HAL
open science

Évolution de la virulence de V. crassostreae en lien avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs

Damien Piel

To cite this version:

Damien Piel. Évolution de la virulence de V. crassostreae en lien avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs. Bactériologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS462 . tel-03139827

HAL Id: tel-03139827

https://theses.hal.science/tel-03139827

Submitted on 12 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

École doctorale « Complexité du Vivant »

Équipe Génomique des Vibrios

Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins – Station Biologique de Roscoff

Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins – IFREMER

Évolution de la virulence de *V. crassostreae* en lien avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs

Par Damien Piel

Thèse de doctorat de microbiologie

Dirigée par Frédérique Le Roux

Co-encadrée par Yannick Labreuche

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2019

Devant un jury composé de :

Marie-Agnès Petit	Directrice de Recherche	Rapporteur
Caroline Montagnani	Chercheuse	Rapporteur
Marcelino Suzuki	Professeur	Examinateur
Yannick Labreuche	Chercheur	Membre invité
Frédérique Le Roux	Directrice de Recherche	Directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes impliquées professionnellement et personnellement dans la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, je remercie Mme Marie-Agnès Petit et Mme Caroline Montagnani pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Mr Marcellino Suzuki pour sa participation à mon jury de soutenance.

Je remercie l'Université Pierre et Marie Curie et l'école doctorale « Complexité du vivant » pour l'encadrement doctoral dont j'ai bénéficié. Je remercie la région Bretagne et l'Ifremer pour la bourse doctorale qu'ils m'ont accordé et l'Agence nationale de la recherche pour le financement de mes travaux de recherche (projet REVENGE). Je remercie aussi l'Ifremer pour la bourse de mobilité internationale qui m'a permis d'aller réaliser des expériences dans le laboratoire de Mathias Wegner.

Je remercie Mr Bernard Kloareg et Mme Catherine Boyen pour leur accueil respectif au sein de la station biologique de Roscoff et du laboratoire de « Biologie Intégrative des Modèles Marins » (UMR 8227). Je remercie également Mr Pierre Boudry pour son accueil au sein de l'équipe « Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins » de l'Ifremer Plouzané.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à Mme Frédérique Le Roux, directrice de thèse et directrice de l'équipe « Génomique des *Vibrio* ». Au niveau professionnel, je te remercie pour tes conseils et ton aide tout au long de cette thèse. Tu as toujours été très investie dans ton rôle de directrice de thèse. Je te remercie pour avoir su partager ta passion. Au niveau personnel, je te remercie également pour les moments partagés autour d'une bière (ou deux) et de repas.

Je tiens également à remercier Mr Yannick Labreuche, qui a co-encadré ma thèse. Merci pour ton aide, ta disponibilité et tes conseils tout au long de ces 3 ans. Je te remercie également pour m'avoir aidé dans la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « Génomique des *Vibrio* » : Mr Maxime Bruto pour tous tes conseils et ton aide, Mme Sabine Chenivesse et Mme Adèle James pour votre aide précieuse dans la réalisation des expériences. C'était un plaisir de travailler avec vous tous.

Je désire remercier l'ensemble des collaborateurs de l'équipe « Génomique des *Vibrio* » : Mr Bruno Petton, Mme Marianne Alunno-Bruscia, Mr Mathias Wegner, Mr Christophe Lambert, Mme Melanie Blokesch, Mme Kathryn Kauffman, Mme Fatima Husain ainsi que l'ensemble de l'équipe d'Eligobioscience dirigée par Mr Xavier Duportet et Mr David Bikar et plus particulièrement Erica Lieberman avec qui on a réalisé les tests d'infections croisées phage-vibrio.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Mr Mathieu Picardeau, Mr Pierre Boudry, Mr Guillaume Mitta, Mr Mark Cock, Mr Eric Duchaud et Mr Bruno Petton pour leurs conseils.

Je remercie l'ensemble des personnels de la SBR, des services communs et des plateformes et particulièrement Mme Sophie Lepanse pour avoir réalisé les photos de microscopie électronique des bactériophages, Mme Brigitte Riou et Mme Martine Kerizin pour votre soutien logistique indispensable.

Merci à ma famille pour son soutien tout au long de mes études et de cette thèse. Merci à Amélie pour ton soutien et ton humour à rendre jaloux les meilleurs humoristes. Pour finir, merci à tout le groupe d'amis de Roscoff pour les nombreux moments partagés avec vous.

Table des matières

Remerciements ***3***

Introduction ***1***

I- L'huître creuse *Crassostrea gigas* **1**

I.1- *Crassostrea gigas* ou *Magallana gigas* ? 1

I.2- Un mode de vie pélagique et benthique 2

I.3- Une forte capacité d'invasion 3

I.4- L'huître est un animal filtreur 3

I.5- Le système immunitaire de l'huître 5

I.6- L'huître et son microbiote 7

I.7- L'ostréiculture, un secteur fragilisé par les maladies 8

II- Les vibrionaceae **11**

II.1- Classification et diversité génétique 11

II.2- La structure des populations de vibrio dans l'environnement 16

II.3- Les pathologies associées aux vibrios 17

II.4- Coévolution antagoniste 28

III- Les bactériophages **30**

III.1- Classification 31

III.2- Cycle biologique 32

III.3- Le spectre d'hôte des phages 34

III.4- Les mécanismes de résistance bactériens et d'adaptation des phages 36

III.5- Impacts des phages tempérés 40

III.6- Impacts des phages virulents 41

III.7- La thérapie phagique 42

Objectifs de la thèse ***45***

Chapitre I : Évolution des interactions vibrios-huîtres ***47***

I-A Déterminants moléculaires de l'adaptation locale de souches de *Vibrio* aux huîtres, en zone non impactée par la maladie (article 1) 47

Informations supplémentaires 62

I-B Déterminants moléculaires de l'adaptation locale en zone impactée par la maladie (article 2) 65

Supplementary data 80

Chapitre II Étude des interactions entre V. crassostreae et les phages ***93***

Introduction 93

Résultats 94

Matériel et méthodes 129

Discussion ***137***

Conclusion ***149***

Annexe 1 : Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental Vibrio populations ***151***

Références bibliographiques ***185***

Table des figures

Introduction :

Figure 1 : Arbre phylogénétique de la famille des *Ostreidae*. 1
Figure 2 : Cycle de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*..... 2
Figure 3 : Distribution mondiale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*..... 3
Figure 4 : Schéma de l'anatomie de l'huître creuse 4
Figure 5 : Rôle des hémocytes dans la réponse immunitaire de *Crassostrea gigas* 7
Figure 6 : Historique de la production d'huîtres en France des années 1900 à 2012.. 9
Figure 7 : Microscopie électronique d'un biofilm de *V. cholerae* sur une surface de chitine . 11
Figure 8 : Architecture du génome et plasticité des vibrios. 12
Figure 9 : Schéma des trois processus de transfert horizontal de gènes 13
Figure 10 : Notion de population écologique. 17
Figure 11 : Schéma d'un système de sécrétion de type 6 (T6SS) 20
Figure 12 : Schéma de l'architecture génomique et du mode d'action des MARTX 21
Figure 13 : Analyse phylogénétique de souches de *V. aestuarianus*. 22
Figure 14 : Abondance relative de 24 populations de *Vibrio*..... 25
Figure 15 : Rôle des souches non virulentes 26
Figure 16 : Induction d'effets cytotoxiques pour les hémocytes d'huître comme stratégie commune d'évasion immunitaire chez les vibrios. 27
Figure 17 : Représentation schématique de mécanismes de virulence spécifique de population de vibrios. 28
Figure 18 : Mise en évidence du phénomène d'adaptation local 30
Figure 19 : Taxonomie des phages basée sur la morphologie et la composition du génome . 32
Figure 20 : Schéma du cycle infectieux d'un bactériophage. 33
Figure 21 : Représentation schématique de réseaux d'interactions phages-bactéries..... 35
Figure 22 : Représentation schématique de différents mécanismes de défense bactériens. . 36

Chapitre 2 :

Figure 1 : Dynamique de *V. crassostreae* isolés d'huîtres (rose foncé) ou d'eau de mer (rose pâle), avant et pendant la survenue d'un évènement de mortalité de l'huître (ombre orange). 95
Figure 2 : Résultats des infections croisées. 98
Figure 3 : Résultats des infections croisées des 158 souches de *V. crassostreae* par les 75 phages. 99

Figure 4 : Bilan des phages infectant des souches appartenant à des espèces autres que *V. crassostreae* 100
Figure 5 : Matrice d'infection avec le nombre minimal de phages. 101
Figure 6 : Dendrogramme basé sur le profil d'infection des phages 102
Figure 7 : Matrice d'infection pour l'étude de l'impact temporel des combinaisons vibrio-phage. 1103
Figure 8 : Le graphique représente le nombre de souches de *V. crassostreae* isolées en 2014 (barres grises) et en 2017 (barres noires) infectées par des phages isolés en 2017. 104
Figure 9 : Analyse du pan-génome des 158 souches de *V. crassostreae* 105
Figure 10 : Observation en microscopie électronique des 75 phages 107
Figure 11 : Taille des capsides des Podoviridae (bleu), Siphoviridae (rouge) et Myoviridae (vert) 108
Figure 12 : Le réseau de familles de gènes (% identité AA> 30% ; Lrap> 80%) 2109
Figure 13 : Le clade de vibrio correspond à l'unité de prédation par les phages 113
Figure 14 : Détermination des profils entre clusters de phages et clade de souches de *V. crassostreae* 114
Figure 15 : Génomique comparative des souches de *V. crassostreae* 117
Figure 16 : génomique comparative du cluster de phages P8 119
Figure 17 : dynamique d'infection de la souche 35_O_144 (clade 7) par le phage 144E46.1 (Q27) à une MOI de 10 dans trois conditions : milieu de culture Zobell, plasma et hémolymphe d'huîtres 121
Figure 18 : Graphique d'assemblage du contig unique de 6E35.1a. 123
Figure 19 : Organisation du génome du phage 6E35.1a 123
Figure 20 : Comparaison du locus de gènes de structure du phage avec KVP40 et T4 124
Figure 21 : Voie de biosynthèse des dérivés de 7-déazaguanine du phage 6E35.1a 126
Figure 22 : Suivi des paramètres de température et salinité à la pointe du château, lors de l'échantillonnage en série 130

Table des tableaux

Introduction :

Tableau 1 : Essais de phagothérapie contre des vibrios pathogènes d'animaux marins (modifié de Kalatzis et al. 2018). 44

Chapitre 2 :

Tableau 1 : Souches ayant permis d'isoler des phages co-occurrents à partir de floculat ou d'huîtres. 96

Tableau 2 : Bilan du nombre de phages minimal pour infecter la majorité des souches de *V. crassostreae* 102

Tableau 3 : Récapitulatif de la composition des 8 clades de *V. crassostreae*. 106

Tableau 4 : Généralités sur les phages séquencés lors de cette étude 110

Tableau 5 : identification de la présence d'intégrases. 111

Tableau 6 : identification des ARNs de transfert 112

Tableau 7 : génomique comparative des souches *V. crassostreae* résistantes à P8 118

Introduction

I- L'huître creuse *Crassostrea gigas*

I.1- *Crassostrea gigas* ou *Magallana gigas ?*

La classification des huîtres appartenant à la famille *Ostreidae* a récemment été remise à jour par une analyse phylogénétique basée sur un alignement de séquences l'ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) des gènes de l'ARN ribosomiques. Quatre sous-familles ont été décrites (Figure 1) : *Crassostreinae, Ostreinae, Saccostreinae et Striostreinae* (Salvi et al. 2016). Ces analyses ont permis de discriminer deux genres au sein des *Crassostreinae* : *Crassostrea* et *Magallana*. L'huître creuse du Pacifique, jusqu'alors appelée *Crassostrea gigas*, a été reclassée au sein du genre Magallana : *Magallana gigas* (Salvi et al. 2014 ; Salvi et al. 2016). Le nom d'espèce *Magallana gigas* reste cependant faiblement utilisé dans la littérature, nous continuerons donc d'utiliser le nom d'espèce *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) dans la suite de ce manuscrit.

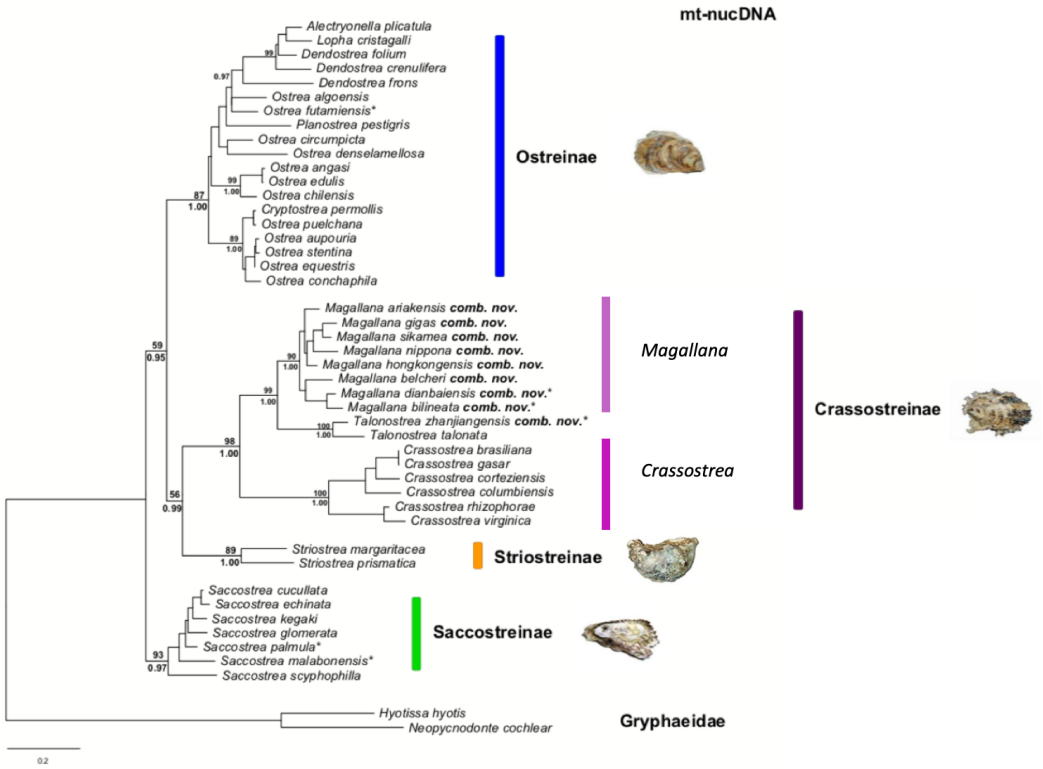


Figure 1 : Arbre phylogénétique de la famille des *Ostreidae*, basé sur l'ARNr 16S et le COI (cytochrome oxydase I) mitochondrial ainsi que les ARNr ITS2 et 28S (Adapté de Salvi et al. 2016).

L'huître creuse est un organisme diploïde possédant 10 paires de chromosomes (Bouilly et al., 2008). En 2012, le génome de *C. gigas* d'une taille de 558 Mb a été entièrement séquencé (G. Zhang et al. 2012). Approximativement 28 000 gènes ont été prédits dont 96,1% sont exprimés dans divers tissus et stades de développement. Le génome de l'huître est hautement polymorphe et riche en séquences répétées (36,1% du génome). De nombreuses transposases et reverse transcriptases sont exprimées, suggérant un rôle important des transposons et retrotransposons dans la plasticité génomique de *C. gigas* (G. Zhang et al. 2012).

I.2- Un mode de vie pélagique et benthique

L'huître creuse est une espèce hermaphrodite protandre. La majorité des individus est mâle au début de la vie adulte, puis femelle. La gamétogénèse est induite par une augmentation de la température de l'eau couplée à un fort apport en nutriments. Les ovocytes et spermatozoïdes sont relargués dans la colonne d'eau où peut se produire la fécondation (Fabioux et al. 2005). Vingt-quatre heures après fécondation, l'huître entame un mode de vie pélagique sous forme de larve D (Figure 2), évoluant vers le stade véligère (~20 jours) puis pédivéligère (~21 jours). Au stade pédivéligère, la larve se fixe sur un support, rentre en métamorphose et entame alors un mode de vie benthique. L'huître est considérée comme juvénile jusqu'à la première maturation.

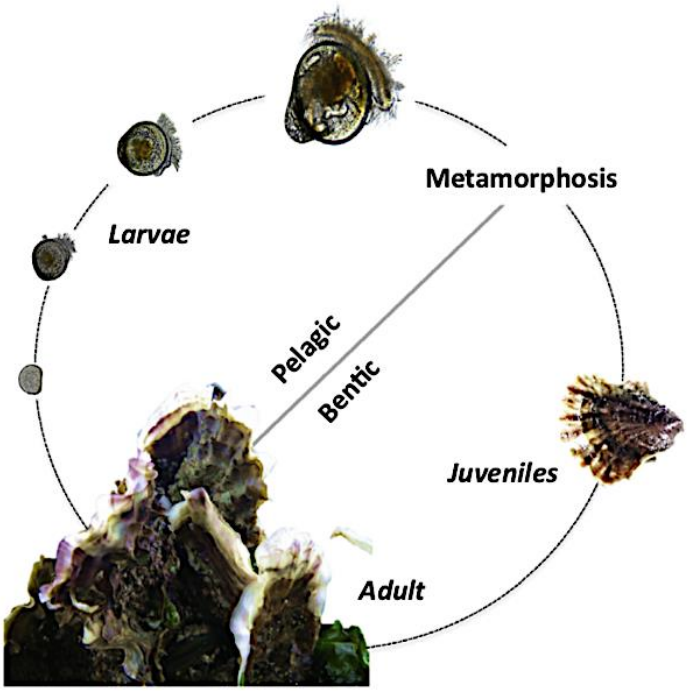


Figure 2 : Cycle de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas.* L'huître creuse adopte deux modes de vie : une vie pélagique au stade larvaire, puis une vie benthique suite à la fixation des larves sur un substrat (D'après Le Roux et al. 2016).

I.3- Une forte capacité d'invasion

Originaire du Japon, *C. gigas* est aujourd'hui largement répandue dans le monde (Figure 3). Cette large distribution résulte d'une part de sa forte capacité de dispersion à l'état larvaire et d'autre part de sa faculté d'adaptation (Figure 3). Cette espèce se retrouve en eaux océaniques ou estuariennes et supporte une large gamme de température et de salinité (Miossec et al. 2009). De plus, le changement climatique semble avoir un impact sur sa répartition géographique (Miossec et al. 2009).

Deux invasions indépendantes par *C. gigas* ont eu lieu sur les îles de Texel (Pays-Bas) et de Sylt (Allemagne) dans les années 1990 (Troost 2010). Alors que l'invasion de Texel proviendrait de l'Escaut oriental (estuaire situé au Pays-Bas), l'invasion de Sylt semble avoir pour origine un élevage de naissains britannique de l'île de Sylt (Reise 1998). La différenciation génétique de ces populations de *C. gigas* a été démontrée (Moehler et al. 2011).

