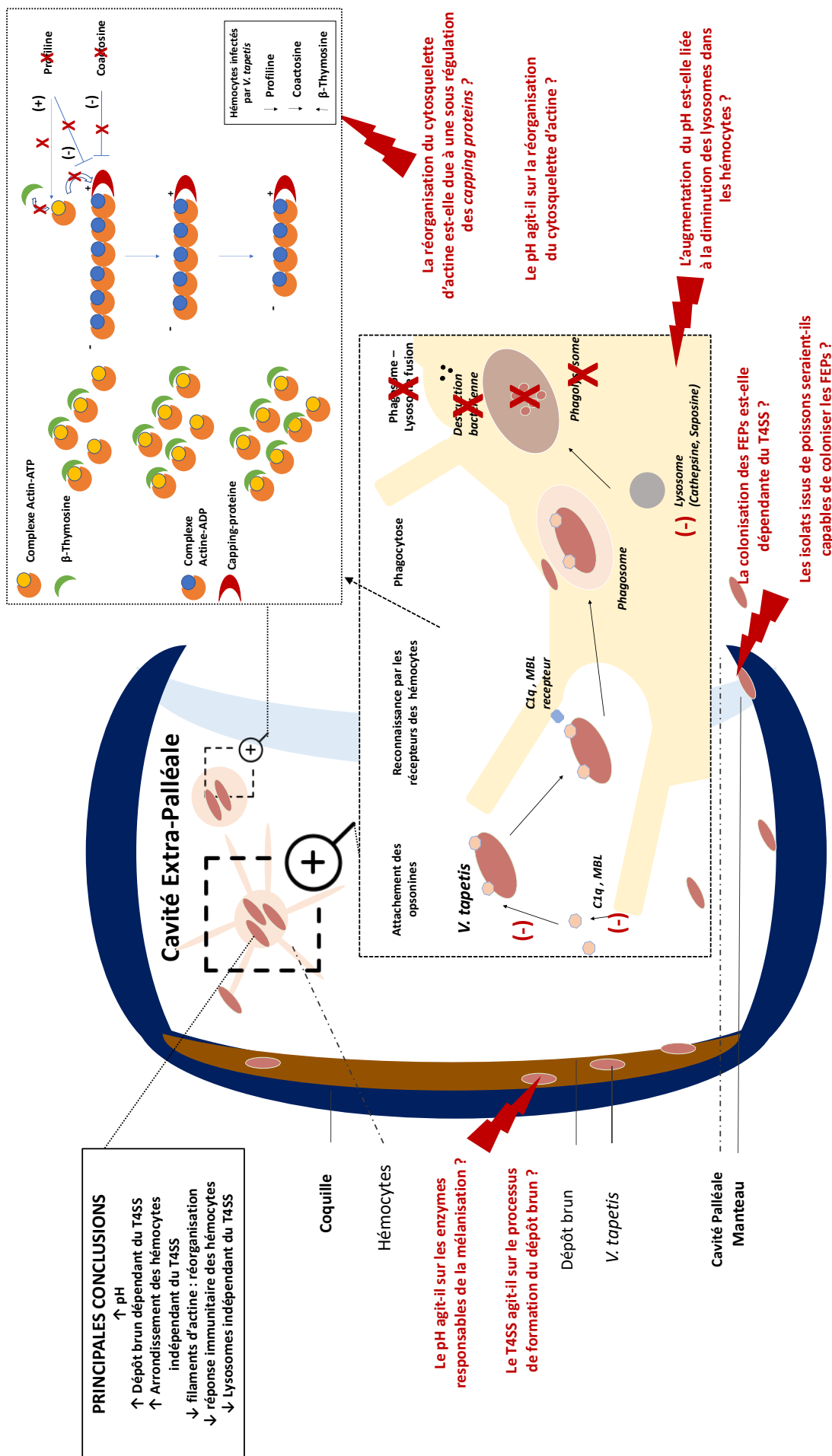


Figure 28 : Modèle globale de la MAB et de l'interaction hôte-pathogène dans les FEPs

Nous avons choisi de décrire ce modèle en suivant la dynamique du pathogène dans le cadre de la MAB. *V. tapetis* pénètre dans la cavité palléale, colonise la lame périostracale et pénètre alors dans les FEPs (Paillard et al., 1994). La première problématique résultant de nos travaux est : **la colonisation des FEPs est-elle dépendante du T4SS ?** En effet, puisque l'absence du T4SS diminue la prévalence de la MAB sans pour autant induire une absence de maladie, il est possible que ce système de sécrétion soit impliqué dans l'étape de colonisation du compartiment extra-palléal. Aussi, comme cité précédemment, il a déjà été démontré chez la souche *V. tapetis* LP2, ne possédant pas le T4SS, n'est capable d'induire la MAB que lorsqu'elle est injectée directement dans le compartiment extra-palléal (Le Bris et al., 2015). Grâce aux études réalisées sur des isolats de *V. tapetis* issus de l'espèce de poisson *Limanda limanda*, nous avons démontré pour la première fois que certains isolats de poissons possèdent le gène *virB4* et ainsi probablement le T4SS. Nous avons alors formulé la problématique suivante : **les isolats de *V. tapetis* issus de l'espèce *Limanda limanda* seraient-ils capables de coloniser les FEPs et ainsi d'induire la MAB chez la palourde japonaise ?** Pour vérifier l'hypothèse de colonisation liée au T4SS, des techniques de microscopie ont déjà été proposées dans le chapitre 1 de cette thèse. En revanche, pour répondre à l'hypothèse de la capacité de colonisation des isolats issus de limande commune, il serait également très intéressant de réaliser des infections de palourdes japonaises par injection dans la cavité palléale de ces nouveaux isolats, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'étape de colonisation du pathogène. En fonction des résultats, des expériences d'injections de ces isolats, dans la cavité extra-palléale cette fois-ci, pourraient également être réalisées.