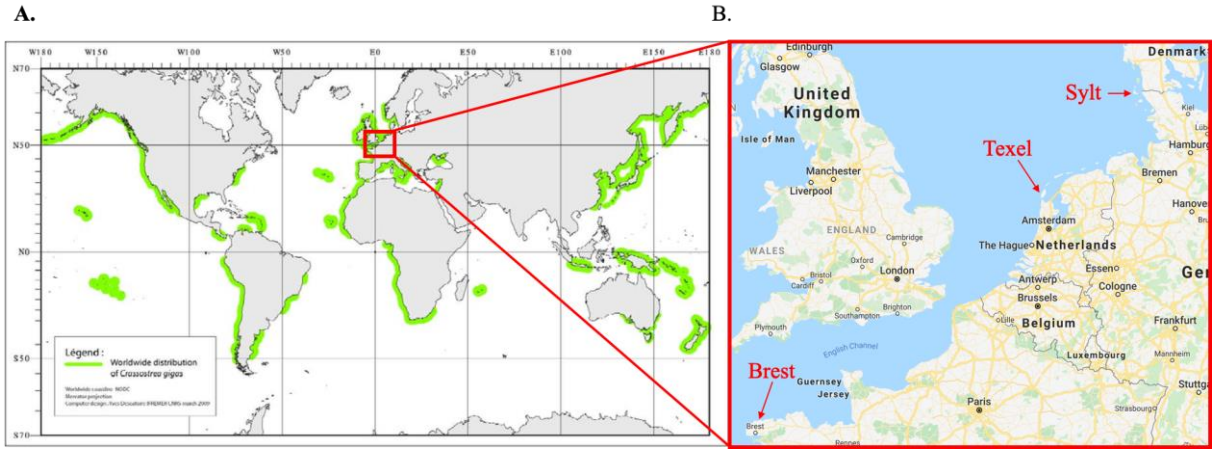


Figure 3 : A. Distribution mondiale de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (D'après Miossec et al. 2009). **B.** Localisation géographique des sites de Brest (France), Texel (Pays-Bas) et Sylt (Allemagne).

I.4- L'huître est un animal filtreur

L'huître est un mollusque bivalve protégé par une coquille dont l'ouverture est contrôlée par le muscle adducteur (Figure 4). Cette coquille constitue une première ligne de défense vis-à-vis de prédateurs.

Le manteau est composé de tissus conjonctifs, de muscles, de nerfs ainsi que de vaisseaux sanguins. Il est constitué de deux lobes ayant des fonctions multiples telles que la gamétogénèse, le stockage de réserves énergétiques et la production de la coquille (Sillanpää et al. 2018).

Les branchies permettent à l'huître de respirer et de se nourrir. Elles constituent une large surface d'échange avec l'eau de mer, permettent la filtration de centaines de litres par jour et la diffusion de l'oxygène dissous vers l'hémolymphe de l'huître. Les particules en suspension dans l'eau de mer (~5-10 µm, i.e. le phytoplancton et les particules organiques) sont retenues à la surface des branchies et sont dirigées par l'intermédiaire des cils présents à la surface des branchies vers les palpes labiaux (la bouche de l'huître) puis le système digestif.

Le cœur est composé de deux oreillettes et d'un ventricule et permet le pompage de l'hémolymphe vers les différents tissus (figure 4B). Le système circulatoire de l'huître est dit « semi ouvert » c'est à dire que l'hémolymphe est propulsée dans les tissus et n'est pas reconduit au cœur par un système veineux.

Le système nerveux de l'huître est peu développé et se compose de ganglions cérébroïdes au niveau des palpes labiaux et de ganglions viscéraux au niveau du muscle adducteur.

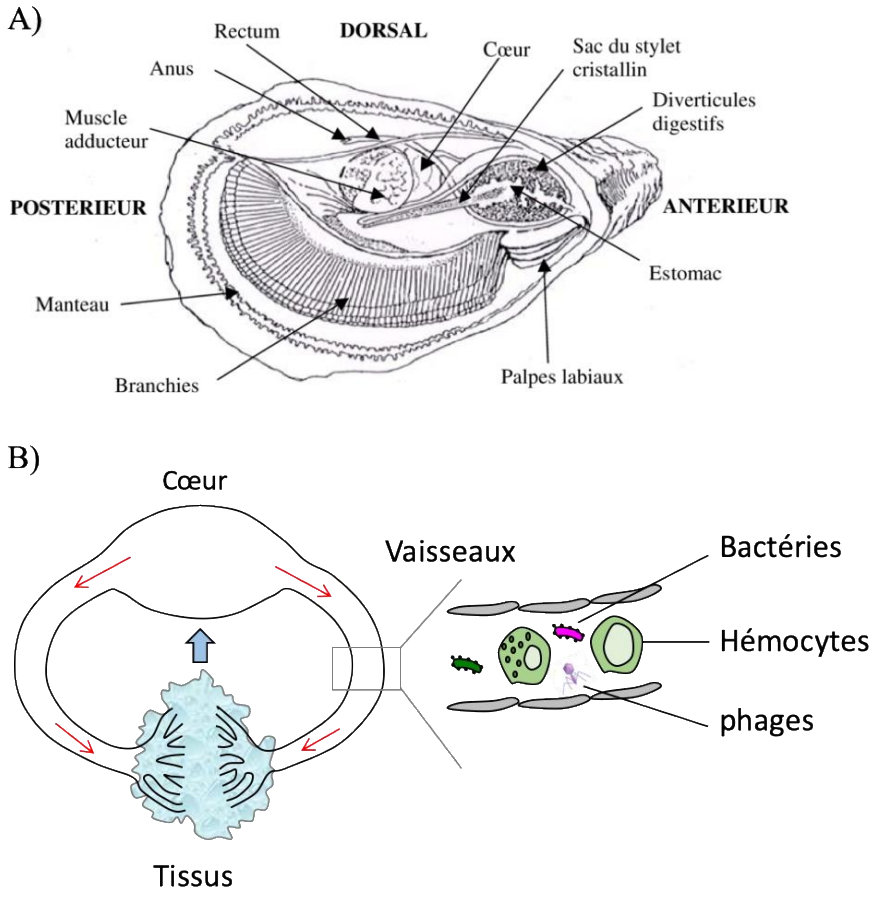


Figure 4 : A. Schéma de l'anatomie de l'huître creuse (d'après Gay et al. 2004 ; Howard et al. 1983). **B.** Schéma du système circulatoire semis ouvert de l'huître. L'hémolymphe est propulsée dans les tissus et n'est pas reconduit au cœur par un système veineux. L'hémolymphe n'est pas un environnement stérile et contient un mélange de plasma, d'hémocytes et de microorganismes (ex : bactéries, phages).

I.5- Le système immunitaire de l'huître

Comme tous les invertébrés, l'huître possède un système immunitaire inné permettant la reconnaissance du non-soi par le biais de récepteurs, des cascades de transduction, la synthèse de peptides antimicrobiens (immunité humorale) ainsi que la phagocytose médiée par les hémocytes (l'analogue fonctionnel du sang chez l'huître) (Bachère et al. 2004 ; L. Wang et al. 2018). Si l'huître ne possède pas de lymphocytes B ou T, l'absence d'un système immunitaire adaptatif chez l'huître a été remise en cause récemment. En effet, il a été possible de protéger l'huître de l'infection par l'herpès virus OsHV-1 pendant plusieurs mois par une injection préliminaire d'une molécule immunostimulante (poly I:C ou Polyinosinic : polycytidylic acid) (Green et al. 2013 ; Lafont et al. 2019). Le poly I :C est un analogue synthétique viral constitué d'ARN double brin. Bien que de nombreux gènes caractéristiques de voies de signalisation intervenant dans la réponse antivirale chez les vertébrés ont été identifiés chez l'huitre (Green et al. 2015), les bases moléculaires de ce mécanisme désigné sous le terme « immune-priming » (Netea 2013), demeurent encore méconnues.

En ce qui concerne les bactéries, une stimulation par une souche de *V. splendidus* inactivée permet une meilleure réponse immunitaire lors d'une seconde infection par *V. splendidus* (T. Zhang et al. 2014). Cependant, les auteurs n'ont pas montré que cette réponse immunitaire plus forte permet une meilleure survie de l'huître.

I.5.1- La reconnaissance par le système immunitaire

La reconnaissance du « non-soi » se fait par l'intermédiaire de différents récepteurs appelés PRRs pour « pattern recognition receptors ». Ces récepteurs reconnaissent des ligands spécifiques ou PAMPs (pour « pathogen-associated molecular pattern »). De nombreux gènes codant ces récepteurs ont été identifiés chez l'huître (G. Zhang et al. 2012). Il s'agit par exemple de protéines de reconnaissance du peptidoglycane (Royet et al. 2011), de lectines, de récepteurs « Toll-like », des GNBP pour Gram-negative binding proteins (L. Wang et al. 2018), de récepteurs « scavengers » et des protéines apparentées au fibrinogène (Hanington et al. 2011).

Si l'activation de l'expression de certains de ces gènes semble induit au cours de l'infection par des pathogènes viraux ou bactériens (Fleury et al. 2010 ; Huvet et al. 2004 ; Green et al. 2015), la démonstration fonctionnelle de leur rôle dans la réponse immunitaire reste non résolue en raison d'absence d'outils génétique chez l'huître.

I.5.2- L'élimination des pathogènes

La réponse immunitaire repose sur deux types cellulaires, les hémocytes et les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales de divers organes (notamment les branchies, le manteau, la glande digestive et l'intestin) produisent des composés microbicides appelés peptides/protéines antimicrobiens (AMP) (Gueguen et al. 2006 ; Bachère et al. 2015 ; Itoh et al. 2008). Parmi ces composés microbicides on retrouve : les défensines, les molluscidines, les protéines bactéricides augmentant la perméabilité, les ubiquitines et les histones (Bachère et al. 2015).

Les hémocytes sont des cellules immunitaires circulant dans l'hémolymphe ayant la capacité de traverser les tissus de l'huître (Bachère et al. 2015). Bien qu'une définition fonctionnelle des différents types de cellules immunitaires n'ait pour le moment pas été établie, trois populations de cellules ont été décrites par microscopie et cytométrie. Il s'agit des « blast-like » (petites cellules avec fort ratio noyau/cytoplasme), des hyalinocytes (absence de granule dans le cytoplasme) et des granulocytes (présence de granules dans le cytoplasme) (Bachère et al. 2015).

Les hémocytes sont capables de distinguer le « soi » et le « non-soi » par l'intermédiaire de récepteurs reconnaissant les PAMPs ou d'opsonines leur permettant ensuite de déclencher la phagocytose et la sécrétion de composé antimicrobien (AMP, piège à ADN, enzymes hydrolytiques et espèces réactives de l'oxygène) (Bachère et al. 2015) (Figure 5).

Lors de la phagocytose, le micro-organisme est endocyté dans une vacuole cytoplasmique de l'hémocyte, appelé phagosome. Ce phagosome va ensuite fusionner avec des compartiments lysosomaux et devenir un phagolysosome. L'acidification de ce compartiment, couplé à la présence d'hydrolases, protéases, peptides/protéines antimicrobiens ainsi que des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, induit la dégradation du micro-organisme (Bachère et al. 2015). La phagocytose joue un rôle clé dans la réponse immunitaire antibactérienne (Bachère et al. 2015).

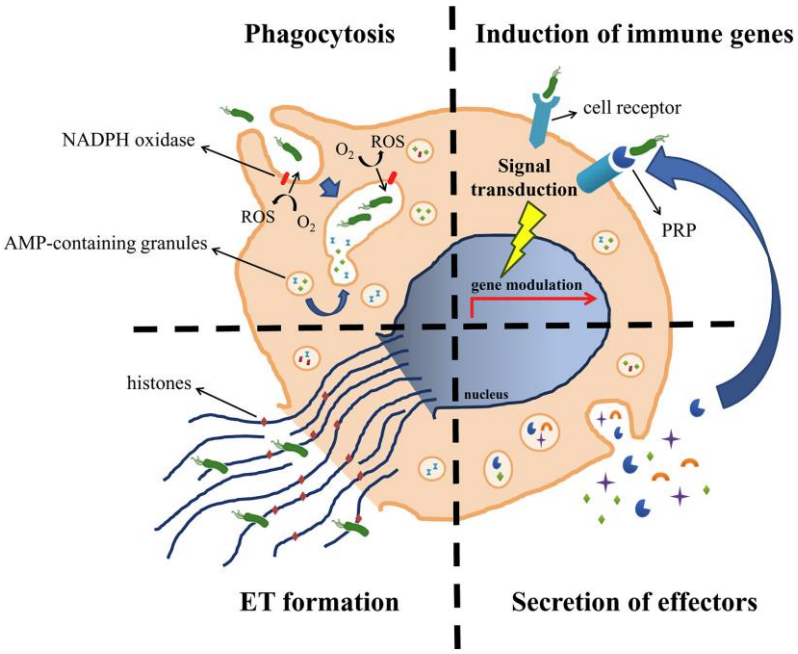


Figure 5 : Rôle des hémocytes dans la réponse immunitaire de *Crassostrea gigas*. Après la reconnaissance des pathogènes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, l'hémocyte peut phagocyter le pathogène puis le dégrader (par l'intermédiaire d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, d'enzymes hydrolytiques et de lysozyme), le piéger et empêcher sa dissémination (par l'intermédiaire de piège à ADN : ET) et sécréter des peptides antimicrobiens (D'après Bachère et al. 2015).

I.6- L'huître et son microbiote

L'importance du microbiote pour l'homéostasie, la survie et le développement des organismes semble généralisable à tous les métazoaires (McFall-Ngai et al. 2013). Chez l'huître la présence de microorganismes est loin d'être restreinte au système digestif. Lors de la filtration, de nombreux microorganismes se concentrent au niveau des branchies et peuvent alors coloniser l'hémolymphe. En raison d'un système circulatoire semi ouvert, l'hémolymphe et son microbiote sont propulsés du cœur vers les tissus, qui baignent alors dans un mélange de plasma, d'hémocytes et de microorganismes (figure 4B). Des études de métabarcode de l'ARNr 16S ont révélé la présence de bactéries appartenant aux classes des Proteobacteria (γ, α, ε, δ) Flavobacteriia et Mollicutes pour citer les plus abondantes (de Lorgeril et al. 2018 ; Lokmer and Mathias Wegner 2015). Parmi les bactéries cultivables, certaines souches de *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* isolées de l'hémolymphe synthétisent des peptides antimicrobiens actifs contre des pathogènes bactériens (Defer et al. 2013) suggérant un rôle de ces bactéries dans la défense de l'huître.

Les conditions environnementales et des facteurs génétiques influencent fortement le microbiote des huîtres (Wegner et al. 2013 ; Lokmer et al. 2015 ; Lokmer et al. 2016 ; Clerissi

et al. 2018). Chez les huitres plus résistantes aux infections par des pathogènes, le microbiote semble plus diversifié et stable (Clerissi et al. 2018).

Plusieurs études ont montré une abondance de phages chez les huîtres (DePaola et al. 1997; DePaola et al. 1998) et proposé leur utilisation pour éliminer les pathogènes humains présents chez ces animaux (H. Zhang et al. 2018 ; Le et al. 2018). Le rôle joué par les phages dans le contrôle de la densité des pathogènes bactériens par prédation, l'émergence de souches virulentes par transduction, et plus généralement l'effet des phages sur le microbiote et la santé des huîtres n'a pour le moment pas été exploré.

I.7- L'ostréiculture, un secteur fragilisé par les maladies

L'huître plate *Ostrea edulis*, l'espèce endémique en France, a subi une succession d'épizooties entre 1960 et 1980 liées aux parasites *Marteilia refringens* (protozoaire extracellulaire parasite de l'appareil digestif (Grizel 1974 ; Le Roux et al. 2001) et *Bonamia ostreae* (protozoaire parasite intracellulaire des hémocytes) (Pichot et al. 1981 ; Cochennec et al. 2000) (figure 6). Ces épizooties ont conduit à une baisse de 90% de la production d'huîtres plates en France.

Au même moment (1970), la décimation de l'huître creuse portugaise (*Crassostrea angulata*) par un Iridovirus a conduit les ostréiculteurs à importer en France l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, du Japon et de la Colombie Britannique. La production mondiale d'huître repose aujourd'hui à 98% sur *C. gigas*, une situation de quasi-monoculture qui fragilise ce secteur économique.

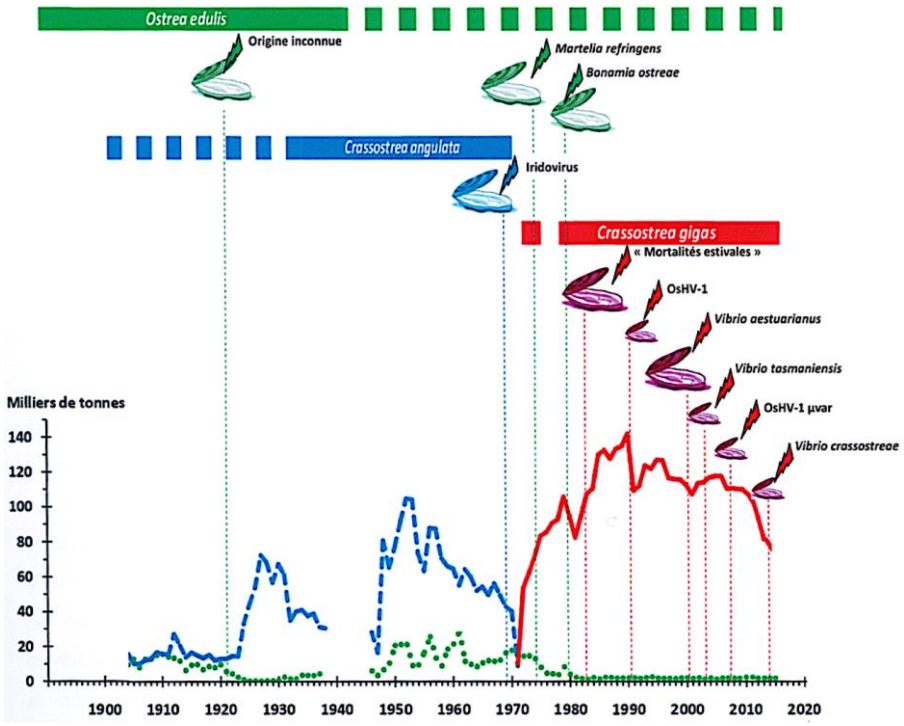


Figure 6 : Historique de la production d'huîtres en France des années 1900 à 2012. (D'après recensements_conchylicoles_2001-2012-lemna-final.pdf et thèse de Maxime Lafont).

I.7.1- Les mortalités de C. gigas au stade larvaire

Des infections affectant les larves de *C. gigas* a été observée dans plusieurs écloseries aux États-Unis ainsi que dans des stocks sauvages en 1978 avec des taux de mortalité pouvant atteindre 95% dans des conditions de cultures intensives (Leibovitz et al. 1978). Des analyses histologiques ont permis d'identifier un virus classé dans la famille des *Iridoviridae* associé aux mortalités (Leibovitz et al. 1978). En France et en Nouvelle Zélande, des cas de mortalités liés à la présence d'un virus morphologiquement proche de la famille des herpès virus et désigné Ostreid Herpes virus 1 (OsHV-1) ont été observés au début des années 90 (Nicolas et al. 1992 ; Hine et al. 1992 ; Renault et al. 1994).

Différentes espèces de *Vibrio* ont été décrites comme étant des agents éthologiques de mortalité de larves et de naissain de *C. gigas* en écloserie (Dubert et al. 2017). Parmi ces espèces on retrouve par exemple : *V. coralliilyticus*, *V. tubiashii* et *V. splendidus* (Travers et al. 2015 ; Dubert et al. 2017). Le potentiel de virulence, sur les larves, de ces espèces a de nombreuse fois été démontré par des expériences d'infections expérimentales.

I.7.2- Les mortalités de C. gigas au stade juvénile

En France, trente ans après l'introduction de *C. gigas* (2000), des mortalités ont été décrites sur certains parcs ostréicoles touchant les stades juvénile et adulte (Samain et al. 2008). Ces « mortalités estivales » présentaient une origine multifactorielle associant : i) des conditions environnementales particulières (température >19°C) ; ii) le statut physiologique de l'huître (maturation ou gamétogénèse) ; iii) une prédisposition génétique et une plus grande sensibilité des animaux diploïdes versus triploïdes. Plusieurs agents pathogènes ont été isolés d'animaux malades. Il s'agit du virus herpes OsHV-1 et de diverses bactéries du genre *Vibrio* (Samain et al. 2008 ; Le Roux et al. 2004 ; Labreuche et al. 2006 ; Gay et al. 2004 ; Lacoste et al. 2001).

A partir de 2008, des mortalités massives d'huîtres creuses s'étendent à toutes les régions côtières françaises (Atlantique, Manche et Méditerranée) (Bédier 2009; Petton et al. 2013). Ces épisodes de mortalités se distinguent des « mortalités estivales » par i) un seuil de température de 16°C au lieu de 19°C ; ii) l'absence de lien avec l'état de maturation de l'animal ; iii) une sensibilité similaire des animaux diploïdes et triploïdes ; iv) la présence d'un variant du virus OsHV-1 (µVar). Ce phénomène désigné « syndrome de surmortalité massive des juvéniles » ou POMS (Pacific Oyster Mortality Syndrome) affecte aujourd'hui la plupart des pays producteurs en Europe (Irlande, Royaume-Unis, Espagne, Italie et Portugal) (Peeler et al. 2012; EFSA Panel on Animal Health and welfare (AHAW) 2010), en Australie (Jenkins et al., 2013), Nouvelle-Zélande (Keeling et al. 2014), en Chine (Bai et al. 2015) et au Japon (Shimahara et al. 2012).

Mitta et collaborateurs ont récemment montré qu'une étape initiale et nécessaire au POMS est l'infection de l'huître par le virus OsHV-1 µVar. La réplication du virus induit un état d'immunosuppression permettant une infection secondaire par des bactéries opportunistes (de Lorgeril et al., 2018). Trois ans auparavant, Petton et collaborateurs, démontraient que le traitement d'huîtres malades par un antibiotique (chloramphénicol) diminuait considérablement l'apparition de mortalités sans pour autant altérer la réplication du virus OsHV-1 (Petton et al. 2015). Si ces deux études s'accordent sur un rôle des bactéries dans l'apparition des mortalités, elles ne permettent pas de conclure sur la nature des bactéries impliquées. S'agit-il de n'importe quelles bactéries du microbiote ou bien de bactéries spécifiques possédant un pouvoir pathogène ? Comme nous le verrons par la suite, les travaux de notre équipe ont montré que les vibrios, en particulier *Vibrio crassostreae*, constituent une pièce importante du puzzle POMS.

II- Les vibrionaceae

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries ubiquistes hétérotrophes des environnements aquatiques. Ces bactéries Gram négatives, du phylum des γ–Proteobacteria et de la famille des *Vibrionaceae* regroupent des bactéries extrêmement diverses sur le plan génétique et métabolique (Figure 7).

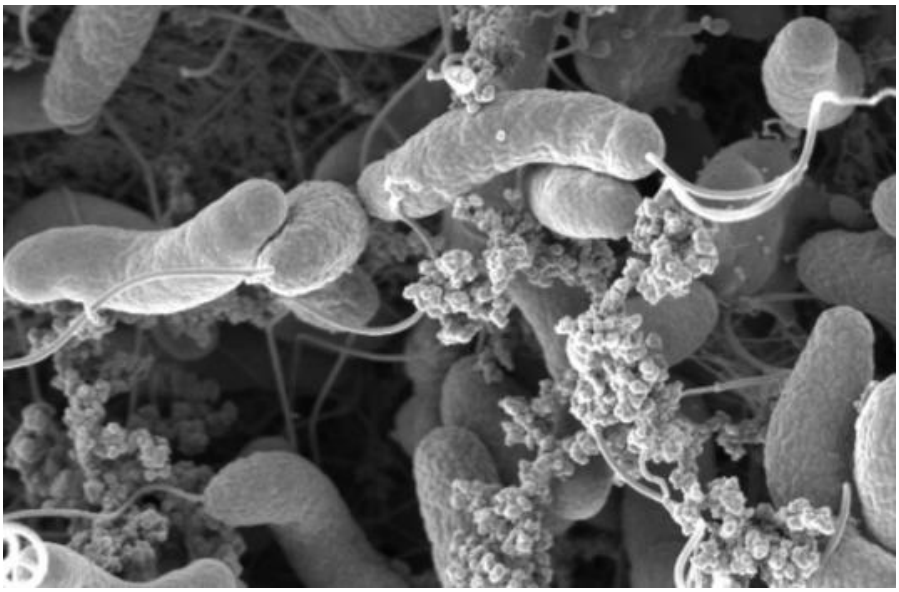


Figure 7 : Microscopie électronique d'un biofilm de *V. cholerae* sur une surface de chitine. *V. cholerae* a une forme typique en virgule. Les vibrios ont une taille de 1,5 à 3 µm de long et de 0,5 µm de large (D'après Le Roux et al. 2018).

II.1- Classification et diversité génétique

Cent quarante-deux espèces ont été décrites au sein des *Vibrionaceae* et classées en sept genres : *Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* et *Vibrio* (Sawabe et al. 2013). La diversité phénotypique et écologique des vibrios résulte d'une capacité à générer de la diversité génétique, par i) mutations ou petites délétions, transférées verticalement à la progéniture ou ii) par transfert horizontal de gènes (HGT) (Hazen et al. 2010).

Les HGTs contribuent à une variation importante du contenu en gènes et de la taille du génome des vibrios (Figure 8) (Okada et al. 2005 ; Thompson et al. 2004). Les vibrios possèdent deux chromosomes, le chromosome I code pour la plupart des fonctions essentielles alors que le chromosome II contient une plus grande proportion de gènes accessoires, spécifiques de souche. Ce second chromosome provient de l'acquisition d'un mégaplasmide qui a secondairement acquis des gènes essentiels permettant sa domestication (Heidelberg et al. 2000 ; Fournes et al. 2018).

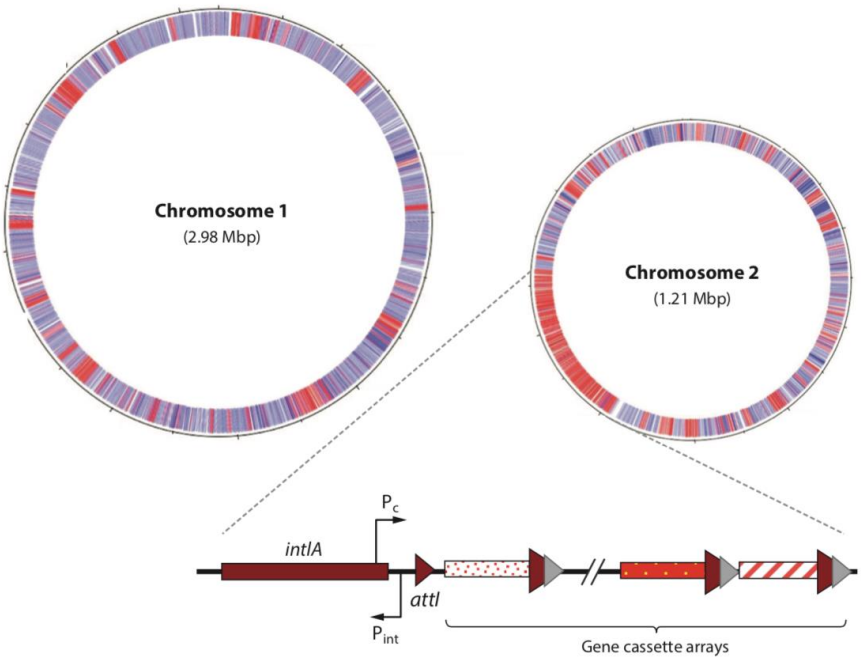


Figure 8: Architecture du génome et plasticité des vibrios. Représentation des deux chromosomes de la souche 02_041 de *V. aestuarianus* et génomique comparative sur 216 génomes de *Vibrionaceae*. Le gradient du bleu au rouge représente le nombre de génomes de *Vibrionaceae* contenant des gènes orthologues pour chaque cadre de lecture ouvert / à chaque position du cadre de lecture ouvert. Les gènes en rouge sont uniques à *V. aestuarianus* 02_041. La région zoomée du chromosome 2 correspond à l'intégron chromosomique. La plateforme fonctionnelle de l'intégron, portant le gène d'intégrase *intIA*, les deux promoteurs P_{int} et P_c, le site de recombinaison primaire (*attI*) et les cassettes de gènes sont indiqués (D'après Le Roux et al. 2018).

Les HGT ont été impliqués dans la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques (Barlow et al. 2009), de gènes de virulence (Hazen et al. 2010) et de gènes impliqués dans l'adaptation à une nouvelle niche écologique (Wiedenbeck et al. 2011). Trois principaux mécanismes de HGT ont été décrits chez les vibrios (Figure 9) : la transformation, la transduction et la conjugaison.

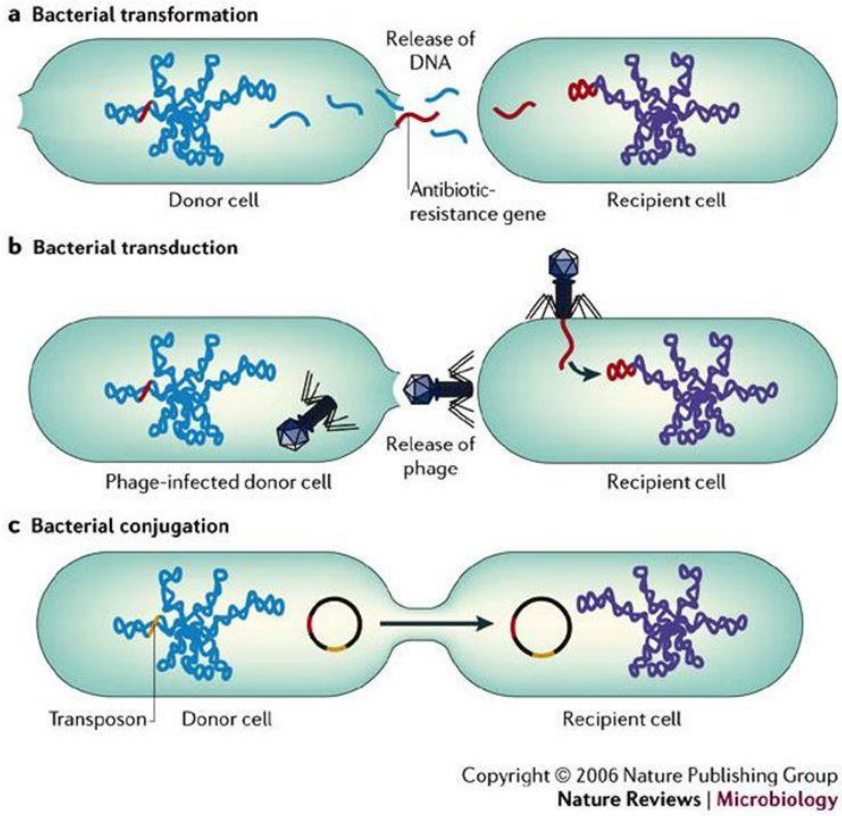


Figure 9 : Schéma des trois processus de transfert horizontal de gènes (HGT) (De Furuya et Lowy, 2006)**.**

La transformation est la capacité d'une cellule réceptrice à absorber de l'ADN libre, suivie de son intégration dans le génome de la cellule réceptrice par double recombinaison. Blokesch et collaborateurs ont montré que la formation de biofilm sur de la chitine induisait chez *V. cholerae* (Meibom et al. 2005) et d'autre vibrios (Metzger et al. 2019) un état de compétence à la transformation, médié par une machinerie complexe impliquant le régulateur TfoX et les pili de type IV.

La transduction est le mécanisme par lequel un ADN exogène est introduit dans une cellule receveuse par un bactériophage. Lors d'une infection par un phage tempéré voir partie 3 de l'introduction) l'ADN du phage est injecté dans le cytoplasme bactérien, et se maintient sous forme épisomique ou intégrée (prophage) dans le chromosome de la cellule hôte. L'ADN du prophage se réplique avec le chromosome de l'hôte. Dans des conditions de stress (UV, signal SOS médié par certains antibiotiques), un cycle lytique est induit et conduit à la production de virus. Lors de la **transduction spécialisée**, les gènes adjacents au génome du phage dans le chromosome bactérien peuvent être excisés avec le génome du phage et intégrés dans le chromosome d'hôtes bactériens nouvellement infectés (Harrison et al. 2017). Dans la

transduction généralisée, seuls des fragments d'ADN bactérien sont emballés dans la capside virale (Harrison et al. 2017). Ils peuvent cependant être transférés à de nouveaux hôtes bactériens sensibles et être intégrés par recombinaison. La transduction généralisée peut également être médiée par les phages virulents. Les mutations de divers gènes, du phage T4, impliqués dans la dégradation de l'ADN de l'hôte (par exemple, la rupture nucléaire, ndd; endonucléase, denB) se sont avérées augmenter la fréquence de la transduction généralisée (Young et al. 1982). Les systèmes les mieux étudiés de transduction généralisée concernent Escherichia coli-phage P1 et Salmonella enterica-phage P22 (Thierauf et al. 2009).

De plus, lorsque les phages tempérés contiennent des gènes que l'hôte bactérien peut utiliser pour augmenter sa virulence, un phénomène de conversion lysogénique peut se produire (c'est-à-dire une conversion médiée par les phages d'une souche non virulente en une variante virulente) (Monteiro et al, 2019). Le phage CTX de *V. cholerae* est un modèle bien connu de conversion lysogénique. Ce phage code pour la toxine cholérique, l'un des principaux facteurs de virulence de l'agent étiologique du choléra (Kim et al. 2014). Le récepteur de ce phage est un pilus (Tcp) qui provient lui aussi d'un HGT.

La conjugaison correspond au transfert de matériel génétique d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse et nécessite un contact de cellule à cellule. **Les plasmides** sont des éléments génétiques extra-chromosomiques qui se répliquent de manière autonome qui portent leur propre origine de réplication (Cabezón et al. 2015). Les **plasmides conjugatifs** possèdent leur propre mécanisme de conjugaison (système de sécrétion de type IV, T4SS, relaxase et protéine de couplage). Les **plasmides mobilisables** ne contiennent pas de T4SS et dépendent de plasmides conjugatifs pour leur transfert (Cabezón et al. 2015). Certains plasmides ne sont ni conjugatifs ni mobilisables et pourraient être transférés par transduction ou transformation (Smillie et al. 2010). La taille des plasmides varie de 2 kb à 1 Mb. Le plus grand plasmide décrit à ce jour chez les vibrios (925 kb) a été identifié dans la souche FORC_036 de *Vibrio vulnificus* (base de données NCBI).

Les éléments transposables sont des séquences d'acides nucléiques capables de mobilité chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Ils permettent la translocation d'informations génétiques au sein d'un réplicon donné, entre réplicon d'une même cellule ou de cellules distinctes (Hochhut et al. 2001). Il en résulte des modifications structurales (délétions, inversions) ou géniques (activation ou inactivation). Les éléments transposables, souvent présents en plusieurs exemplaires chez l'organisme hôte, sont autant de substrats pour la machinerie de recombinaison homologue. Ils permettent donc de transformer transitoirement ou définitivement le patrimoine génétique et contribuent de façon substantielle à la diversité

et à l'évolution des organismes. La « survie » d'un élément transposable résulte d'un équilibre entre l'impact délétère de réarrangement génétique qu'il entraîne et la source d'adaptabilité qu'il représente pour l'organisme hôte. Chaque élément transposable code pour sa propre recombinase (transposase ou intégrase), une enzyme qui possède une double activité clivage/ligation. D'un point de vue structural, les éléments transposables sont extrêmement variés.

Comme les prophages et transposons, **les éléments intégratifs et conjugatifs (ICE),** sont intégrés dans le chromosome de l'hôte et se propagent par transmission verticale (Burrus 2017). Ils se distinguent par leur capacité d'excision du génome et de transfert par conjugaison. Dans des conditions de stress, l'ICE est excisé du chromosome de l'hôte sous forme circulaire et est transféré via un T4SS à la cellule réceptrice. La taille des ICEs varie de 20 à 500 Kb (Johnson et al, 2015). L'élément STX de *V. cholerae*, code plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, tels que le sulfaméthoxazole, le triméthoprime, le chloramphénicol et la streptomycine (Hochhut et al. 2001).

Les intégrons ne sont pas définis comme des éléments mobiles mais comme des éléments de capture de fragments exogènes (Mazel 2006). Ce sont des systèmes naturels de clonage et d'expression qui, sous le contrôle d'une intégrase, incorporent des « cassettes » pour les convertir en gènes fonctionnels (Mazel 2006). Les cassettes sont des séquences constituées d'un cadre de lecture associé à un site de recombinaison *attC* (Figure 8). L'intégron est constitué d'une intégrase codée et régulée respectivement par un gène (*intI)* et son promoteur P_{int}, d'un site primaire de recombinaison *attI*, d'un promoteur fort P_{ant} situé en amont du site *attI.*

Les intégrons multirésistants sont portés par des plasmides et contiennent des cassettes constituées de gènes de résistances aux antibiotiques. Une autre classe d'intégron, le super-intégron ou intégron chromosomique, a été mise en évidence chez *Vibrio cholerae* (Rowe-Magnus et al, 1999). Il diffère par sa taille (179 cassettes chez *V. cholerae*, 3% du génome) et une grande hétérogénéité des sites *attC*. Par la suite, des intégrons chromosomiques ont été mis en évidence chez d'autres espèces de *Vibrio* (*V. mimicus, V. metschnikovii, V. parahaemolyticus et V. fisheri*) mais aussi chez d'autres genres bactériens comme *Pseudomonas* ou *Shewanella* (Biskri et al. 2005). La majorité des cassettes des super-intégrons portent des gènes auxquels aucune fonction n'a pour le moment été assignée, une minorité code pour des fonctions adaptatives très variées dont des facteurs de virulence et des résistances aux antibiotiques (Escudero et al. 2016).