Après avoir pénétré dans les FEPs, *V. tapetis* cible les cellules hémocytaires qui le phagocytent. Le pathogène est alors capable d'induire un arrondissement et une perte des capacités d'adhérence des hémocytes infectés (Choquet et al., 2003). Chez ces hémocytes, nous avons montré une sous expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire associés à la voie du complément et à l'activité lysosomale. Les modifications physiologiques observées dans les hémocytes infectés ne ciblent pas uniquement le système immunitaire mais également la synthèse et l'organisation du cytosquelette d'actine. Lors d'expériences indépendantes, nous avons également montré que le pH au sein des FEPs était augmenté lors de la MAB, après 3 jours d'infections.

---

Le pH étant impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques (au travers, notamment, de son impact sur les activités enzymatiques), un lien entre les modifications de pH associées aux modifications physiologiques liées à la MAB et plus particulièrement aux hémocytes, peut être supposé. Ainsi, nous nous posons aujourd'hui les questions suivantes : **la modification du pH associée à la MAB pourrait-elle être liée à la modification de l'activité lysosomale au sein des hémocytes chez les animaux infectés ? Les modifications de pH observées au cours de la MAB peuvent-elles avoir un effet sur la réorganisation du cytosquelette d'actine ? Aussi, le pH agit-il sur les enzymes responsables de la mélanisation, processus lié à la formation du dépôt brun ?** Plusieurs expériences seraient nécessaires pour répondre à ces questions. L'une des premières expériences pouvant être réalisée est celle permettant de caractériser l'action potentielle du pH sur le cytosquelette d'actine. Elle pourrait alors permettre, dans un premier temps, de comprendre si de simples changements de pH seraient capables d'induire une désorganisation du cytosquelette chez des hémocytes exposés à ces variations.

Enfin, dans cette mise en perspective de l'ensemble de nos résultats, nous avons souhaité proposer un modèle hypothétique de l'interaction *V. tapetis* – hémocytes chez la palourde japonaise basé sur **le détournement d'hémocytes actifs vers des cellules quiescentes**. Dans ce modèle hypothétique, les cellules immunitaires de palourdes infectées seraient dans un état de quiescence, entraînant alors les perturbations physiologiques liées à la MAB. Pour comprendre cette hypothèse, il est important de bien comprendre la dynamique de la synthèse des filaments d'actine.

La synthèse d'actine s'effectue par addition de monomères d'actine-G au pôle « + » d'un filament d'actine-F. La dépolymérisation peut, quant à elle, s'effectuer au pôle «-» du filament d'actine permettant au filament d'avancer. Nous avons démontré que les transcrits associés à la polymérisation de l'actine tels que la profiline ou la coactosine sont sous exprimés lors de l'infection alors qu'au contraire, la  $\beta$ -thymosine est, elle, surexprimée.

La profiline et la coactosine sont des protéines impliquées dans la régulation des « *capping proteins* » (Hopmann and Miller, 2003; Röhrig et al., 1995). Ces *capping proteins* inhibent la synthèse d'actine en se fixant à l'extrémité « + » du filament et permet de la réguler en empêchant le monomère d'actine-G de se fixer (Mannherz and Hannappel, 2009; Weber, 1999). Hopmann et Miller ont démontré que la balance entre l'activité des protéines de capping et la profiline était essentielle à la régulation

du cytosquelette d'actine chez la drosophile (Hopmann and Miller, 2003). Les  $\beta$ -thymosines sont quant à elles des ABP (*actin binding proteins*) et se lient à l'actine-G afin de réguler la concentration intracellulaire de ce monomère. Elles sont également connues pour interagir avec la profiline, cette dernière favorisant la dissociation du monomère d'actine-G avec la  $\beta$ -thymosine pour permettre à celui-ci de s'intégrer au pôle « + » du filament d'actine (Lodish, 2002).

Le fait que les gènes codant la coactosine et la profiline soient sous-exprimés lors de la MAB nous a permis d'émettre une hypothèse quant à l'action de *V. tapetis* sur les hémocytes au travers de l'action des *capping-proteins* lors de l'infection. En effet, la mise en perspective des transcrits liés à la désorganisation du cytosquelette d'actine avec nos connaissances sur leurs interactions dans la synthèse d'actine-F nous permet de se questionner sur le fait que les hémocytes pourraient être bloqués dans un état quiescent lors de l'infection. En effet, dans les cellules quiescentes, le pôle « + » de l'actine est bloqué par les *capping proteins*, ce qui empêche la synthèse d'actine-F. Ici, il se pourrait que la sous-expression des gènes codant des protéines régulant les *capping proteins* entraîne une suractivité de ces dernières, ce qui bloquerait la polymérisation d'actine-F. Cette hypothèse permettrait également d'expliquer la diminution de la réponse immunitaire au cours de l'infection, les cellules quiescentes ayant une activité métaboliques et physiologiques réduites.

Ce modèle hypothétique pourrait être vérifié par des expériences utilisant des activateurs de *capping proteins*, comme par exemple la Twinfilin, capable de maximiser l'action des *capping proteins* en se liant à celles-ci et en accélérant la dissociation avec leurs inhibiteurs (Johnston et al., 2018). De cette façon, nous pourrions ainsi observer si la maximisation de l'effet des *capping proteins* serait capable d'induire les mêmes effets, *in vitro*, que l'infection par *V. tapetis*.

Les perspectives de cette thèse s'étendent également au-delà des questions résultant directement de ces recherches grâce au développement d'outil comme la souche *V. tapetis*  $\Delta$ *virB4*. En effet, des expériences complémentaires permettraient d'explorer d'autres aspects de la MAB, dans un contexte de maladies émergentes, et ainsi de mieux comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans le cadre de la MAB. Nous avons détaillé ces différentes perspectives au travers des problématiques de recherches développées ci-dessous.

Chez les palourdes ne présentant pas de MAB après l'infection avec la souche *V. tapetis*  $\Delta virB4$ , serait-il possible que ces animaux bénéficient d'un effet de « priming immunitaire » ?

Les mollusques n'ont pas de système immunitaire acquis. Néanmoins, plusieurs études ont démontré la présence d'un système immunitaire adaptatif chez les invertébrés (Milutinović and Kurtz, 2016). Chez les mollusques, la présence d'une mémoire immunitaire a été démontrée comme par exemple chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* après infection par *Vibrio splendidus* (Zhang et al., 2014) ou chez l'ormeau *Haliotis tuberculata* après infection par *Vibrio harveyi* (Dubief et al., 2017). Chez ce dernier, les auteurs ont démontré d'une part que la détection du pathogène était plus faible chez les animaux résistants et d'autre part que le taux de croissance du pathogène était plus faible dans le sérum de ces mêmes animaux. Pour déterminer si cet effet de priming immunitaire est aussi présent chez la palourde japonaise, nous pourrions infecter les palourdes dans un premier temps avec la souche *V. tapetis* CECT4600 puis, sur une partie des animaux, avec la souche  $\Delta virB4$  et effectuer après 4 semaines un diagnostic de la MAB par anesthésie des animaux, qui permettrait alors l'ouverture des valves et la visualisation d'un éventuel dépôt brun. Par la suite, les animaux seraient à nouveau infectés par *V. tapetis* CECT4600 uniquement cette fois-ci. Il est alors possible que les palourdes développent une sorte de résistance, permettant de multiples études, tant au niveau des mécanismes de résistance chez l'animal que dans la compréhension de l'interaction hôte-pathogène.

Les mécanismes moléculaires mis en évidence en transcriptomique sont-ils modifiés après infection avec la souche *V. tapetis*  $\Delta virB4$  ?

L'approche de délétion de gènes ouvre de nombreuses perspectives d'expériences permettant de mieux comprendre les mécanismes de la MAB. Par exemple, l'infection avec les souches CECT4600 et  $\Delta virB4$  pourraient mettre en évidence des voies moléculaires spécifiques au T4SS par une approche *omique* (transcriptomique ou protéomique). Nous savons que la perte d'adhérence des hémocytes n'est pas dépendante du T4SS. Cependant, le détournement du système immunitaire pourrait être affecté par la perte de ce système de sécrétion. Il serait alors intéressant d'étudier les voies moléculaires dépendantes du T4SS.

### Les isolats de *V. tapetis* issus de poissons possèdent-ils le T4SS ?

Dans le chapitre 2, nous avons montré la présence du gène *virB4* chez certains isolats de poissons provenant de l'espèce *Limanda limanda* (Vercauteren et al., 2018). Il serait alors intéressant de démontrer la présence ou l'absence du T4SS chez ces souches. De plus, nous pourrions également effectuer un séquençage de leurs génomes afin de mieux comprendre les différences génétiques entre la souche CECT4600 et ces isolats présentant des caractéristiques atypiques pour des souches de *V. tapetis* issues de poissons. Ces résultats pourraient alors être associés aux infections expérimentales proposées dans la description du modèle d'infection (Fig. 28) pour mieux caractériser les voies moléculaires responsables de la MAB.

### Les autres gènes candidats sont-ils impliqués dans le développement de la MAB ?

Dans le chapitre 1, nous avons développé les outils nécessaires à l'obtention de souches *V. tapetis*  $\Delta ompU$  ou  $\Delta gbpA$ . Ces deux gènes sont respectivement impliqués dans la reconnaissance du pathogène (Duperthuy et al., 2011) et la colonisation (Stauder et al., 2012). Bien que nos expériences n'aient pas permis d'obtenir ces souches de *V. tapetis*, il serait particulièrement intéressant de poursuivre notre travail, l'ensemble des souches donneuses étant déjà construites et prêtes à l'emploi. Le point clé de cette perspective sera l'optimisation du protocole de mutagenèse selon le gène à supprimer, qui semble être gène dépendant.

---

## CONCLUSION

---

Durant cette thèse, différentes approches ont été mises en œuvre dans le but de mieux comprendre et caractériser les mécanismes de pathogénicité associés à la Maladie de l'Anneau Brun (MAB). Au travers de techniques telles que la génétique bactérienne, le RNA-seq, le MALDI-TOF ou la cytométrie en flux, nous avons développé des outils d'analyse permettant de préciser le rôle de certaines voies moléculaires dans le fonctionnement de la MAB. Les principales conclusions pouvant être associées à cette thèse sont les suivantes :

- La bactérie *V. tapetis*, dans le cadre de la MAB, induit une sous expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et une dérégulation des gènes impliqués dans la stabilisation et la synthèse des filaments d'actine
- Ce pathogène induit également une diminution de l'activité lysosomale sur les hémocytes exposés
- L'effet de *V. tapetis* sur le cytosquelette d'actine et sur la diminution de l'activité lysosomale est indépendante du système de sécrétion de type IV (T4SS)
- Le T4SS est impliqué dans le développement de la MAB mais n'est pas essentiel pour induire cette infection
- Dans le cadre de la MAB et de la perte d'adhérence des hémocytes *in vitro*, *V. tapetis* est capable de moduler le pH des fluides extra-palléaux, respectivement dans les premiers jours et premières heures de l'infection
- Enfin, l'approche de « strains typing » basée sur la technique MALDI-TOF permet de discriminer les souches de *V. tapetis* en fonction de leur pouvoir pathogène vis à vis de la palourde japonaise

L'ensemble de ces conclusions ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de la MAB et les outils mis en place durant cette thèse permettront le développement de nouvelles approches expérimentales.



## BIBLIOGRAPHIE

### PARTIES INTRODUCTION ET DISCUSSION

---

Adams, A., Reeve, L., 1850. The Zoology of the Voyage of HMS Samarang. Mollusca 87.