II.2- La structure des populations de vibrio dans l'environnement

Les vibrios sont facilement isolables et cultivables permettant le séquençage de marqueurs ou de génomes entiers et l'obtention d'une résolution phylogénétique d'isolats au niveau individuel et à fine échelle. Une série de travaux réalisée par l'équipe de notre collaborateur M. Polz (MIT, USA) a montré que malgré une importante diversité génétique, ces bactéries se répartissent en groupes phylogénétiques partageant un mode de vie (planctonique ou associé à des particules) et des préférences pour un habitat (Hunt et al. 2008) (Figure 10). Les flux de gènes apparaissent plus fréquents au sein du clade qu'entre clades (Shapiro et al. 2012) et la production de « biens publics » (antibiotiques, sidérophores) régirait une cohésion sociale entre souches (Cordero, Ventouras, et al. 2012 ; Cordero, Wildschutte, et al. 2012). Ainsi chez les vibrios, ces groupes phylogénétiques pourraient satisfaire le concept de population en écologie. Dans la plupart des cas, la structure des populations de vibrios est congruente avec l'affiliation taxonomique au niveau de l'espèce (Preheim et al. 2011).

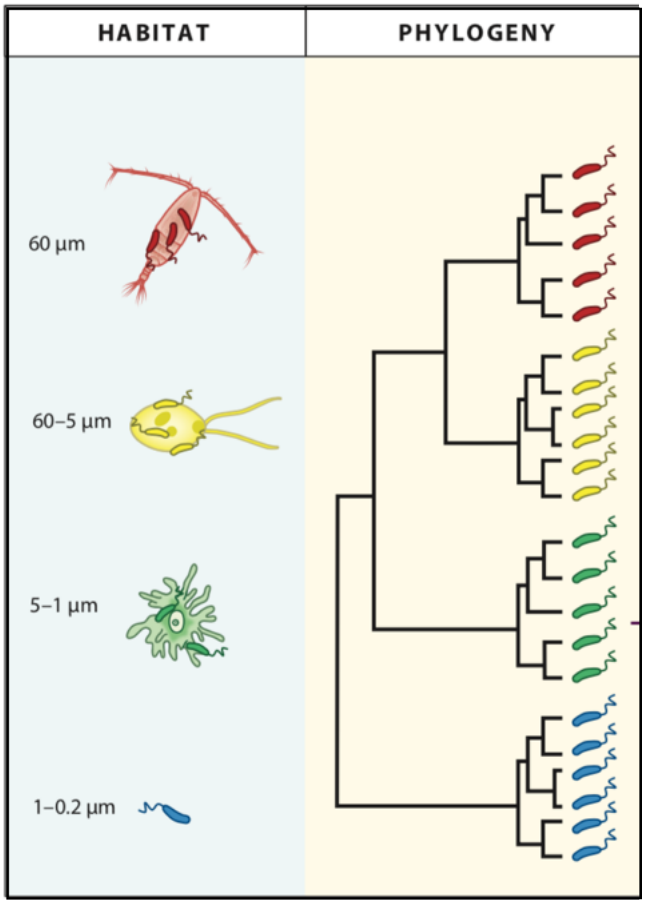


Figure 10 : Notion de population écologique. Malgré la diversité génétique, les vibrios sont divisés en clades phylogénétiques (droite) avec préférences d'habitat (gauche). Habitats : libres / planctoniques (bleu), associés à des particules ou des organismes de petite (vert), moyenne (jaune) ou plus grande (rouge) tailles.

II.3- Les pathologies associées aux vibrios

Lorsque les vibrios sont associés à des organismes, ils peuvent entretenir des relations de type symbiotique, commensal ou pathogène. Les gènes de virulence peuvent être transmis par HGT (Le Roux et al. 2018), mais des caractéristiques génomiques préexistantes peuvent être nécessaires à l'acquisition ou à la fonction de ces gènes de virulence (Shapiro et al. 2016).

II.3.1- Exemples de relations pathogènes chez l'Homme

V. cholerae est l'agent responsable d'une maladie diarrhéique sévère, le choléra. Plus de 200 sérogroupes sont connus, mais seuls les sérogroupes O1 et O139 seraient à l'origine d'épidémies de choléra (Baker-Austin et al. 2018). Lors de l'ingestion, l'agent pathogène colonise l'intestin grêle de l'homme. Les symptômes du choléra apparaissent 12 à 72 heures plus tard et entraînent souvent une déshydratation due à une perte importante de liquide diarrhéique (jusqu'à un litre par heure) (Le Roux et al. 2018). L'Organisation mondiale de la santé a estimé qu'en 2015, il y avait 4,3 millions de cas de choléra dans le monde, causant jusqu'à 142 000 décès par an (Le Roux et al. 2018). La pathogenèse sévère chez *V. cholerae*

est déterminée par deux facteurs de virulence principaux : la toxine cholérique (toxine de type AB), qui induit une adénylate cyclase, active l'AMP cyclase et entraine la sécrétion d'ions et d'eau à partir de cellules intestinales, et un appendice d'adhésion appelé Toxin coregulated pili (Tcp). Ces deux déterminants de la virulence sont codés sur des éléments génétiques transférés par HGT. Le Tcp est codé par l'ilot génomique VPI-1 et la toxine cholérique par le prophage CTX. Le Tcp est à la fois essentiel à la colonisation de l'intestin (Herrington et al. 1988 ; Taylor et al. 1987) et constitue le récepteur du phage CTXΦ (Waldor and Mekalanos 1996).

Les sérotypes O1 et O139 regroupent des souches quasi-clonales, ou groupes pandémiques. S'interrogeant sur les raisons pour lesquelles un nombre limité de clones pathogènes ont émergé des populations environnementales de *V. cholerae,* Shapiro et ses collaborateurs (Shapiro et al. 2016) ont montré que des caractéristiques génomiques spécifiques, appelées polymorphismes d'adaptation à la virulence (VAP), constitue un prérequis à l'émergence des groupes pandémiques. Par exemple, seuls les isolats de *V. cholerae* possédant un allèle particulier du gène *ompU* (outer membrane protein U) peuvent coloniser l'intestin.

V. parahaemolyticus, agent responsable de gastro-entérites suite à l'ingestion de coquillages crus est présent dans des zones côtières tempérées et tropicales (Baker-Austin et al. 2018). Malgré la prévalence (environ 30 000 cas annuels) de gastro-entérites provoquées par cette espèce, la compréhension des mécanismes de virulence de cet agent demeure partielle (Baker-Austin et al. 2018). Les deux sérotypes capables de causer des épidémies sont O3:K6 et ST36. De nombreux gènes de virulence putatifs sont portés par des éléments génétiques transférés par HGT. En comparant les génomes de souches pré-pandémiques et pandémiques, il a été possible de détecter 7 ilots génomiques (VPaI-1 à VPaI-7) portés par le chromosome 2 et acquis par transfert horizontal (Espejo, García, and Plaza 2017; Makino et al. 2003). Parmi les gènes portés par VPaI-7, un système de sécrétion de type 3 (T3SS2) et une toxine formant des pores (*tdh* : thermostable direct hemolysin) jouent un rôle important dans la virulence (Makino et al. 2003). VPaI-4 et VPaI-6 codent des gènes de virulence putatifs (protéine M, hydrolases, cytotoxine, colicines) (Hurley et al. 2006).

Deux systèmes de sécrétion de type 6 (T6SS) sont également présents chez certaines souches de *V. parahaemolyticus,* l'un porté sur le chromosome 1 (T6SS1) et l'autre sur le chromosome 2 (T6SS2). Le T6SS2 semble largement distribué chez *V. parahaemolyticus* alors que le T6SS1 est détecté principalement dans des isolats cliniques. Il a été montré que le

T6SS1 joue un rôle dans la compétition bactérienne. Le rôle du T6SS2 semble moins clair mais celui-ci interviendrait dans l'adhésion cellulaire (Yu et al. 2012 ; Salomon et al. 2013).

Les T6SSs sont des seringues moléculaires, utilisées par un large éventail d'espèces bactériennes Gram négatives, permettant la libération de toxines lors d'un contact avec la cellule cible (Joshi et al. 2017). Les gènes codant le T6SS sont généralement organisés dans un opéron d'au moins 13 gènes principaux (Cianfanelli, Monlezun, and Coulthurst 2016), bien que dans certains cas des gènes puissent se situer en dehors de l'opéron. Pour survivre à la production de la protéine effectrice (toxine), la cellule bactérienne doit se protéger par l'intermédiaire de protéines immunitaires spécifiques (Système d'addiction, toxine/antidote) (Russell, Peterson, and Mougous 2014). D'un point de vue structural, le T6SS présente de fortes similitudes avec une queue de phage ancrée dans l'enveloppe de la cellule bactérienne via un complexe associé à la membrane (Figure 11). De plus, de nombreux gènes, tel que *VipA/B*, *Hcp*, *HsiF*, *VgrG* et *PAAR* ont de fortes homologies de séquences avec des gènes du phage T4 (Pukatzki et al. 2007 ; Leiman et al. 2009 ; Cianfanelli et al. 2016).

L'assemblage du T6SS (Figure 11) commence par la formation d'un complexe composé de trois sous-unités (TssJ, TssM et TssL) et associé à la membrane (Durand et al. 2015). Les protéines VgrG, PAAR et les protéines effectrices sont recrutées dans ce complexe et s'assemblent dans la structure. L'interaction du trimer VgrG avec le PAAR ou les effecteurs contribue probablement à la stabilité globale de l'ensemble de l'appareil (Ho, Dong, and Mekalanos 2014). Ensuite, les monomères de Hcp polymérisent à partir du complexe lié à la membrane et forme un tube, puis une gaine composée des protéines VipA et VipB. De façon analogue au phage, un changement de conformation dans la structure de la gaine entraîne une contraction du tube. Il y a alors expulsion du complexe Hcp-VgrG/PAAR permettant la perforation de la membrane de la cellule cible et relargage des effecteurs (figure 11). En fonction des protéines effectrices, les T6SSs peuvent cibler des cellules procaryotes et/ou eucaryotes et donc avoir un rôle dans la compétition bactérienne et/ou la cytotoxicité contre des cellules eucaryotes (Cianfanelli, Monlezun, and Coulthurst 2016). Enfin, la protéine ClpV désassemble la gaine et les composant de la gaine pourront être recyclés pour la construction d'un nouveau T6SS (Ho, Dong, and Mekalanos 2014).

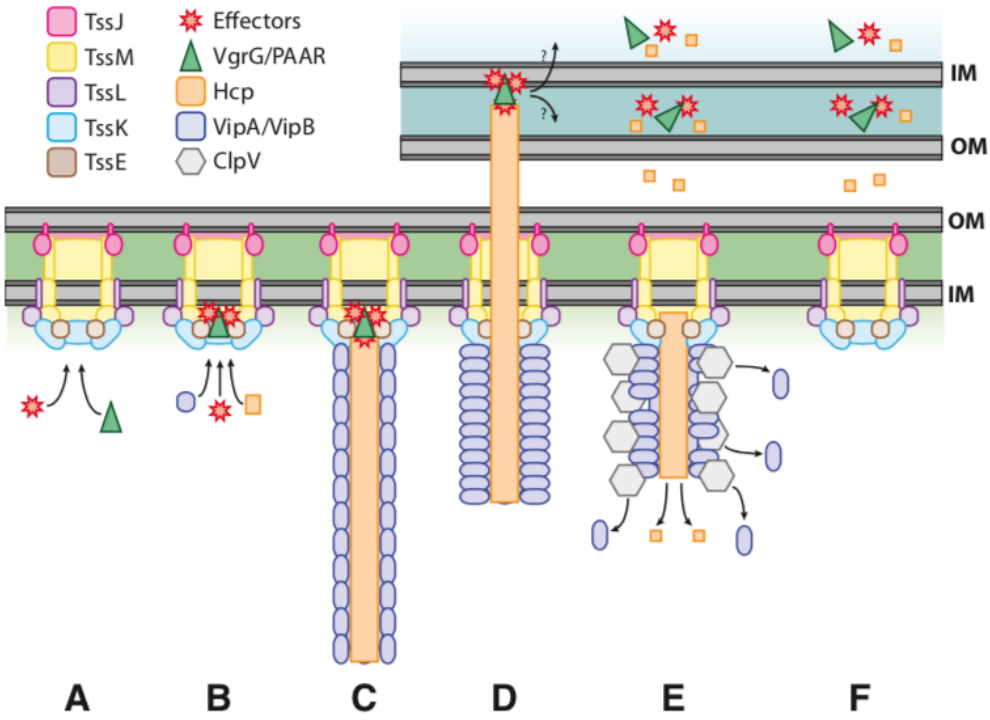


Figure 11 : Schéma d'un système de sécrétion de type 6 (T6SS). A. Formation d'un complexe associé à la membrane composé de trois sous-unité (TssJ, TssM et TssL). **B**. Les protéines VgrG, PAAR et les protéines effectrices sont recrutées dans ce complexe et s'assemblent dans la structure. **C**. le tube Hcp polymérise à partir du complexe lié à la membrane, puis une gaine composée des protéines VipA et VipB polymérise autour du tube Hcp en croissance. **D**. La contraction du tube induit l'expulsion du complexe Hcp-VgrG/PAAR permettant la perforation de la membrane de la cellule cible et relargage des effecteurs. **E**. la protéine ClpV désassemble la gaine et **F**. les composant de la gaine pourront être recyclés pour la construction d'un nouveau T6SS (Ho, Dong, and Mekalanos 2014).

V. vulnificus, agent responsable de septicémies, de nécroses et de gastro-entérites est un pathogène opportuniste de l'Homme. Trois biotypes ont été identifiés: le biotype 1 responsable de la majorité des cas d'ingestion et d'affections cutanées, le biotype 2 responsable de septicémie chez les anguilles d'élevage et plus rarement chez l'Homme et le biotype 3 à l'origine d'infections cutanées chez l'Homme (Baker-Austin et al. 2018).

Bien que les infections soient rares (100 cas par an aux États-Unis), *V. vulnificus* est responsable du plus grand nombre de décès dus à des vibrios aux États-Unis. Cette espèce contient des souches naturellement compétentes qui peuvent donc acquérir fréquemment de l'ADN exogène par HGT compliquant la classification des souches (Quirke et al. 2006) et l'identification de gènes de virulence. Cependant, des gènes codant des polysaccharides de capsule (CPS), une toxine de type MARTX (multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxins protein) et une hémolysine (VvhA) ont été décrit comme nécessaires à la virulence chez certaines souches. Le CPS confère une résistance à l'action bactéricide du sérum, une activité antiphagocytaire et entraînent une létalité élevée pour les souris (Yoshida et al. 1985).

Les toxines MARTX sont des protéines de grande taille (de 3 500 à 5 300 acides aminés)

produites par diverses bactéries Gram négatives, qui interagissent avec un large éventail d'hôtes (Satchell 2015). Après sécrétion par la bactérie, les régions répétées de cette toxine (domaines N- et C-terminal) forment un pore dans la membrane des cellules eucaryotes cibles qui permet la translocation de la partie centrale de la toxine (Satchell 2015). Cette partie centrale contient plusieurs domaines effecteurs. Une fois dans le cytoplasme, le domaine CPD (cystein protease domain) est activée par l'inositol $InsP_6$, clive et active les autres domaines effecteurs (B. Kim 2018). Chaque effecteur a une fonction cytotoxique spécifique (Satchell 2015) (Figure 12). Par exemple l'endopeptidase Ras/Rap1-specific (RRSP) inhibe le récepteur Toll-like et réprime la réponse immunitaire, un domaine « actin cross-linking » ou « Rho- inactivation » induit une dépolymérisation de l'actine du cytosquelette et provoque un arrondissement cellulaire. A ce jour, dix domaines effecteurs différents ont été identifiés parmi les MARTX, bien que chaque toxine ne comporte que deux à cinq effecteurs.

Chez *V. vulnificus*, la MARTX a un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales et permet une propagation systémique dans l'intestin (Gavin et al. 2017). Il a été démontré que l'hémolysine VvhA et la MARTX ont un effet additif sur la destruction du tissu épithélial, provoquant une inflammation par induction de pyroptose, et pouvant entraîner la mort du patient par destruction des tissus dans les organes périphériques (Jeong et al. 2012).

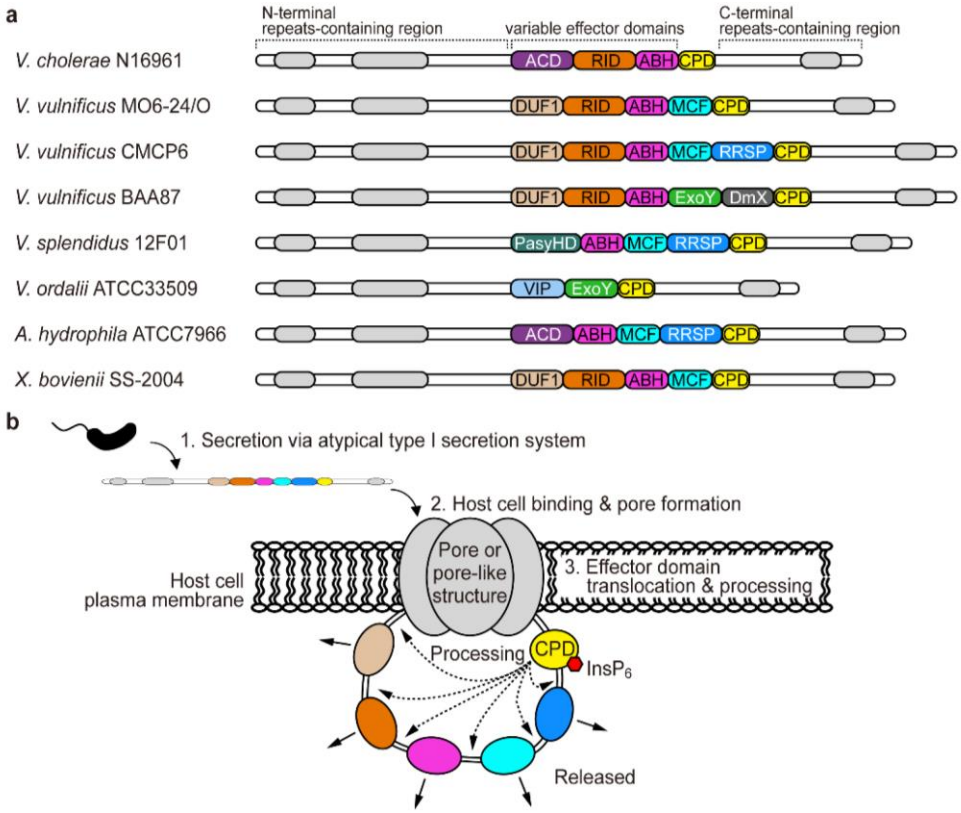


Figure 12 : Schéma de l'architecture génomique et du mode d'action des MARTX. **A.** Les MARTX sont des toxines de grande taille composées d'une région N-terminale et C-terminale contenant des séquences répétées et une région centrale dont la composition en effecteurs varie en fonction des espèces/souches. Le

CPD : cysteine protease domain permet la libération des différentes protéines effectrices (ACD : Actin cross-linking Domain, RID : Rho GTPase-inactivation domain, ABH : alpha/beta hydrolase domain, DUF1 : Domain of Unknown Fonction, MCF : makes caterpillars floppy-like domain, RRSP : Ras/Rap1-specific endopeptidase et ExoY : exoenzyme Y). B. représentation schématique du mode d'action de la MARTX (D'après Kim 2018).

II.3.3- Les maladies de l'huître creuse Crassostrea gigas associées aux vibrios

Différentes espèces de *Vibrio* ont été associées à des épisodes de mortalités affectant les huîtres creuses à différents stades de développement. Il s'agit en particulier de l'espèce *V. aestuarianus* et de diverses espèces du clade Splendidus.

V. aestuarianus

Vibrio aestuarianus a été isolé chez différents organismes marins (Tison and Seidler 1983) notamment chez l'huître creuse (Garnier et al. 2008 ; Samain et al. 2008). Des mortalités associés à cette espèce de *Vibrio* ont été observées à tous les stades de développement (Garnier et al. 2008 ; Saulnier et al. 2010). Cependant, depuis 2012 une augmentation conséquente de la fréquence des mortalités des huîtres est observée au stade adulte (Travers et al. 2015). L'étude de la diversité de souches isolées chez ces huîtres montre qu'elles se regroupent en deux lignées quasi clonales (clades A et B, figure 13), alors que les souches isolées chez des animaux sains, huîtres, coques ou de zooplancton se révèlent plus diverses (Goudenège et al. 2015) .

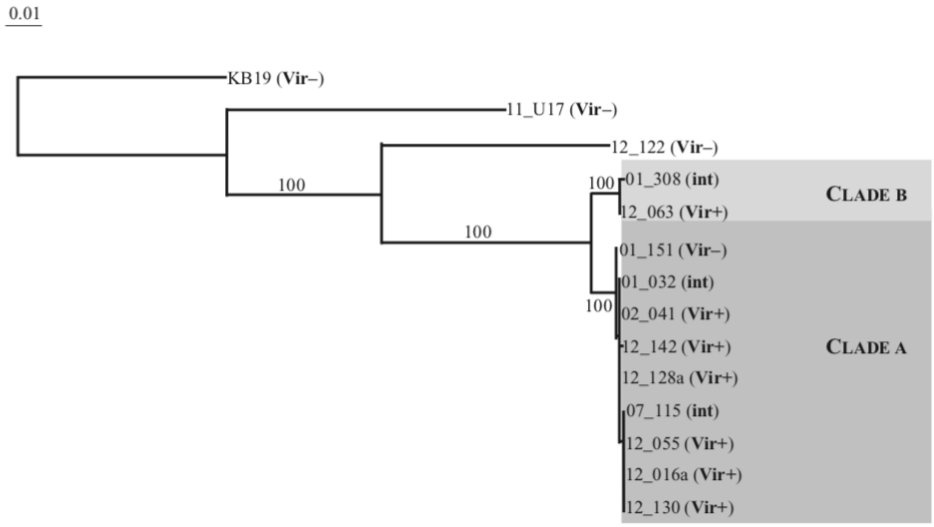


Figure 13 : Analyse phylogénétique de souches de *V. aestuarianus* basée sur des alignements concaténés de séquences d'acides nucléiques. La souche KB19 est utilisée en tant que groupe externe. La virulence de chaque souche est indiquée entre parenthèses (Vir + : virulent ; Vir- : non virulent ; int : intermédiaire) (Goudenège et al. 2015).

La grande majorité des souches du clade A et B sont virulentes suggérant i) que l'ancêtre commun de ces clades était virulent et ii) que les rares souches non virulentes ont perdu un

trait de virulence (Goudenège et al. 2015). Des analyses de génomique comparative ont mis en évidence une unique mutation dans le gène *varS* chez une souche non virulente, aboutissant à l'expression d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Goudenège et al. 2015). Le rôle de ce gène dans la virulence a été validé génétiquement (Goudenège et al. 2015). Ce gène code une protéine histidine-kinase du système VarS/VarA qui contrôle l'expression et/ou la sécrétion d'une métalloprotéase (*Vam*). Cette métalloprotéase confère une activité cytotoxique contre les hémocytes d'huîtres (Labreuche et al. 2010).

Les tentatives d'infections d'huîtres par immersion dans de l'eau de mer contaminée par une culture de vibrios s'avèrent fréquemment infructueuses. En conséquence l'exploration de la virulence des vibrios requiert le plus souvent une injection de bactéries dans le muscle adducteur de l'huître, limitant l'exploration des gènes de virulence impliqués dans l'infection par voie naturelle (Le Roux et al. 2016). Toutefois une étude récente a montré que le passage de *V. aestuarianus* dans les huîtres (par injection) libère dans l'eau environnante des bactéries plus virulentes, alors capables d'infecter des animaux sains par voix naturelles et de causer des mortalités de manière reproductible (Parizadeh et al. 2018). Cette approche expérimentale a confirmé le rôle de *varS* dans la colonisation de l'huître par *V. aestuarianus* (Parizadeh et al. 2018).

Clade Splendidus

Le clade Splendidus regroupe une dizaine d'espèces de *Vibrio* fréquemment associées aux mortalités d'espèces aquacoles et sauvages (Nicolas et al. 1996 ; Sugumar et al. 1998 ; Lambert et al. 1999 ; Lacoste et al. 2001 ; Waechter et al. 2002 ; Gay et al. 2004; Kesarcodi-Watson et al. 2009 ; Beaz-Hidalgo et al. 2010 ; Saulnier et al. 2010).

La souche LGP32 de *V. tasmaniensis* est devenue un modèle d'étude pour la compréhension des interactions vibrio/huître (Gay et al. 2004 ; Le Roux et al. 2009). La porine bactérienne OmpU est un facteur majeur des interactions entre ce vibrio et les hémocytes (Duperthuy et al. 2010; 2011). En interagissant avec une β-intégrine et une superoxyde dismutase extracellulaire jouant le rôle d'opsonine, OmpU favorise l'internalisation bactérienne dans les hémocytes où le vibrio peut survivre dans un état intracellulaire transitoire, notamment grâce à l'expression d'une ATPase (CopA) impliquée dans la résistance au cuivre (Vanhove et al. 2016). *V. tasmaniensis* produit des facteurs toxiques, tels que la métalloprotéase Vsm (Le Roux et al. 2007 ; Binesse et al. 2008). La délétion de ce gène n'entraîne pas d'atténuation de la virulence (Le Roux et al. 2007) et sa présence ou absence ne permet pas de diagnostiquer la

virulence des souches de cette espèce (Saulnier et al., 2010). Par contre injectée aux huîtres, cette protéine est létale (Le Roux et al. 2007 ; Binesse et al. 2008). LGP32 sécrète des vésicules de la membrane externe (Outer Membrane Vesicles, OMV) riche en hydrolases qui peuvent être internalisées par les cellules immunitaires de l'hôte ou libérées par des cellules à l'intérieur du phagosome. L'une de ces hydrolases (Vsp pour vesicular serine protease) s'est révélée nécessaire à la virulence de LGP32 (Vanhove et al. 2015).
Bien que cette souche modèle ait été isolée d'animaux malades, *V. tasmaniensis* n'est pas systématiquement trouvée lors de mortalités. Les huîtres naturellement infectées sont généralement colonisées par un assemblage divers de vibrios (Petton et al. 2015 ; Lemire et al. 2014 ; Wendling et al. 2014) conduisant à émettre l'hypothèse que cette diversité pourrait contribuer à la pathogenèse (Le Roux et al. 2009).

Le développement d'huîtres naïves ou « Specific Pathogen Free » (SPF) a permis d'étudier plus précisément les mécanismes d'infection dans le milieu naturel (Le Roux, Wegner, and Polz 2016). Il s'agit de descendants d'un pool de géniteurs produits en écloserie dans des conditions hautement contrôlées afin de minimiser l'influence de paramètres génétiques et environnementaux pouvant affecter la sensibilité de l'hôte à la maladie. Ces animaux ne sont pas axéniques mais leur charge en vibrios est réduite (<1 CFU/mg) (Petton et al. 2015) et l'herpesvirus OsHV-1 n'est jamais détecté. Ces huîtres ont été placées dans le milieu naturel avant ou pendant un évènement de mortalité puis ramenées au laboratoire pour étudier la structure des populations des vibrios associé aux mortalités (Figure 14). Cette approche a permis de montrer que l'apparition de mortalité chez les juvéniles est associée à un remplacement progressif de divers colonisateurs bénins par des membres d'une population virulente, assignée taxonomiquement à l'espèce *V. crassostreae* (Figure 14, population 11) (Faury et al. 2004 ; Lemire et al. 2014). Bien que cette population soit génétiquement diversifiée, la majorité des membres de cette population induit des mortalités. Cette population est rarement détectée dans la colonne d'eau (S) mais est abondante dans les huîtres malades (O), en particulier dans l'hémolymphe (Bruto et al. 2017) (Figure 14).

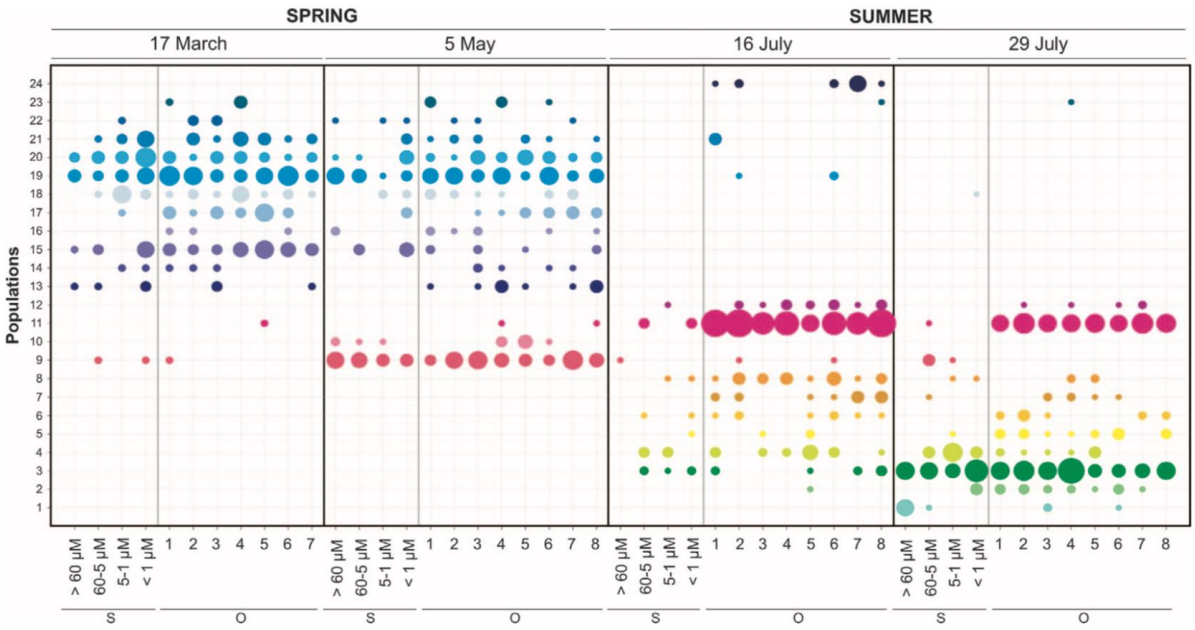


Figure 14 : Abondance relative de 24 populations de *Vibrio* (ordonné) en fonction des fractions et de la date d'échantillonnage. La taille de chaque cercle est proportionnelle à l'abondance relative d'une population dans une fraction. S : fractions d'eau de mer ; O : tissus d'huîtres. Les populations 11 et 24 correspondent respectivement à *V. crassostreae* et *V. splendidus* pop24 (D'après Bruto et al. 2017).

La comparaison des génomes de souches de *V. crassostreae* avec celle d'une population phylogénétiquement proche mais non virulentes, a permis d'identifier un gène du core génome (partagé par toutes les souches de *V. crassostreae*) nécessaire à la virulence. Ce gène désigné *r5-7* code une protéine exportée de fonction inconnue de 798 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 89 kDa (Lemire et al. 2014). Au sein de *V. crassostreae*, la comparaison des génomes de souches virulentes ou non a également permis d'identifier un plasmide conjugatif de 178 kbp appelé pGV1512. Ce plasmide est présent spécifiquement chez les souches virulentes. Le curage de ce plasmide réduit la virulence et son transfert restaure le phénotype de la souche curée indiquant que le plasmide est nécessaire à la virulence de *V. crassostreae* (Bruto et al. 2017). Les gènes de virulence codés par ce plasmide et jusqu'alors inconnus font l'objet du Chapitre 1 de cette thèse (Piel et al. 2019).

V. crassostreae cohabite toujours avec d'autres populations dans l'huître (Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2014). Il a été proposé que les souches non-virulentes jouent un rôle dans cette maladie polymicrobienne (Lemire et al. 2014). Lorsque une souche virulente est injectée à faible dose (non létale) avec des doses élevées d'une souche non virulente (*Vibrio crassostreae-like* J2-8 ou *Shewanella spp.*), les taux de mortalité augmentent de façon très importante (Figure 15) (Lemire et al. 2014). Ainsi, bien que les souches non virulentes ne soient pas suffisantes pour induire des mortalités d'huîtres, elles contribuent à la virulence de *V. crassostreae*. Une possibilité est que ces souches génèrent des charges bactériennes altérant

les défenses de l'hôte ou activent l'expression de facteurs de virulence via des mécanismes de quorum sensing (Defoirdt et al. 2018). De plus, diverses populations pathogènes pourraient avoir un impact sur la sévérité de la maladie. En effet, il a été montré que l'injection de pool de souches appartenant à différentes espèces pathogènes de *Vibrio* induit une mortalité plus importante comparé aux souches injectées individuellement (Gay et al. 2004). Les mécanismes de virulences spécifiques des espèces pourrait avoir un effet additif ou synergique sur la mortalité : hypothèse du partage des armes (Le Roux 2017).

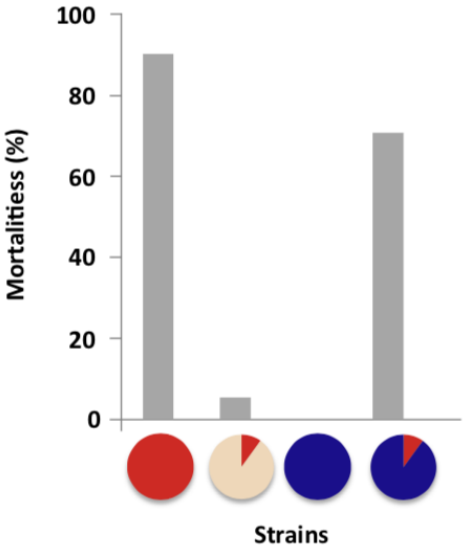


Figure 15 : Rôle des souches non virulentes. La souche virulente (J2-9, *Vibrio crassostreae*, en rouge) a été injectée par voie intramusculaire dans des huîtres en culture pure, diluée dans un milieu de culture (orange) ou diluée avec une culture pure de souches non virulentes (bleue). Le contrôle négatif est une culture pure d'une souche non virulente, qui a également été injectée. Les cercles colorés illustrent la proportion de souches virulentes, de souches non virulentes et de milieu dans le mélange injecté. La mortalité (barre grise, axe des ordonnées) a été évaluée après 24 heures (Le Roux et al. 2016).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de l'infection et de la colonisation de l'huître par *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis* ont été récemment décrits par l'analyse des réponses transcriptionnelles de l'hôte et des bactéries (Rubio et al. 2019). Cette étude a démontré que bien que le système immunitaire de l'huître soit activé suite à l'infection de souches virulentes et non virulentes, seules les souches non virulentes sont contrôlées efficacement par l'animal. L'invasion des tissus par les souches virulentes est liée à leur cytotoxicité envers les hémocytes. Cependant, cette cytotoxicité est médiée par des mécanismes différents entre les populations. Chez *V. crassostreae*, elle dépend d'un contact direct avec les hémocytes et fait intervenir le produit du gène *r5.7*. Chez *V. tasmaniensis* la cytotoxicité requiert l'internalisation du vibrio par phagocytose et l'expression du T6SS porté par le chromosome 1 (Figure 16).

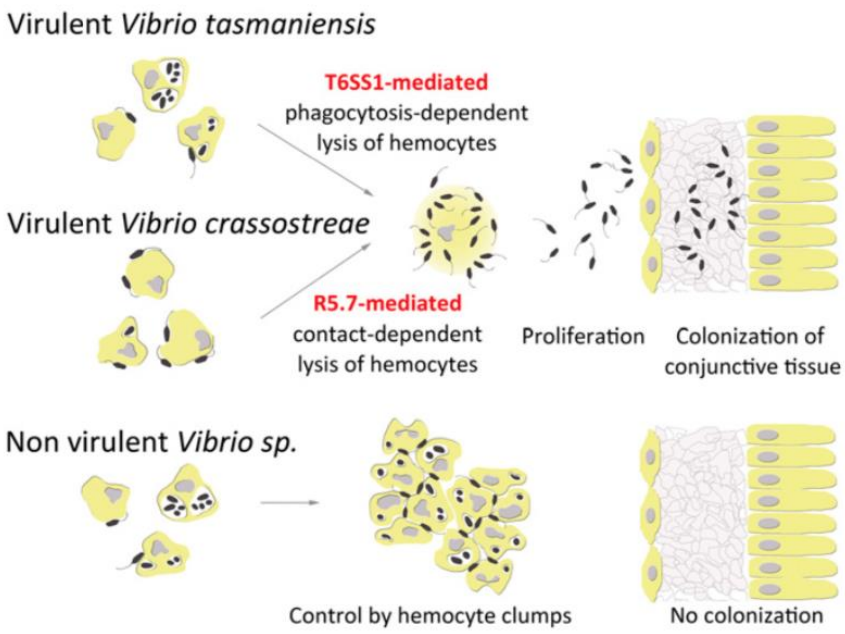


Figure 16 : Induction d'effets cytotoxiques pour les hémocytes d'huître comme stratégie commune d'évasion immunitaire chez les vibrios. Les souches virulentes des espèces *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* exercent une activité cytotoxique envers les cellules immunitaires via des mécanismes différents permettant le succès de l'infection (Rubio et al. 2019).

Une étude récente a étudié la répartition de la virulence parmi des populations de *Vibrio* différenciées sur le plan écologique ainsi que la nature et la fréquence des gènes de virulence au sein de ces populations. Pour cela, la virulence de diverses populations de vibrios isolées dans une zone non soumise à des élevages intensifs d'huîtres (Plum Island, MA, Etats-Unis) et donc hors contexte de mortalités, a été testé (Bruto et al. 2018; annexe 1). Les résultats obtenus ont établi que certaines populations (*V. splendidus* et *V. cyclitrophicus*) contenaient une forte proportion de souches virulentes (populations « à risque ») alors que d'autres ne comprenaient que des souches non virulentes (Bruto et al. 2018; annexe 1). Ainsi, la capacité à induire des mortalités chez l'huître est un trait caractéristique des populations du super clade *Splendidus* et dépend d'au moins un locus codant deux protéines secrétées de fonction inconnue (R5.7/8). Ce locus est identifié uniquement chez des populations à risque appartenant au super clade *Splendidus* et est présent dans la grande majorité des souches, suggérant une pression de sélection forte et un rôle important dans la niche. Toutefois, malgré la présence de ce locus, certaines souches sont non virulentes indiquant que R5.7/8 est nécessaire mais non suffisante à la virulence. Au sein des populations, d'autres gènes peuvent jouer un rôle dans la virulence. Ceci est illustré chez *V. splendidus*, par la présence d'un autre locus codant une protéine de la famille des toxines MARTX, lui aussi nécessaire à la virulence spécifique de la population. La perte du locus MARTX par certains membres de la population suggère l'existence d'une fréquence dépendante de la sélection, *i.e.* une tendance à

la perte en raison d'un coût métabolique compensée par un avantage sélectif dans certaines conditions comme l'infection de l'hôte ou la résistance aux prédateurs (Bruto et al. 2018; annexe 1).