Agreste, 2012. Répartition des entreprises et des ventes provenant de l'élevage pour la consommation sous marquage sanitaire en 2012.

Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. Fish & Shellfish Immunology 20, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.012>

Allam, B., Paillard, C., 1998. Defense factors in clam extrapallial fluids. Diseases of aquatic organisms 33, 123–128.

Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. Journal of invertebrate pathology 76, 63–69. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.494>

Allam, B., Paillard, C., Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. Diseases of aquatic organisms 48, 221–231.

Allam, B., Pales Espinosa, E., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C., Paillard, C., 2014. Transcriptional changes in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in response to Brown Ring Disease. Fish & Shellfish Immunology 41, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.022>

Allam, B., Raftos, D., 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. Journal of Invertebrate Pathology 131, 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.005>

Alvarez-Martinez, C.E., Christie, P.J., 2009. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 775–808. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-09>

Asplund, M.E., 2013. Ecological aspects of marine *Vibrio* bacteria exploring relationships to other organisms and a changing environment. Faculty of

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Science, Department of Biological and Environmental Sciences, Gothenburg.
- Balboa, S., Bastardo, A., Romalde, J.L., 2014. Disentangling the Population Structure and Evolution of the Clam Pathogen *Vibrio tapetis*. *Microb Ecol* 67, 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0318-9>
- Balboa, S., Romalde, J.L., 2013. Multilocus sequence analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease: Description of *Vibrio tapetis subsp. britannicus subsp. nov.* *Systematic and Applied Microbiology* 36, 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.12.004>
- Barnabé, G., 2018. Aquaculture: biology and ecology of cultured species.
- Beguier, J., 2005. Optimisation du diagnostic et épidémiologie de la maladie de l'anneau brun sur la côte Atlantique.
- Berger, K.H., Isberg, R.R., 1993. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 7, 7–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01092.x>
- Bidault, A., Richard, G.G., Le Bris, C., Paillard, C., 2015. Development of a Taqman real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio tapetis* in extrapallial fluids of clams. *PeerJ* 3, e1484. <https://doi.org/10.7717/peerj.1484>
- Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M.T., Ventosa, A., 1996a. *Vibrio tapetis sp. nov.*, the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 46, 480–484.
- Borrego, J.J., Luque, A., Castro, D., Santamaría, J.A., Martínez-Manzanares, E., 1996b. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquatic Living Resources* 9, 125–136.
- Brulle, F., Jeffroy, F., Madec, S., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge. *Developmental & Comparative Immunology* 38, 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.003>
- Calvez, I., 2002. Approche de la variabilité d'une population de palourdes *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), aux stades larvaires et post-larvaires. Brest.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I.G., Espeso, E.A., González-Verdejo, C.I., García-Maceira,

## BIBLIOGRAPHIE

---

- F.I., Di Pietro, A., 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology* 48, 765–779. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03465.x>
- Chaudhuri, S., Gantner, B.N., Ye, R.D., Cianciotto, N.P., Freitag, N.E., 2013. The *Listeria monocytogenes* ChiA Chitinase Enhances Virulence through Suppression of Host Innate Immunity. *mBio* 4, e00617-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00617-12>
- Chen, L., Mu, C., Zhao, J., Wang, C., 2011. Molecular cloning and characterization of two isoforms of cyclophilin A gene from *Venerupis philippinarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 31, 1218–1223. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.001>
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. The eastern oyster *Crassostrea virginica*.
- Chiamenti, A., 1900. Contribuzione allo studio della malacofauna adriatica. Nota sulla famiglia delle *Veneride*, e delle *Petricolide*. *Rivista Italiana di Scienze Naturali* 20, 9–15.
- Chiesa, S., Lucentini, L., Freitas, R., Nonnis Marzano, F., Breda, S., Figueira, E., Caill-Milly, N., Herbert, R.J.H., Soares, A.M.V.M., Argese, E., 2017. A history of invasion: COI phylogeny of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Europe. *Fisheries Research* 186, Part 1, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.07.024>
- Choquet, G., 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise. Brest.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 57, 109–116.
- CHU, F.-L.E., 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. *Am. Fish. Soc. Sp. Publ.* 18, 178–188.
- Comité national de la conchyliculture, 2013a. L'élevage des palourdes - La vénériculture Le cycle de vie de la palourde.
- Comité national de la conchyliculture, 2013b. Nutrition et palourdes.
- Cossart, P., Boquet, P., Normark, S., Rappuoli, R., 2004. Cellular microbiology. *Cellular microbiology*.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Costello, M., 2001. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Paris: Muséum national d'histoire naturelle.
- Costerton, J.W., 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology* 9, 50–52. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01918-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01918-1)
- Costerton, J.W., 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Dang, C., 2009. Dynamique des populations de palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*) dans le bassin d'Arcachon: conséquences sur la gestion des populations exploitées 374.
- Davis, D.A., 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Current Opinion in Microbiology* 12, 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.006>
- DebRoy, S., Dao, J., Söderberg, M., Rossier, O., Cianciotto, N.P., 2006. *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *PNAS* 103, 19146–19151. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608279103>
- Declercq, A.M., Chiers, K., Soetaert, M., Lasa, A., Romalde, J.L., Polet, H., Haesebrouck, F., Decostere, A., 2015. *Vibrio tapetis* isolated from vesicular skin lesions in Dover sole *Solea solea*. *Diseases of aquatic organisms* 115, 81–86.
- Dias, G.M., Bidault, A., Le Chevalier, P., Choquet, G., Der Sarkissian, C., Orlando, L., Medigue, C., Barbe, V., Mangenot, S., Thompson, C.C., Thompson, F.L., Jacq, A., Pichereau, V., Paillard, C., 2018. *Vibrio tapetis* Displays an Original Type IV Secretion System in Strains Pathogenic for Bivalve Molluscs. *Frontiers in microbiology* 9, 227.
- Ding, J., Li, J., Bao, Y., Li, L., Wu, F., Zhang, G., 2011. Molecular characterization of a mollusk chicken-type lysozyme gene from *Haliotis discus hannai* Ino, and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Fish & Shellfish Immunology* 30, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.008>
- Drummond, L.C., Balboa, S., Beaz, R., Mulcahy, M.F., Barja, J.L., Culloty, S.C., Romalde, J.L., 2007. The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease. *J. Invertebr. Pathol.* 95, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.010>