En conclusion, le virus herpes OsHV est capable d'induire un état d'immunodépression chez l'huître, favorisant la colonisation par des bactéries, dont les vibrios. Parmi les populations de vibrios infectant l'huître, certaines sont pathogènes. Si certains mécanismes de pathogénicité semblent spécifiques aux populations (Figure 17), ils convergent vers une même fin, la mort des hémocytes.

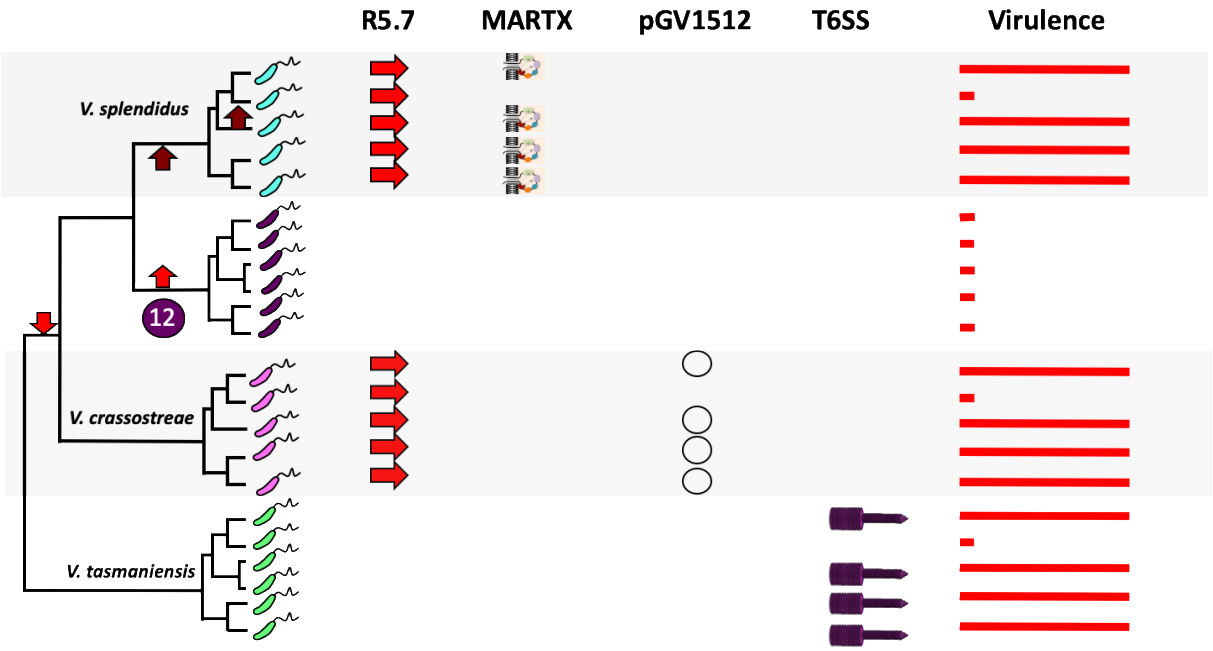


Figure 17 : Représentation schématique de mécanismes de virulence spécifique de population de vibrios.

II.4- Coévolution antagoniste

Dans les populations naturelles, un contact prolongé entre un hôte et son agent pathogène (ou parasite) sur plusieurs générations peut conduire à des changements évolutifs rapides et réciproques des deux parties appelés coévolution antagoniste (Buckling et al. 2002 ; Decaestecker et al. 2007 ; Schulte et al. 2010 ; Eizaguirre et al. 2012).

La description de la dynamique coévolutive nécessite une caractérisation des dynamiques évolutives de l'hôte et de son parasite, qui est souvent difficile à réaliser (Gandon et al. 2008). Une alternative est de tester la capacité d'adaptation en fonction du temps (ou « Time shift »). Il s'agit d'étudier l'infectiosité du parasite contre son hôte isolé au même moment (présent), avant (passé) ou après (futur) (Buckling et al. 2002). Par exemple, une étude a exploré l'infectiosité de la bactérie *Pasteuria ramosa* contre la puce d'eau *Daphnia magna* en réalisant des infections croisées entre l'hôte du passé/présent/future contre la bactérie du

passé/présent/future (Decaestecker et al. 2007). Cette étude a montré qu'après trente années de coévolution, les bactéries ont une meilleure infectiosité sur leur hôte contemporain comparé aux hôtes du passé et du future (Decaestecker et al. 2007). Ces résultats caractérisent la dynamique d'états fluctuants (fluctuating state dynamic ; FSD). Dans la FSD, l'interaction hôte-parasite est très spécifique. Lorsque l'hôte développe une résistance, le parasite évolue pour infecter l'hôte résistant, mais perd ensuite sa capacité à infecter l'hôte ancestral. Cela provoque une sélection fluctuante entre les génotypes de l'hôte et du parasite, et maintient la diversité des génotypes.

Un autre modèle théorique issu d'expériences de co-évolution au laboratoire est la dynamique de la course aux armements (arm race dynamic ; ARD) (Gandon et al. 2008 ; Buckling et al. 2002 ; Koskella et al. 2014). Dans l'ARD, l'hôte et le parasite développent successivement des mécanismes de résistance et de contre-résistance qui persistent dans le temps. Cependant, comme ce type d'évolution peut avoir un coût pour le parasite et l'hôte, il pourrait ne pas être maintenu avec le temps. Enfin une alternative aux études de time shift est d'étudier les phénomènes d'adaptation locale, c'est à dire de comparer l'infectiosité du parasite avec l'hôte isolé au même endroit (sympatrie) ou dans des zones plus éloignées (allopatrie) (Gandon et al. 2008).

Compte tenu de la rapidité de réplication des bactéries et de leurs prédateurs naturels les phages, les bactéries et les phages ont largement contribué à l'élaboration des modèles théoriques de FSD et ARD. Cependant dans la plupart des cas les expériences d'évolution expérimentale sont réalisées *in vitro* et en utilisant un phage et une souche bactérienne. La validité des modèles de coévolution dans des systèmes complexes environnementaux (de la bactérie aux métazoaires) reste donc à explorer.

Une étude a exploré la coévolution entre les vibrios et l'huître. Dans la mer des Wadden, deux invasions indépendantes de l'huître *C. gigas* se sont produites au cours des années 90 conduisant à des populations d'huîtres génétiquement divergentes. Des larves d'huîtres ont été exposées à des vibrios sympatriques (huîtres de Sylt infectées par des vibrios de Sylt) et allopatriques (huîtres de Texel infectées par des vibrios de Sylt) (Figure 18). Ces expériences d'infections croisées ont montré une mortalité plus faible pour les combinaisons sympatriques dans 60% des cas (Wendling et al. 2014). La résistance à l'infection par des souches locales suggère que les huîtres ont un potentiel adaptatif à la sélection exercée par les souches de *Vibrio* pathogènes. Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette adaptation locale ont fait l'objet d'une collaboration entre notre équipe et celle de Mathias Wegner (Résultats, partie 1)

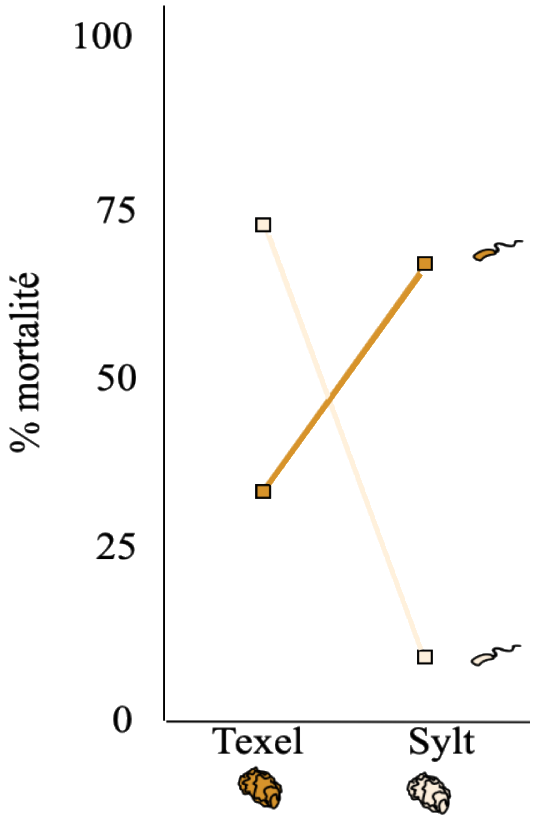


Figure 18 : Mise en évidence du phénomène d'adaptation local. Le graphique représente le pourcentage mortalité (en ordonné) des huîtres de Texel et de Sylt en fonction de l'origine des vibrios (Texel/marron et de Sylt/beige). Les combinaisons sympatriques sont associées à des taux de mortalité plus faibles (Adapté de Wendling et al. 2014).

III- Les bactériophages

Les bactériophages (ou phages) sont des virus infectant spécifiquement les bactéries. Les phages ont été découverts conjointement par les chercheurs : Frédéric William Twort en 1915 (Twort 1915) et Félix d'Herelle en 1917 (d'Herelle 1917). Félix d'Hérelle constata que la disparition du bacille dysentérique *Shigella* coïncidait avec l'apparition d'un « microbe invisible doué de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille pathogène » (d'Herelle 1917), tout en ayant aucun effet pathogène sur les animaux de laboratoire. Les phages sont 10 à 100 fois plus abondants que les bactéries et représentent donc l'entité la plus abondante sur terre (Bergh et al. 1989 ; Wommack and Colwell 2000). Les phages sont présents dans tous les environnements où les bactéries se développent et jouent un rôle important dans l'écologie, l'évolution et la diversité microbienne (Stone et al. 2019).

III.1- Classification

La taille des phages est de l'ordre du nanomètre. La microscopie électronique a permis leur observation et leur classification sur des critères morphologiques. Ruska fut le premier à appliquer la microscopie électronique aux études taxonomiques virales et proposa un schéma de classification comprenant 3 types de morphologies : bâtonnet, capside sans queue et capside avec une longue queue (Ruska 1943). Par la suite, la classification des phages s'est affinée par la prise en considération du type d'acides nucléiques (ARN, ADN, simple brin ou double brin), la forme de la capside, la présence ou l'absence d'enveloppe lipidique et de queue ainsi que le nombre de capsomères. Les phages ont alors été regroupé en six types (Bradley 1967) *Myoviridae* (ADNdb, queue contractile), *Siphoviridae* (ADNdb, longue queue non contractile), *Podoviridae* (ADNdb, queue courte), *Microviridae* (ADNsb, grand capsomère), *Leviviridae* (ARNsb, petits capsomères) et *Inoviridae* (ADNsb, filamenteux) (Ackermann 2009) (Figure 19). Le Comité International de Taxonomie des Virus propose aujourd'hui la classification d'un ordre appelé *Caudovirales*, divisé en trois familles : *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*. Si 90% des phages séquencés appartiennent aux *Caudovirales*, cette prépondérance pourrait résulter de biais liés à l'isolement de phages. Par exemple Kauffman et collaborateurs ont récemment identifié un nouveau phage de la famille des *Autolykiviridae* infectant les vibrios, largement plus abondant que les *Caudovirales*, mais se répliquant beaucoup plus lentement (Kauffman et al. 2018).

Du point de vue génétique, le génome des phages peut être constitué d'ADN ou de d'ARN simple ou double brin d'une taille variant de 2,4 kb (exemple : Leuconostoc phage L5, ADN db) à plus de 300 kb (exemple : myovirus G, ADNdb). Le génome des phages peut de plus contenir des nucléotides modifiés (par méthylation par exemple) pour la protection contre les enzymes de restriction (Hatfull 2008; Salmond et al. 2015).

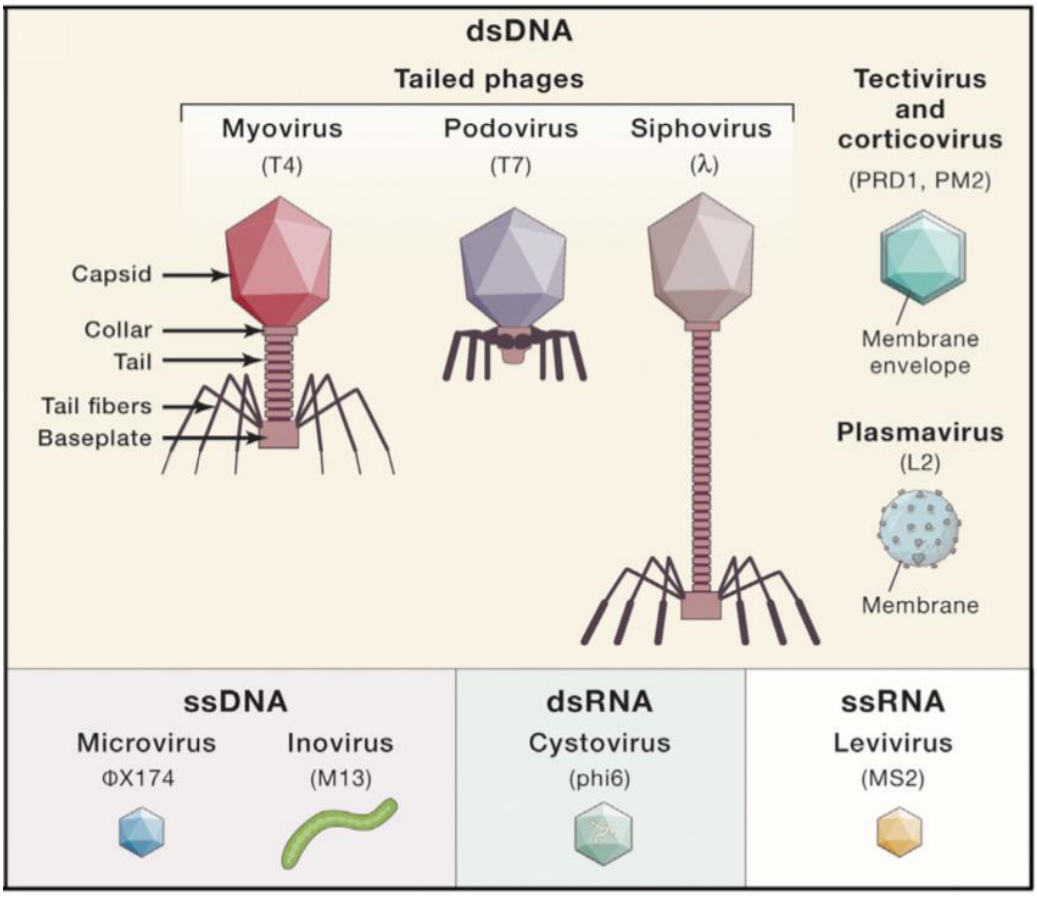


Figure 19 : Taxonomie des phages basée sur la morphologie et la composition du génome. Un phage de type représentatif pour chaque groupe taxonomique est indiqué entre parenthèses. Les phages de la famille des *myoviridae*, *podoviridae* et *siphoviridae* appartiennent à l'ordre des Caudovirales (D'après Ofir et al. 2018).

Les améliorations apportées aux technologies de séquençage ont permis de séquencer plus facilement un grand nombre de génomes de phages et d'en constater l'importante diversité. La classification phylogénétique des bactériophages présente des défis importants en raison du mosaïsme des génomes (Lawrence et al. 2002). En effet, il n'existe pas de gènes communs à tous les phages (tel que le 16S chez les bactéries) pour réaliser des études de phylogénie (Keen 2015). Face à cette extrême diversité génétique, la morphologie ou la nature de l'acide nucléique des phages semble un critère insuffisant pour une classification ayant un sens écologique (hôte infecté), ou évolutif (flux de gènes).

III.2- Cycle biologique

Les phages, parasites obligatoires, nécessitent un hôte bactérien pour se multiplier. Il existe deux types de bactériophages : les phages virulents et les phages tempérés. Pour infecter une bactérie, le phage doit interagir avec le récepteur de la cellule hôte, s'adsorber puis injecter

son génome. La stratégie de réplication dépendra du fait que le phage soit virulent ou tempéré (Salmond et al. 2015) (Figure 20).

Dans le cas des **phages virulents**, tels que le phage T4, le génome du phage est répliqué. Il y a ensuite une production des particules virales qui vont alors s'assembler pour former de nouveau phages, qui sont libérés dans l'environnement après la lyse de la bactérie (Salmond et al. 2015). Selon les phages, entre 50 et 150 nouveaux virus sont produits dans une bactérie.

Alternativement, les **phages tempérés** (par exemple, le phage λ) peuvent former une association stable avec l'hôte, appelée lysogénie. Pendant la lysogénie, le génome viral est appelé prophage et se réplique de concert avec l'ADN de l'hôte, soit dans un état plasmidique libre (par exemple, le phage P1 (Casjens et al. 2015)), soit intégré dans le chromosome bactérien (par exemple, le phage λ (Menouni et al. 2015)). Dans des conditions de stress (UV, certains antibiotiques), les prophages peuvent sortir de l'état lysogène et produire plus de virions qui sont libérés par la bactérie. Généralement, la libération de la progéniture phage entraîne la mort bactérienne par lyse cellulaire, bien que les phages filamenteux soient libérés par « sécrétion » à travers la membrane externe, évitant ainsi la lyse bactérienne mais provoquant une infection chronique ralentissant la croissance de la cellule hôte (Rakonjac et al. 2011).

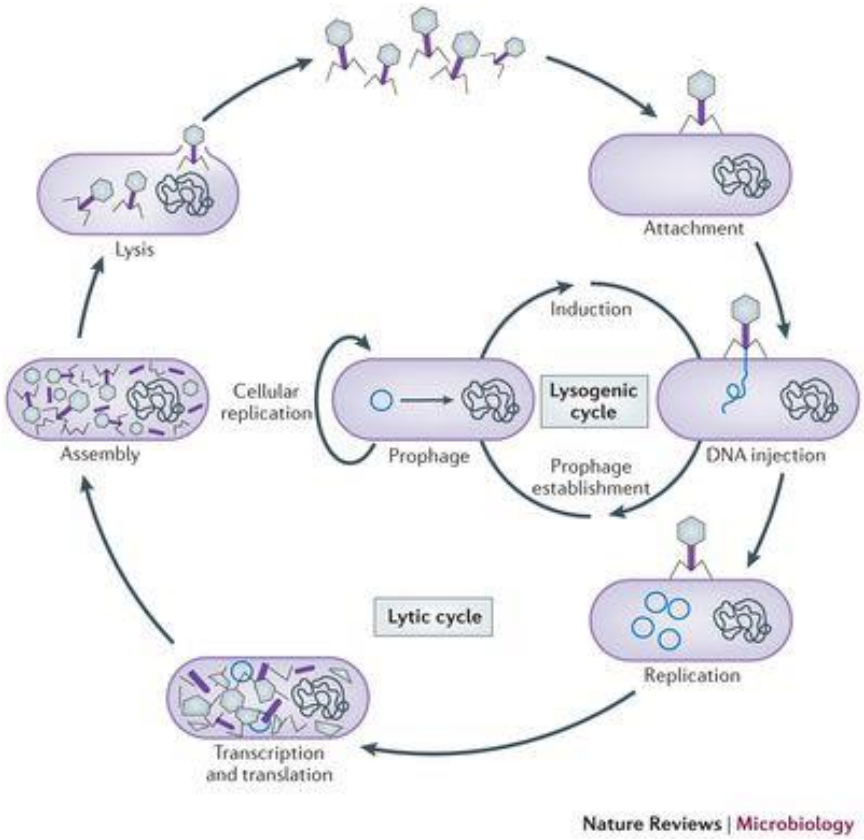


Figure 20 : Schéma du cycle infectieux d'un bactériophage (D'après Salmond and Fineran 2015).