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Dubief, B., Nunes, F.L.D., Basuyaux, O., Paillard, C., 2017. Immune priming and portal of entry effectors improve response to *Vibrio* infection in a resistant population of the European abalone. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.017>
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautredou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachere, E., Destoumieux-Garzon, D., 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* 108, 2993–2998. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015326108>
- El Bour, M., Dellali, M., Boukef, I., Lakhal, F., Mraouna, R., El Hili, H.A., Paillard, C., Klena, J., 2012. First assessment of Perkinsosis and brown ring disease co-infection in *Ruditapes decussatus* in the North Lake of Tunis (southern Mediterranean Sea). *J. Mar. Biol. Ass.* 92, 1579–1584. <https://doi.org/10.1017/S0025315411001846>
- Erauso, G., Lakhal, F., Bidault-Toffin, A., Le Chevalier, P., Bouloc, P., Paillard, C., Jacq, A., 2011. Evidence for the Role of Horizontal Transfer in Generating pVT1, a Large Mosaic Conjugative Plasmid from the Clam Pathogen, *Vibrio tapetis*. *PLoS ONE* 6, e16759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016759>
- Escobar, M.A., Dandekar, A.M., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* 8, 380–386. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Flye-Sainte-Marie, 2007. Approche écophysiological de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*: expérimentations et modélisation. Rutgers University (USA).
- Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., O'Callaghan, D., Ramuz, M., 2002. Systèmes de sécrétion des protéines de type IV et virulence bactérienne. *Med Sci (Paris)* 18, 439–447. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002184439>
- Gattuso, J.-Pierre., Hansson, Lina., 2011. Ocean acidification. Oxford University Press, Oxford ;
- Gouletquer, Ph, Héral, M., Béchemin, C., Richard, P., 1989. Anomalies de calcification chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*: caractérisation et comparaison des compositions en acides aminés de différentes parties de la coquille analysées par HPLC. *Aquaculture* 81, 169–183.
- Gouletquer, P., Heral, M., Deslous-Paoli, J.M., Prou, J., Garnier, J., Razet, D.,

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Boromthanasat, W., 1989a. Ecophysiologie et bilan énergétique de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 132, 85–108.
- Gouletquer, P., Heral, M., Deslous-Paoli, J.M., Prou, J., Garnier, J., Razet, D., Boromthanasat, W., 1989b. Ecophysiologie et bilan énergétique de la palourde japonaise d'élevage *Ruditapes philippinarum*. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 132, 85–108.
- Grohmann, E., Christie, P.J., Waksman, G., Backert, S., 2018. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria: Type IV secretion. *Molecular Microbiology* 107, 455–471. <https://doi.org/10.1111/mmi.13896>
- Høiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology* 5, 1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>
- Hopmann, R., Miller, K.G., 2003. A Balance of Capping Protein and Profilin Functions Is Required to Regulate Actin Polymerization in *Drosophila* Bristle. *Mol Biol Cell* 14, 118–128. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-05-0300>
- Humphreys, J., Harris, M.R.C., Herbert, R.J.H., Farrell, P., Jensen, A., Cragg, S.M., 2015. Introduction, dispersal and naturalization of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in British estuaries, 1980–2010. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 95, 1163–1172. <https://doi.org/10.1017/S0025315415000132>
- IFREMER, I. français de recherche pour l'exploitation de la mer, 1988. La Palourde: dossier d'élevage. Editions Quae.
- Jeffroy, F., 2011. Production et caractérisation de familles de palourdes japonaises, *Ruditapes philippinarum*, résistantes à la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Jeffroy, F., Brulle, F., Paillard, C., 2013. Differential expression of genes involved in immunity and biomineralization during Brown Ring Disease development and shell repair in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.03.001>
- Jensen, S., Samuelsen, O.B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C., Bergh, Ø., 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Johnston, A.B., Hilton, D.M., McConnell, P., Johnson, B., Harris, M.T., Simone, A., Amarasinghe, G.K., Cooper, J.A., Goode, B.L., 2018. A novel mode of capping protein-regulation by twinfilin. *eLife* 7, e41313. <https://doi.org/10.7554/eLife.41313>
- Jones, G., Sanford, C.L., Jones, B., 1993. Manila clams: hatchery and nursery methods. Innovative Aquaculture Products Limited.
- Jones, G.G., Sanford, C.L., Jones, B.L., 1993. Manila clams: hatchery and nursery methods. Report by Innovative Aquaculture Products Ltd., Skerry Bay, Lasqueti Island. British Columbia, Canada.
- Juhas, M., Crook, D.W., Hood, D.W., 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular microbiology* 10, 2377–2386.
- Kirn, T.J., Jude, B.A., Taylor, R.K., 2005. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* 438, 863. <https://doi.org/10.1038/nature04249>
- Lakhal, F., Bury-Mone, S., Nomane, Y., Le Goic, N., Paillard, C., Jacq, A., 2008. DjlA, a Membrane-Anchored DnaJ-Like Protein, Is Required for Cytotoxicity of Clam Pathogen *Vibrio tapetis* to Hemocytes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 5750–5758. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-08>
- Le Bris, C., 2013. Le système phénoloxydase: caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Le Bris, C., Richard, G., Paillard, C., Lambert, C., Segueineau, C., Gauthier, O., Pernet, F., Guérard, F., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. *Fish & Shellfish Immunology* 42, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.021>
- Levican, A., Lasa, A., Irgang, R., Romalde, J.L., Poblete-Morales, M., Avendaño-Herrera, R., 2017. Isolation of *Vibrio tapetis* from two native fish species (*Genypterus chilensis* and *Paralichthys adspersus*) reared in Chile and description of *Vibrio tapetis* subsp. *quintayensis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 716–723. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001705>
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J.,