III.3- Le spectre d'hôte des phages

Le spectre d'hôte (host range) est le nombre de souches de bactéries qu'il peut infecter. Alors que certains phages ne peuvent infecter qu'une souche, d'autres peuvent infecter plusieurs souches au sein d'une espèce, d'espèces différentes ou même de genres différents (Ross, Ward, and Hyman 2016). Le spectre d'hôte est lié à la présence et à l'accessibilité du récepteur ainsi qu'à la capacité du phage à contourner les défenses bactériennes et à s'adapter aux caractéristiques moléculaires de l'hôte (par exemple, l'utilisation de codons pour permettre une transcription et une réplication efficaces). Alors que la plupart des phages étudiés au laboratoire présentent un spectre d'hôte restreint (phages spécialistes), de récentes études de métagénomiques suggèrent que des phages à large spectre (phage généralistes) sont présent dans tous les environnements (Munson-McGee et al. 2018 ; de Jonge et al. 2019).
De plus, la complexité bactérienne, tel que celle du microbiote intestinal, favorise la diversification génomique ainsi que l'infectiosité des bactériophages. L'exploitation de souches présentes dans le microbiote peut augmenter de façon importante la fréquence de mutation d'un phage favorisant le saut d'hôte (« host jumping ») (De Sordi et al. 2017). Ce mécanisme peut être utilisé par les phages pour persister dans un environnement, dans des conditions où la densité d'hôte est faible.

La méthode la plus utilisée pour comprendre les interactions bactéries-phages passe par des tests d'infections croisées où chaque bactérie est infectée par chaque phage, résultant en un réseau d'infection phage bactérie (PBIN). Des modèles mathématiques permettent ensuite de modéliser les PBIN (Figure 21). Les deux modèles les plus fréquemment examinés dans les réseaux écologiques sont : l'imbrication (« nestedness ») et la modularité (« modularity ») (Weitz et al. 2013). L'imbrication est caractéristique des PBIN présentant une hiérarchie de résistance entre hôtes et de capacité d'infection entre phages suggérant une évolution d'adaptation « gène par gène » typique de phénomènes de course aux armements (Weitz et al. 2013). Dans ce modèle, les phages à large spectre d'hôtes sont plus susceptibles d'infecter des hôtes très résistants, alors que les phages à spectre d'hôtes restreint ne peuvent infecter que les hôtes les plus sensibles (Díaz-Muñoz et al. 2014). La modularité est caractéristique des PBIN dans lesquels les bactéries et les phages infectent de préférence des groupes ou des « modules ». L'analyse des PBIN permet de proposer des hypothèses quant aux scénarios coévolutifs des interactions bactéries/phages : ARD/imbrication ; FSD/modularité (Weitz et al. 2013).

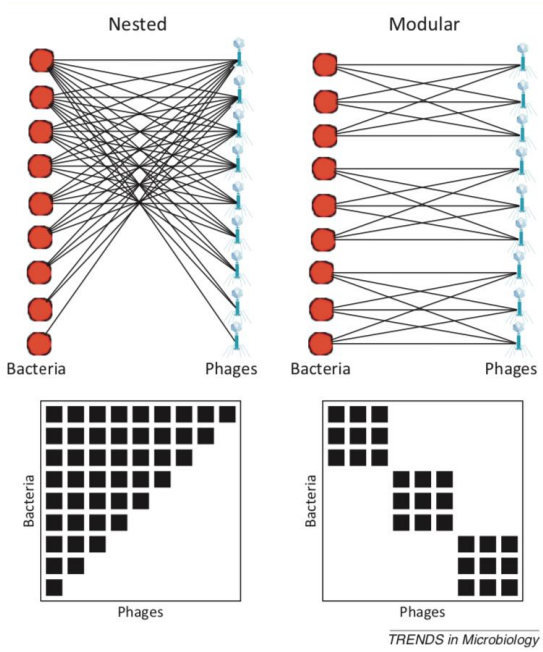


Figure 21 : Représentation schématique de réseaux d'interactions phages-bactéries. Les interactions lytiques entre bactéries (symbole rouge) et phages sont reliées par un trait. La matrice théorique est représentée sous chaque réseau, où les carrés noirs représentent une interaction lytique (Weitz et al. 2013).

Cas du vibriophage KVP40

Le vibriophage géant T4 KVP40 se distingue des phages T4 bien connus par une gamme d'hôtes plus large, un génome plus grand et une tête plus grosse (Miller et al. 2003). La large distribution du récepteur OmpK, lui procure une activité lytique sur au moins huit espèces de *vibrio* : *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, et *V. fluvialis* (Kalatzis et al. 2018).

L'analyse du génome de 244 835 pb a permis de constater la nature virulente du phage KVP40 (absence d'intégrase et de gènes intervenant dans le maintien de la lysogénie) (Miller, Heidelberg, et al. 2003), et également la présence de 25 ARNt (ARN de transfert). Les ARN de transfert permettraient de diminuer les biais de codon entre le phage et la bactérie. Ces ARNt sont retrouvés de façon plus abondante chez les phages virulents à ADN double brin et leur nombre est corrélé avec la taille du génome (Bailly-Bechet et al. 2007). Leur présence augmenterait la fitness du phage, par exemple en traduisant les protéines du phage plus efficacement, en réduisant son temps de latence et en augmentant son taux de reproduction (Bailly-Bechet et al. 2007).

Le phage KVP40 ne code pas de protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN de l'hôte (par exemple, la rupture nucléaire, ndd ; endonucléases, denA et denB). Ceci pourrait

procurer au phage KVP40, un potentiel de transduction de large fragment d'ADN bactérien (Miller, Heidelberg, et al. 2003).

III.4- Les mécanismes de résistance bactériens et d'adaptation des phages

Les mécanismes de résistance bactériens peuvent agir aux différentes étapes du cycle infectieux (Figure 22). Les phages évoluent rapidement et peuvent échapper à ces systèmes immunitaires (Labrie et al. 2010).

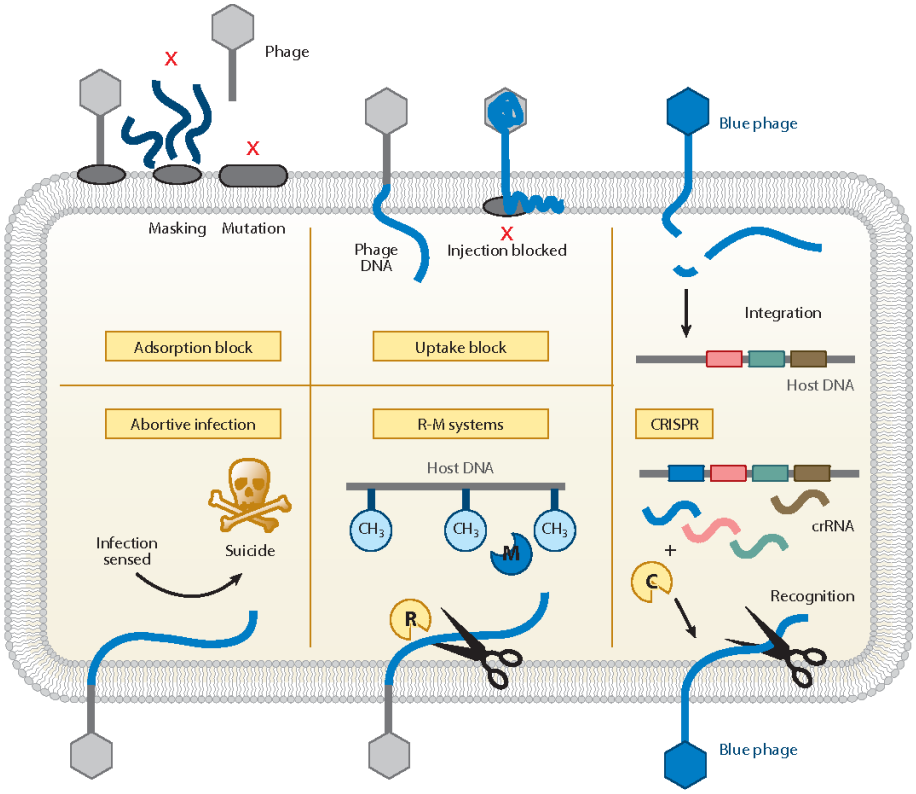


Figure 22 : Représentation schématique de différents mécanismes de défense bactériens. (D'après Westra et al. 2012).

L'inhibition de l'adsorption du phage peut être due à une modification du récepteur, à un blocage de l'accès au récepteur ou à une expression variable du récepteur. L'adsorption du phage à la bactérie représente la première étape de l'infection et est donc cruciale. Les bactéries peuvent tirer avantage de la spécificité des phages aux récepteurs, en perdant ou en modifiant ce récepteur et devenir résistantes aux phages. Ce mécanisme de résistance est largement documenté (Azam et al. 2019). Par exemple, des mutations provoquant des codons stop prématurés, des décalages de cadres et des modifications d'acides aminés dans le récepteur OmpK, provoque la résistance de *V. anguillarium* au phage KVP40 (Castillo et al. 2019). Une autre stratégie mise en place par *V. anguillarium* pour résister au phage KVP40,

est la régulation de l'expression du récepteur médiée par le quorum-sensing ainsi que l'agrégation, limitant l'attachement du phage (Tan, Svenningsen, and Middelboe 2015; Tan, Dahl, and Middelboe 2015).

Lorsque le récepteur joue un rôle dans la virulence ou la fitness de la bactérie, la résistance au phage peut être associée à une diminution de la pathogénicité. Ainsi, chez *V. cholerae*, la modification de l'expression ou la mutation de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) permettant la résistance au phage ICP1, diminue l'infectiosité de la bactérie chez la souris (Seed et al. 2012; Zahid et al. 2008).

L'accès au récepteur peut également être masqué par la production d'une capsule ou d'exopolysaccharides permettant aux souches de devenir résistantes. Certains phages, produisant des enzymes spécifiques sont capables de dégrader ces capsules afin d'avoir accès au récepteur. Par exemple, le phage PBECO4 produit un enzyme de dégradation de l'acide colique (CAE) pour infecter la souche *E. coli* O157: H7 exprimant une capsule (M. S. Kim et al. 2015).

Des vésicules extra-membranaires sont produites lors de la multiplication de certaines bactéries Gram négatives et ont la même composition que la membrane bactérienne. Elles possèdent donc les récepteurs potentiels de bactériophages. Cependant, ces vésicules ne possédant pas de machinerie cellulaire nécessaire à la réplication et à la traduction, les phages s'y adsorbant et y injectant leur ADN ne peuvent donc se multiplier, limitant ainsi l'expansion des bactériophages. Ce phénomène a été décrit, par exemple, chez *V. cholerae* pour trois phages (le *myoviridae* ICP1, les *podoviridae* ICP2 et ICP3) (Reyes-Robles et al. 2018). Cependant, ces vésicules peuvent également fusionner avec les membranes des bactéries environnantes, et donc permettre une augmentation du spectre d'hôte des phages via l'acquisition du récepteur sur une souche auparavant résistante (Tzipilevich et al. 2017).

Le blocage de l'injection de l'ADN intervient à la suite de la fixation du phage à un récepteur de surface approprié par l'intermédiaire de systèmes d'exclusion de surinfection (« superinfection exclusion » ou Sie). Ces systèmes sont souvent codés par des prophages ou des plasmides. Par exemple, le prophage TP-J34 de *Streptococcus thermophilus* produit une lipoprotéine ($Ltp_{TP\text{-}J34}$) localisée dans la membrane, qui inhibe la libération de l'ADN dans la cellule hôte lors de l'infection par un phage virulent en ciblant une protéine phagique (tape measure protein, TMP) nécessaire à la formation du canal permettant le passage de l'ADN dans la cellule (Sun et al. 2006). Comparés aux stratégies d'inhibition de l'absorption qui

protège seulement la bactérie résistante, les systèmes Sie immobilisent et inactivent le phage, réduisant ainsi la quantité de phages infectieux sur l'ensemble de la population bactérienne (Seed 2015).

La dégradation de l'ADN du phage est un mécanisme de résistance bactérien pouvant intervenir si un phage s'adsorbe et injecte son ADN dans une bactérie. Plusieurs systèmes de défense sont décrits pour empêcher la réplication et la libération du phage.

1) Les systèmes de restriction-modification sont constitués de deux enzymes, une méthyltransférase (MTase) et une endonucléase de restriction (REase). La REase digèrent l'ADN au niveau de sites spécifiques reconnus. La longueur de ces sites étant réduite (quelques acides nucléiques), ces sites sont également présents sur le chromosome bactérien. Pour éviter la dégradation de l'ADN de l'hôte, une méthyltransférase (MTase) permet la méthylation de l'ADN au niveau de ces mêmes sites spécifiques. Ce système permet donc la dégradation d'ADN étranger non méthylé tel que celui des plasmides ou des phages. Cependant, les phages peuvent échapper à ce système en 1) masquant leur sites de restriction par des protéines de phage, 2) stimulant l'activité de la MTase bactérienne provoquant la protection de l'ADN du phage ou bien 3) codant des protéines (méthylase) protégeant leur génome (Stern and Sorek 2011).

2) Le système d'îlot de défense associé à une modification de restriction (« defense island system associated with restriction modification » ou DISARM) est composé de cinq gènes, dont une méthylase et quatre autres gènes possédant un domaine hélicase, un domaine phospholipase D (PLD), un domaine DUF1998 et un gène de fonction inconnue (Ofir et al. 2018). La méthylation est réalisée au niveau de la séquence C<u>C</u>WGG (sur le C souligné) permettant de discriminer le soi du non-soi. Cependant, le module de restriction de DISARM ne semble pas reposer exclusivement sur la présence du motif CCWGG, car ce système peut également dégrader l'ADN d'un phage ne contenant pas cette séquence. Le mécanisme détaillé de ce système reste à élucider. La méthylation de l'ADN du phage est suffisant pour permettre au phage de résister à ce système (Ofir et al. 2018).

3) Le système CRISPR-Cas (« clustered regularly interspaced short palindromic repeat – cas system ») est un système de défense adaptatif. Plusieurs systèmes CRISPR-cas ont

été identifiés et sont capables de dégrader de façon spécifique de l'ADN ou de l'ARN étranger (Makarova et al. 2011). Ce système est composé d'un locus CRISPR contenant différentes séquences virales d'environs 20-40 paires de bases appelées « spacer » chacune séparée par une séquence identique appelé « direct repeat ». L'intégration de nouvelles séquences virales se réalise au début du locus grâce à des protéines d'adaptation du locus *cas* (cas1 et cas2). En amont du locus CRISPR, une séquence appelé « leader » contient le promoteur du locus CRISPR. Une fois ce locus transcrit, une maturation du pre-crRNA est réalisée permettant de séparer les différents crRNA (spécifique de séquences étrangères). Ces crRNA vont former un complexe avec les protéines exprimées par le locus cas et vont pouvoir se fixer et dégrader de façon spécifique les séquences étrangères (appelées « protospacer ») contenant la séquence complémentaire du « spacer » plus un motif PAM (souvent de trois nucléotides) (Makarova et al. 2011). Ce complexe contient une endonucléase, dont la plus connue est la protéine cas9 du système CRISPR-cas de type 2. Pour contrer ce système, certains phages produisent des protéines interférant avec le système CRISPR-Cas, leur permettant de résister (Nakamura et al. 2019), ou bien mutent la séquence reconnue, ne permettant plus la reconnaissance du phage par le système.

L'inhibition de la réplication est un système de défense assuré par le système BREX (« BacteRiophage EXclusion ») (Azam and Tanji 2019). Chez *Bacillus cereus*, ce système est retrouvé sur des îlots de défense et est composé de six gènes permettant une résistance à un large éventail de phages, virulents et tempérés. Encore mal décrit, ce système reposerait sur la méthylation de motifs TAGGAG (au niveau du A) du génome bactérien permettant de discriminer le soi et le non-soi. À la différence des systèmes R-M et DISARM, l'ADN du phage n'est pas clivé ni dégradé, seul un blocage dépendant de la méthylation est assuré par BREX (Azam and Tanji 2019; Gordeeva et al. 2019). La résistance des phages vis-à-vis de ce système est assuré par la méthylation de leur ADN (Gordeeva et al. 2019).

L'interférence de l'assemblage des particules virales est liée, dans certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, à un prophage inductible PICI (« phage-inducible chromosomal island ») porteur de facteurs de virulence. Celui-ci affecte l'assemblage des particules et l'empaquetage de l'ADN du phage infectant la bactérie (Carpena et al. 2016).

L'infection abortive (ou Abi) est un système de mort cellulaire « altruiste » activé lors d'une infection par un phage, limitant donc la réplication virale et offrant ainsi une protection à la population bactérienne voisine. Ces systèmes sont généralement codés par des éléments génétiques mobiles comme des phages tempéré ou des plasmides (Samson et al. 2013). Il existe une diversité de système Abi dont les mieux décrits sont ceux de souches de *Lactobacillus lactis* et *Escherichia coli* (Azam and Tanji 2019). L'infection abortive fait appel à un système toxine-antitoxine. L'antitoxine étant plus sensible que la toxine, lors d'un stress provoqué par une infection, l'antitoxine est dégradée plus rapidement, provoquant un déséquilibre du rapport toxine-antitoxine. La toxine peut alors agir sur sa cible et d'inhiber la croissance bactérienne voir entraîner la mort cellulaire. Certains phages arrivent à contrer ce mécanisme par mutation de gènes reconnus ou bien en produisant l'antitoxine (Samson et al. 2013).

III.5- Impacts des phages tempérés

Les phages tempérés ont la capacité de persister, sous forme intégrée dans le chromosome ou de façon extrachromosomique, dans la cellule infectée. La présence de phages tempérés a été identifiée dans environ 40 à 50% des génomes microbiens, et parmi 21 phylums sur 30 pour lesquels des génomes complets étaient disponibles (Howard-Varona et al. 2017).