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., Morová, J., Šebo, P., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 34, 1076–1112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>
- Linkous, D.A., Oliver, J.D., 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 207–214. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13570.x>
- Linnaeus, C. von, 1758. *Systema naturae*, 10th edn, vol. 1. Stockholm: L. Salvii.
- Lodish, H. (Ed.), 2002. *Molecular cell biology*, 4. ed., [Nachdr.]. ed, Media connected. Freeman, New York, NY.
- López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: bivalvia). *Fish & Shellfish Immunology* 7, 595–608. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0112>
- Lopez, J.R., Balboa, S., Nunez, S., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J.I., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2011. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). *Research in veterinary science* 90, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.05.030>
- Luo, P., He, X., Liu, Q., Hu, C., 2015. Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in *Vibrio* species based on suicide T-Vectors carrying a novel counterselectable marker, vmi480. *PloS one* 10, e0144465.
- Madec, S., Pichereau, V., Jacq, A., Paillard, M., Boisset, C., Guérard, F., Paillard, C., Nicolas, J.-L., 2014. Characterization of the Secretomes of Two *Vibrios* Pathogenic to Mollusks. *PLoS ONE* 9, e113097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113097>
- Maes, P., 1992. Pathologie bactérienne chez deux invertébrés marins d'intérêt commercial, *Ruditapes philippinarum* et *Paracentrotus lividus*. Brest: Université de Bretagne Occidentale.
- Maes, P., Paillard, C., 1992. Effect du *Vibrio* P1, pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur d'autres espèces de bivalves, in: *Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture*. Presented at the Les Mollusques Marins: Biologie et Aquaculture, Actes colloq, IFREMER., Brest.
- Mannherz, H.G., Hannappel, E., 2009. The  $\beta$ -thymosins: Intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 839–851. <https://doi.org/10.1002/cm.20371>



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Margulis, L., Schwartz, K.V., 1997. Five Kingdoms, 3rd Edition: An Illustrated Guide to the Phyla of Life On Earth, 3rd edition. ed. Holt Paperbacks, New York, N.Y.
- Matsuyama, T., Sakai, T., Kiryu, I., Yuasa, K., Yasunobu, H., Kawamura, Y., Sano, M., 2010. First Isolation of *Vibrio tapetis*, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Japan. Fish Pathology 45, 77–79. <https://doi.org/10.3147/jsfp.45.77>
- Milutinović, B., Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. Seminars in Immunology, SI: Innate Immune Memory 28, 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004>
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J.V., Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Transcriptomics of *in vitro* immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. PloS one 7, e35009.
- Navas, J.I., Castillo, M.C., Vera, P., Ruiz-Rico, M., 1992. Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). Aquaculture 107, 193–199. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90067-U](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90067-U)
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environmental Microbiology 10, 2966–2978. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>
- Novoa, B., Luque, A., Castro, D., Borrego, J.J., Figueras, A., 1998. Characterization and Infectivity of Four Bacterial Strains Isolated from Brown Ring Disease-Affected Clams. Journal of Invertebrate Pathology 71, 34–41. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4704>
- Olivier, V., Haines, G.K., Tan, Y., Satchell, K.J.F., 2007. Hemolysin and the Multifunctional Autoprocessing RTX Toxin Are Virulence Factors during Intestinal Infection of Mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 Strains. Infection and Immunity 75, 5035–5042. <https://doi.org/10.1128/IAI.00506-07>
- Pacini, F., 1854. Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. tip. di F. Bencini.
- Paillard, 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources 17, 467–475.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Paillard, Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 59, 249–262.
- Paillard, C., 2017. Brown ring disease: a vibriosis affecting clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. 12. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.1924>
- Paillard, C., 2016. An ecological approach to understanding host-pathogen-environment interactions: the case of Brown Ring Disease in clams, in: *Oysters and Clams: Cultivation, Habitat Threats and Ecological Impact*. ed. Jesus L. Romalde Microbiology research advances, Nova Science Publishers, p. 228.
- Paillard, C., 2004a. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest 180. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-02866182>
- Paillard, C., 2004b. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467–475. <https://doi.org/10.1051/alr:2004053>
- Paillard, C., 2004c. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Paillard, C., 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage *Ruditapes philippinarum*.
- Paillard, C., Gausson, S., Nicolas, J.L., le Pennec, J.P., Haras, D., 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.047>
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A., Willassen, E., Bergh, Ø, Bovo, C., Skår, C., Mortensen, S., 2008a. *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 81, 153–161. <https://doi.org/10.3354/dao01950>
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A., Willassen, E., Bergh, Ø, Bovo, C., Skår, C., Mortensen, S., 2008b. *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 81, 153–161. <https://doi.org/10.3354/dao01950>

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Paillard, C., Le Pennec, M., 1993. Ultrastructural studies of the mantle and the periostracal lamina in the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Tissue and Cell* 25, 183–194.
- Paillard, C., Maes, P., 1995a. The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*. Part 1. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of Invertebrate Pathology* 65, 91–100. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1015>
- Paillard, C., Maes, P., 1995b. The brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *Journal of invertebrate pathology* 65, 91–100.
- Paillard, C., Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. *Diseases of aquatic organisms* 19, 137–146.
- Paillard, C., Maes, P., 1990. Aetiology of brown ring disease in *Tapes philippinarum*: pathogenicity of a *Vibrio* sp. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la Vie* 310, 15–20.
- Paillard, C., Maes, P., Oubella, R., 1994. Brown ring disease in clams. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 219–240. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90030-2)
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D., 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* 309, 235–241.
- Parham, P., Janeway, C., 2015. *The immune system*, Fourth edition. ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, NY.
- Provenzano, D., Klose, K.E., 2000. Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *PNAS* 97, 10220–10224. <https://doi.org/10.1073/pnas.170219997>
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B., Conway, W.S., 2001. Local Modulation of Host pH by *Colletotrichum* Species as a Mechanism to Increase Virulence. *MPMI* 14, 1105–1113. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1105>
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R.R., Donelli, G., 2005. Pathogenic *Vibrio* Species in the Marine and Estuarine Environment, in: Belkin, S., Colwell, R.R. (Eds.), *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Springer US, pp. 217–252. [https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7\\_9](https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7_9)

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Qiu, L., Jiang, S., Huang, J., Wang, W., Zhu, C., Su, T., 2009. Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology* 26, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.022>
- Quesniaux, V.F.J., Schreier, M.H., Wenger, R.M., Hiestand, P.C., Harding, M.W., Van Regenmortel, M.H.V., 1987. Cyclophilin binds to the region of cyclosporine involved in its immunosuppressive activity. *European Journal of Immunology* 17, 1359–1365. <https://doi.org/10.1002/eji.1830170921>
- Rafinesque, C.S., 1815. *Analyse de la nature, ou tableau de l'univers et des corps organisés*. 1815 aux dépens de l'auteur.
- Ratzke, C., Gore, J., 2018. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLOS Biology* 16, e2004248. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>
- Reid, H.I., Duncan, H.L., Laidler, L.A., Hunter, D., Birkbeck, T.H., 2003. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 221, 65–74.
- Reid, Soudant, P., Lambert, C., Paillard, C., Birkbeck, H., 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of aquatic organisms* 56, 249–258.
- Reidl, J., Klose, K.E., 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* 26, 125–139. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00605.x>
- Richard, G., Guérard, F., Corporeau, C., Lambert, C., Paillard, C., Pernet, F., 2016. Metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to its pathogen *Vibrio tapetis* in relation to diet. *Developmental & Comparative Immunology* 60, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.026>
- Richard, G., Le Bris, C., Guérard, F., Lambert, C., Paillard, C., 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part II: Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains. *Fish & Shellfish Immunology* 44, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.039>
- Robert, R., Deltreil, J.-P., 1990. Élevage de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* dans le bassin d'Arcachon. Bilan des dix dernières années et perspectives de développement.
- Rodrigues, S., 2014. Caractérisation et contrôle du biofilm de *Vibrio tapetis*,

- 
- pathogène de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Lorient.
- Rodrigues, S., Paillard, C., Le Pennec, G., Dufour, A., Bazire, A., 2015. *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01384>
- Rodríguez, J.M., López-Romalde, S., Beaz, R., Alonso, M.C., Castro, D., Romalde, J.L., 2006. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Diseases of aquatic organisms* 69, 175–183.
- Röhrig, U., Gerisch, G., Morozova, L., Schleicher, M., Wegner, A., 1995. Coactosin interferes with the capping of actin filaments. *FEBS Letters* 374, 284–286. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01130-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01130-7)
- Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., Chaparro, C., Torres, M., de Lorgeril, J., Haffner, P., Vidal-Dupiol, J., Lagorce, A., Petton, B., Mitta, G., Jacq, A., Le Roux, F., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2019. Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 14238–14247. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>
- Sainte Marie, J.F., 2007. Approche écophysiological de la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise, *Ruditapes philippinarum*: expérimentations et modélisation. Rutgers University (USA).
- Sofi, M.H., Gudi, R., Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Johnson, B.M., Vasu, C., 2014. pH of Drinking Water Influences the Composition of Gut Microbiome and Type 1 Diabetes Incidence. *Diabetes* 63, 632–644. <https://doi.org/10.2337/db13-0981>
- Solidoro, C., Pastres, R., Canu, D.M., Pellizzato, M., Rossi, R., 2000. Modelling the growth of *Tapes philippinarum* in Northern Adriatic lagoons. *Marine Ecology Progress Series* 137–148.
- Sperandio, V., Girón, J.A., Silveira, W.D., Kaper, J.B., 1995. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 63, 4433–4438.
- Stachel, S.E., Nester, E.W., 1986. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 5, 1445–1454. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04381.x>
- Stauder, M., Huq, A., Pezzati, E., Grim, C.J., Ramoino, P., Pane, L., Colwell, R.R.,

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Pruzzo, C., Vezzulli, L., 2012. Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment.
- Tamayo, R., Patimalla, B., Camilli, A., 2010. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 78, 3560–3569. <https://doi.org/10.1128/IAI.00048-10>
- Taylor, J D, Kennedy, W J, Hall, A, 1973. The Shell Structure and Mineralogy of the Bivalvia. II. *Lucinacea-Clavagellacea*. Conclusions. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology*, London 22, 253–294.
- Trinkler, N., 2009. La guérison coquillière: un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Vercauteren, M., De Swaef, E., Declercq, A.M., Polet, H., Aerts, J., Ampe, B., Romalde, J.L., Haesebrouck, F., Devriese, L., Decostere, A., Chiers, K., 2019. Scrutinizing the triad of *Vibrio tapetis*, the skin barrier and pigmentation as determining factors in the development of skin ulcerations in wild common dab (*Limanda limanda*). *Vet Res* 50, 41. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0659-6>
- Vercauteren, M., Swaef, E.D., Declercq, A., Bosseler, L., Gulla, S., Balboa, S., Romalde, J.L., Devriese, L., Polet, H., Boyen, F., Chiers, K., Decostere, A., 2018. First isolation of *Vibrio tapetis* and an atypical strain of *Aeromonas salmonicida* from skin ulcerations in common dab (*Limanda limanda*) in the North Sea. *Journal of Fish Diseases* 41, 329–335. <https://doi.org/10.1111/jfd.12729>
- Voth, D.E., Broederdorf, L.J., Graham, J.G., 2012. Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future microbiology* 7, 241–257.
- Waksman, G., 2019. From conjugation to T4S systems in Gram-negative bacteria: a mechanistic biology perspective. *EMBO reports* e47012. <https://doi.org/10.15252/embr.201847012>
- Weber, A., 1999. Actin binding proteins that change extent and rate of actin monomer-polymer distribution by different mechanisms. *Molecular and cellular biochemistry* 190, 67–74.
- Wijsman, J.W.M., Troost, K., Fang, J., Roncarati, A., 2019. Global Production of Marine Bivalves. Trends and Challenges, in: Smaal, A.C., Ferreira, J.G., Grant, J., Petersen, J.K., Strand, Ø. (Eds.), *Goods and Services of Marine Bivalves*. Springer International Publishing, Cham, pp. 7–26.

## BIBLIOGRAPHIE

---

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_2)

- Wong, E., Vaaje-Kolstad, G., Ghosh, A., Hurtado-Guerrero, R., Konarev, P.V., Ibrahim, A.F.M., Svergun, D.I., Eijsink, V.G.H., Chatterjee, N.S., Aalten, D.M.F. van, 2012. The *Vibrio cholerae* Colonization Factor GbpA Possesses a Modular Structure that Governs Binding to Different Host Surfaces. *PLOS Pathogens* 8, e1002373. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002373>
- Yeh, H.-Y., Klesius, P.H., 2008. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, cyclophilin A and B cDNA characterization and expression analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.015>
- Zatyka, M., Thomas, C.M., 1998. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol Rev* 21, 291–319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00355.x>
- Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., Song, L., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology* 45, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015>
- Ziolo, K.J., Jeong, H.-G., Kwak, J.S., Yang, S., Lavker, R.M., Satchell, K.J.F., 2014. *Vibrio vulnificus* Biotype 3 Multifunctional Autoprocessing RTX Toxin Is an Adenylate Cyclase Toxin Essential for Virulence in Mice. *Infection and Immunity* 82, 2148–2157. <https://doi.org/10.1128/IAI.00017-14>

**Titre :** Identification des facteurs de pathogénicité de la bactérie *Vibrio tapetis*, responsable de la maladie l'anneau brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*.

**Mots clés :** MAB, *Vibrio tapetis*, *Ruditapes philippinarum*, Mutagénèse, Interaction hôte-pathogène, Transcriptomique, pH

**Résumé :** L'objectif principal de cette thèse est d'étudier les mécanismes liés au pouvoir pathogène de *V. tapetis*. Pour cela, nous avons développé 2 axes de recherche. Le premier axe vise à étudier la virulence de *V. tapetis* en répondant aux 2 problématiques suivantes : **Quels sont les gènes impliqués dans la virulence de *V. tapetis* ?** et **Existe-t-il des marqueurs hôtes-spécifiques de la virulence de *V. tapetis* ?** Le second axe de recherche concerne l'interaction hôte pathogène et répond aux 2 problématiques suivantes : **Quels sont les gènes exprimés lors de l'infection chez l'hôte ?** et **Quelles sont les modulations au sein de l'animal associées au pH et à la température lors de l'infection ?**

Les principales découvertes de cette thèse sont :

(i) La bactérie *V. tapetis*, dans le cadre de la MAB, induit une sous expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et une dérégulation des gènes impliqués dans la stabilisation et la synthèse des filaments d'actine

(ii) Ce pathogène induit également une diminution de l'activité lysosomale sur les hémocytes exposés

(iii) L'effet de *V. tapetis* sur le cytosquelette d'actine et sur la diminution de l'activité lysosomale est indépendante du système de sécrétion de type IV (T4SS)

(iv) Le système de sécrétion de type IV (T4SS) est impliqué dans le développement de la MAB mais n'est pas essentiel pour induire cette affection

(v) Dans le cadre de la MAB et de la perte des adhérences des hémocytes *in vitro*, *V. tapetis* est capable de moduler le pH des fluides extra-palléaux, respectivement dans les premiers jours et premières heures de l'infection

(vi) Enfin, l'approche de « strains typing » basée sur la technique MALDI-TOF permet de discriminer les souches de *V. tapetis* en fonction de leur pouvoir pathogène vis à vis de la palourde japonaise.

**Title :** Pathogenicity mechanisms of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of the brown ring disease in the Manila clams *Ruditapes philippinarum*

**Keywords :** BRD, *Vibrio tapetis*, *Ruditapes philippinarum*, Mutagenesis, Host-pathogen interaction, Transcriptomics, pH

**Summary:** The main objective of this thesis is to study the mechanisms related to the pathogenicity of *V. tapetis*. For this purpose, we developed 2 research axes. The first one aimed at studying the virulence of *V. tapetis* by answering the following 2 issues: **What are the genes involved in the virulence of *V. tapetis*?** and **Are there host-specific markers of the virulence of *V. tapetis*?** The second research axis concerned pathogen-host interactions and addressed the following 2 issues: **What are the genes expressed during infection in the host?** and **What are the modulations in the animal associated with pH and temperature during infection?** The main findings of this thesis are:

(i) *V. tapetis*, in the context of BRD, induces a down-expression of genes involved in the immune response and a deregulation of genes involved in the stabilization and synthesis of actin filaments

(ii) This pathogen also induces a decrease in lysosomal activity on exposed hemocytes

(iii) The effect of *V. tapetis* on the actin cytoskeleton and on the decrease in lysosomal activity is independent of the type IV secretion system (T4SS)

(iv) The type IV secretion system (T4SS) is involved in the development of BRD but is not essential to induce this disease

(v) In the context of BRD and of the loss of hemocyte adhesions properties *in vitro*, *V. tapetis* is able to modulate the pH of extrapallial fluids, respectively in the first days and hours of infection

(vi) Finally, the "strains typing" approach based on MALDI-TOF makes it possible to discriminate between *V. tapetis* strains according to their pathogenicity with regard to Manila clam.