L'intégration de prophages dans le génome de la bactérie peut 1) réguler l'expression et la fonction de gènes, 2) changer la physiologie cellulaire en introduisant de nouvelles fonctions ou en modifiant des fonctions préexistantes, telles que la production de facteurs de virulence, le métabolisme, le développement cellulaire et l'immunité aux phages 3) influencer le transfert de l'ADN bactérien susceptible de conférer de nouveaux phénotypes tels que la résistance aux antibiotiques (Menouni et al. 2015; Howard-Varona et al. 2017). Leur capacité de transfert d'ADN (incluant des gènes de métabolisme) constitue une source majeure de HGT, permettant un potentiel adaptatif des bactéries à de nouvelle niche.

Les prophages peuvent permettre la transition pathogénique de souche (ie : conversion lysogénique). Un des exemples les plus étudiés porte sur le bactériophage tempéré CTXΦ chez *V. cholerae* qui véhicule la toxine cholérique, nécessaire à la virulence (Waldor and Mekalanos 1996). Chez *V. harveyi*, l'infection par le bactériophage VHML entraîne une augmentation de la production d'hémolysine, et donc une augmentation de la virulence envers les larves de crevettes *Penaeus Monodon* (Munro et al. 2003).

Certaines études ont mis en évidence une augmentation de fitness de la bactérie liée à la présence de prophage. Par exemple, la souche polylysogénique de *Pseudomonas aeruginosa* LES (« Liverpool Epidemic Strain ») a une meilleure compétitivité dans les poumons de rat comparée à la souche isogénique ne possédant pas de prophages (Davies et al. 2016). De plus, l'augmentation de fitness peut se traduire par une meilleure résistance aux prédateurs. Par exemple, les prophages peuvent empêcher une surinfection de la bactérie par d'autres phages permettant donc à leur hôte de survivre. Il a également été montré chez une souche d'*Escherichia coli* que certains prophages cryptiques permettaient une meilleure résistance aux concentrations sublétales d'antibiotiques (quinolone et β-lactame principalement) par le biais de protéines inhibant la division cellulaire (par exemple, KilR du phage rac et DicB du phage Qin) (X. Wang et al. 2010). De plus, certains prophages permettraient de mieux résister aux stress osmotiques, oxydatifs et acides, d'augmenter la croissance bactérienne et d'influer sur la formation de biofilm (X. Wang et al. 2010).

III.6- Impacts des phages virulents

Parmi les prédateurs de bactéries, les phages constituent l'entité biologique la plus abondante dans l'océan et jouent un rôle important dans le contrôle de l'abondance et de la composition des communautés microbiennes. Jusqu'à 50% des mortalités bactériennes sont causées par les bactériophages (Hennes and Simon 1995; Mathias, Kirschner, and Velimirov 1995; Díaz-Muñoz and Koskella 2014).

Par exemple, les bactériophages peuvent contrôler l'abondance des souches tel que de *V. cholerae* (Faruque 2014; Faruque et al. 2005; Jensen et al. 2006). L'expansion des phages se produisant dans les intestins des patients, les selles constituent une source majeure de réintroduction du phage dans l'environnement, permettant ainsi aux épidémies de choléra de s'atténuer spontanément.

Une étude portant sur la dynamique annuelle de cyanobactéries du genre *Synechococcus* en mer Rouge a montré que l'abondance et la diversité génétique des cyanophages variaient avec celles de *Synechococcus* (Mühling et al. 2005). Les auteurs ont observé une succession de bloom de différents génotypes de *Synechococcus* dont les déclins étaient corrélés par l'expansion de cyanophages génétiquement différents. Ceci suggère également que les phages exercent une pression de sélection maintenant une diversité génomique des populations microbiennes (Cordero and Polz 2014). De plus, ceci est en accord avec l'hypothèse « kill the

winner » où le génotype le plus performant pour la croissance (le « winner ») est plus susceptible d'être infecté par un phage et éventuellement remplacé par un autre génotype.

III.7- La thérapie phagique

Selon l'OMS « la résistance bactérienne aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement ». En effet, on estime que les bactéries résistantes aux antibiotiques pourraient provoquer la mort de 10 millions de personnes chaque année d'ici 2050 (Monteiro et al. 2019). Il est donc urgent de trouver des alternatives efficaces, telles que l'utilisation de bactériophages, pour traiter ces infections. Contrairement aux antibiotiques, la spécificité des phages vis-à-vis des bactéries permettrait d'épargner les bactéries commensales, évitant ainsi les phénomènes de dysbiose pouvant être néfastes. Leur capacité à s'amplifier dans l'hôte est également un argument en faveur de la thérapie par des phages. De plus, en absence d'hôte les phages ne peuvent se maintenir dans l'environnement. Contrairement aux antibiotiques, ils peuvent être efficaces à la fois pour prévenir la formation de biofilms et pour détruire les biofilms préformés (Rehman et al. 2019). De plus, ils sont faciles à isoler et à produire, et sont capables d'évoluer pour contrer les mécanismes de défense bactériens. Leur forte spécificité peut cependant être une limite à leur utilisation.

III.7.1- Quelles stratégies adopter ?

Une compréhension précise de la biologie et de l'évolution des phages, ainsi que des mécanismes de défense bactérien et de contre-défense des phages est nécessaire pour sélectionner les candidats ayant le meilleur potentiel pour une utilisation en thérapie. La caractérisation biologique nécessite de connaitre la nature du bactériophage (virulent ou tempéré), ainsi que son spectre d'hôte.

La spécificité des phages constitue un inconvénient majeur, car les bactéries pathogènes doivent être identifiées à l'avance. Comme de nombreuses infections impliquent divers génotypes (par exemple, *V. crassostreae*) au lieu de bactéries clonales, le contrôle de telles infections nécessite un cocktail de phages capable d'infecter la majorité, sinon la totalité, des souches virulentes. La combinaison de phages ciblant différents récepteurs bactériens pourrait réduire le risque de résistance à plusieurs phages (Yen and Camilli 2017).

Une fois les phages candidats sélectionnés pour un cocktail, une question importante est de savoir si ces phages sont plus efficaces en combinaison pour lutter contre les bactéries que

seuls. Les interactions entre les phages peuvent être additives, antagonistes et synergiques, respectivement, lorsque l'effet combiné est la somme, inférieure à la somme et supérieure à la somme des effets individuels. Les résultats positifs peuvent être expliqués par l'évolution darwinienne. Premièrement, la présence de prédateurs multiples peut limiter la capacité des bactéries à développer une résistance à un phage spécifique en raison du coût de la résistance à plusieurs phages (Koskella et al. 2012). Deuxièmement, une interaction négative directe entre les mécanismes de résistance peut constituer une contrainte pour leur évolution. Par exemple, il a été proposé que les hôtes qui développent une résistance à un phage puissent devenir sensibles à un autre phage (Avrani et al. 2012). Troisièmement, la synergie peut résulter uniquement de faibles densités bactériennes réduisant la probabilité d'émergence d'une résistance. De plus, la densité cellulaire bactérienne joue un rôle essentiel dans la virulence, par exemple par des voies régulées par détection de quorum (Defoirdt 2018).

III.7.2- Quelques exemples d'applications en aquaculture

L'aquaculture est une source de protéines animales de plus en plus importante dans le monde. Cependant, cette croissance s'accompagne de l'émergence ou de la réémergence de plusieurs maladies infectieuses. L'aquaculture repose généralement sur des installations de production à grande échelle et à haute densité offrant des conditions idéales pour l'apparition et la propagation d'infections entraînant de lourdes pertes économiques (Pérez-Sánchez, Mora-Sánchez, and Balcázar 2018). De nombreuses études ont été menées pour isoler des bactériophages virulents dirigés contre plusieurs espèces de vibrios pathogènes telles que *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. anguillarum* et *V. coralliilyticus* (table 1) (Rehman et al. 2019 ; Kalatzis et al. 2018). Par exemple, le phage géant T4 KVP40 (Matsuzaki et al. 1992) réduit de façon considérable la mortalité des larves de poissons attaquées par *V. anguillarum* (Rørbo et al. 2018).

Dans certains cas, l'utilisation de phages (seul ou en cocktail) s'est avérée plus efficace qu'un traitement aux antibiotiques. Comme c'est le cas pour la survie de larves de crevettes (*Penaeus monodon*) ou bien de concombres de mer (*Apostichopus japonicus*) contre une souche de *V. harveyi* et *V. splendidus* respectivement (Vinod et al. 2006 ; Karunasagar et al. 2007).

Espèce	animal	Type of phage application (PFU/mL)	Reference
Vibrio harveyi	*Penaeus monodon* (larves)	balnéation (10^6), traitement alterné sur 4 jours avec deux phages	10.1016/j.aquaculture.2007.04.049
Vibrio harveyi	*Penaeus monodon* (larves)	balnéation (10^9), 3 phages testés individuellement ou en coctail	10.1016/j.vetmic.2017.06.006
Vibrio harveyi	*Haliotis laevigata*	Balnéation (10^2), 1 phage	10.1016/j.aquaculture.2017.01.003
Vibrio splendidus	Sea cucumber *(Apostichopus japonicus)*	Injection (10^9), 3 phages testés individuellement ou en cocktail	10.1016/j.fsi.2016.04.026
Vibrio cyclitrophicus	Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)	injection (10^7)	10.1016/j.aquaculture.2015.09.024
Vibrio alginolyticus	Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)	balnéation (10^5–10^7), cocktail de 2 phages	10.1111/jwas.12177
Vibrio alginolyticus	*Artemia salina*	balnéation (10^6), cocktail de 2 phages	10.1371/journal.pone.0151101
Vibrio anguillarum	*Salmo salar*	balnéation (10^6)	10.1016/j.aquaculture.2013.02.013
Vibrio anguillarum	*Danio rerio* (larves)	Direct addition (10^8), 1 phage	10.1371/journal.pone.0114197

Tableau 1 : Essais de phagothérapie contre des vibrios pathogènes d'animaux marins (modifié de Kalatzis et al. 2018).

Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est d'étudier l'évolution de la virulence des vibrios en relation avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs. Cela permettra de déterminer si i) des génotypes pathogènes de *Vibrio* apparaissent dans des zones de forte mortalité ; ii) *Vibrio* et les huîtres co-évoluent ; iii) les réseaux d'infection *Vibrio*-phages sont plus fortement connectés entre les phages et les hôtes co-occurrents ; iv) l'élimination d'une population pathogène (*V. crassostreae*) par un cocktail de phages améliore la survie des huîtres.

Le premier chapitre de cette thèse concernera l'étude des phénomènes de coadaptation et d'émergence des vibrios avec leur hôte. Pour cela, une première partie concernera l'étude des mécanismes moléculaire en lien avec l'adaptation locale de vibrios avec leur hôte, en zone faiblement impactée par des épisodes de mortalités. La seconde partie concernera l'étude de la sélection d'un plasmide de virulence et des mécanismes moléculaire de la virulence, chez l'espèce *V. crassostreae,* dans une zone impactée par la maladie des juvéniles.

Le second objectif de cette thèse consiste à rechercher des phages virulents infectant *V. crassostreae*. Pour cela, un échantillonnage temporel nous permettra d'isoler un grand nombre de souches de *V. crassostreae* et de phages. Nous caractériserons le réseau d'interaction vibrio-phage, ainsi que sa variation dans le temps et l'espace. Puis une partie sera consacrée à une première approche de génomique comparative afin de déterminer de potentiels mécanismes intervenant dans la résistance des bactéries et la virulence des phages.

Chapitre I : Évolution des interactions vibrios-huîtres

I-A Déterminants moléculaires de l'adaptation locale de souches de *Vibrio* aux huîtres, en zone non impactée par la maladie (article 1)

Plusieurs études ont montré le rôle de diverses espèces de vibrios dans les mortalités d'huîtres creuses dans le milieu naturel ou en écloserie. Des mécanismes de virulence ont été identifiés mais, dans la plupart des cas, ces études ne prennent pas en compte la variation de susceptibilité de l'huître, qu'elle soit liée à des déterminants génétiques ou à des facteurs environnementaux (Le Roux, Wegner, and Polz 2016; Petton et al. 2015; Lemire et al. 2014; Yannick Labreuche et al. 2010; Duperthuy et al. 2011; Audrey Sophie Vanhove et al. 2015; Rubio et al. 2019). Les populations de vibrios entraînent-elle une pression suffisante à la sélection d'huîtres résistantes à ces pathogènes ? Face à cette résistance, les vibrios développent-ils une plus forte virulence (course aux armements) ? Ou cette interaction évolue t'elle vers un compromis entre les deux partenaires (commensalisme) ?
A ce jour, une seule étude s'est intéressée à l'évolution des interactions vibrios-huîtres et suggère qu'une adaptation locale de souches de *Vibrio* aux huîtres conduit à un mode d'interaction de type commensalisme (Wendling and Wegner 2014). Pour rappel, cette étude basée sur des échantillonnage en zone faiblement (Texel) ou non impactée (Sylt) par la maladie des huîtres juvéniles a montré que des souches de *Vibrio* appartenant au clade *Splendidus* étaient moins virulentes en combinaisons sympatriques (huîtres de Sylt/vibrio de Sylt ou huîtres de Texel/vibrio de Texel) qu'en combinaison allopatriques (huîtres de Texel infectées par des vibrios de Sylt).

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de cette adaptation locale, les génomes complets de cinq souches de vibrios isolées à Texel et quatre souches isolées à Sylt ont été séquencés. Ces souches appartiennent à des espèces différentes du clade Splendidus. L'analyse du « pan-génome » (ensemble des gènes présents dans les génomes) de ces neuf souches a révélé un total de 7507 gènes dont 3138 gènes du « core » (gènes partagés par toutes les souches analysées) et 4369 gènes accessoires (gènes spécifiques à au moins une souche) (Article 1, figure 1b). Aucun gène accessoire n'est spécifique des souches de Texel et seulement six gènes (potentiellement porté par un prophage) sont spécifiques des souches de

Sylt. Ces résultats suggèrent que l'adaptation locale ne résulte pas de l'acquisition de gènes spécifiques de Texel ou Sylt. Au sein du core génome, certains groupes de gènes orthologues (OG) présentant une forte diversité entre zones géographiques. Parmi ces gènes seulement deux groupes (OG1907 et OG3159) possèdent des allèles qui corrèlent avec i) la distribution géographique ; ii) le phénotype de virulence. La phylogénie de ces gènes n'est donc pas congruente avec la phylogénie des espèces (Article 1, figure 2).

Le groupe orthologue OG1907 code une protéine extracellulaire de 154-184 acides aminés (Article 1, figure 3). Dans tous les génomes, ce gène est positionné en amont d'un locus *cusABC* (codant une pompe à efflux de cuivre) laissant suggérer que OG1907 intervient dans un mécanisme d'homéostasie du cuivre. Le groupe orthologue OG3159 code une protéine transmembranaire de 153-159 acides aminés (Article 1, figure 4). Ce groupe orthologue possède une forte similarité de séquence avec la protéine PmpA chez *Serratia* (famille de transporteurs de composés sulfurés YeeE/YeeD). Ce gène est localisé à proximité de gènes catalysant des réactions biochimiques contenant des composés sulfurés suggérant un rôle de transporteur. Cette fonction putative ainsi que sa localisation prédite dans la membrane cytoplasmique interne de la bactérie n'expliquent pas intuitivement le rôle de cette protéine putative dans la virulence.

Le rôle de ces deux groupes orthologues a été exploré génétiquement dans l'unique souche pouvant être manipulée. La délétion de chacun des deux gènes induit un changement de phénotype (Article 1, figure 5). Par rapport à la souche sauvage, les mutants sont moins virulents par infection expérimentale de larves dans les combinaisons allopatriques mais plus virulents dans les combinaisons sympatriques. De plus, pour le groupe orthologue OG3159, l'expression en *trans* des allèles Sylt ou Texel chez un mutant de délétion de ce gène permet de rétablir le phénotype d'origine des allèles.

Dans cette étude, nous avons montré que deux gènes sont impliqués dans des interactions de type génotype par génotype (GxG) responsable de profils de virulence contrastés en combinaisons sympatrique ou allopatrique. L'annotation fonctionnelle de ces gènes n'aurait pas prédit leur rôle dans la virulence, démontrant l'intérêt de ce type d'approche pour identifier des mécanismes originaux d'interaction vibrio-huître.

Mon travail a consisté à étudier le rôle de ces deux groupes orthologues par une approche de mutagénèse dirigée (gène knock-out) et de complémentation dans une des neuf souches pouvant être génétiquement manipulée.

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 06 September 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.02067

Molecular Targets for Coevolutionary Interactions Between Pacific Oyster Larvae and Their Sympatric *Vibrios*

K. Mathias Wegner[1]*, Damien Piel[2,3†], Maxime Bruto[3†], Uwe John[4,5], Zhijuan Mao[6], Marianne Alunno-Bruscia[2,7], Bruno Petton[2,7] and Frédérique Le Roux[2,3]

[1] Coastal Ecology, Waddensea Station Sylt, Alfred Wegener Institut - Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, List, Germany, [2] Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, Ifremer, Plouzané, France, [3] Integrative Biology of Marine Models, UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, Sorbonne Universités, Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France, [4] Ecolgical Chemistry, Alfred Wegener Institut - Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, Germany, [5] Helmholtz Institute for Functional Marine Biodiversity (HIFMB), Oldenburg, Germany, [6] Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo, China, [7] LEMAR UMR 6539, Ifremer, Argenton-en-Landunvez, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Eckhard Strauch,
Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Germany

Reviewed by:
Mikkel Bentzon-Tilia,
Technical University of Denmark, Denmark
Jesus L. Romalde,
University of Santiago de Compostela, Spain

***Correspondence:**
K. Mathias Wegner
mathias.wegner@awi.de

† These authors have contributed equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to Infectious Diseases, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 20 June 2019
Accepted: 22 August 2019
Published: 06 September 2019

Citation:
Wegner KM, Piel D, Bruto M, John U, Mao Z, Alunno-Bruscia M, Petton B and Le Roux F (2019) Molecular Targets for Coevolutionary Interactions Between Pacific Oyster Larvae and Their Sympatric Vibrios. Front. Microbiol. 10:2067. doi: 10.3389/fmicb.2019.02067

Bacteria of the *Vibrio* genus are the most predominant infectious agents threatening marine wildlife and aquaculture. Due to the large genetic diversity of these pathogens, the molecular determinants of *Vibrio* virulence are only poorly understood. Furthermore, studies tend to ignore co-evolutionary interactions between different host populations and their locally encountered *Vibrio* communities. Here, we explore the molecular targets of such co-evolutionary interactions by analyzing the genomes of nine *Vibrio* strains from the *Splendidus*-clade showing opposite virulence patterns towards two populations of Pacific oysters introduced into European Wadden Sea. By contrasting *Vibrio* phylogeny to their host specific virulence patterns, we could identify two core genome genes (OG1907 and OG 3159) that determine the genotype by genotype (G × G) interactions between oyster larvae and their sympatric *Vibrio* communities. Both genes show positive selection between locations targeting only few amino acid positions. Deletion of each gene led to a loss of the host specific virulence patterns while complementation with OG3159 alleles from both locations could recreate the wild type phenotypes matching the origin of the allele. This indicates that both genes can act as a genetic switch for *Vibrio*-oyster coevolution demonstrating that local adaptation in distinct *Vibrio* lineages can rely on only few genes independent of larger pathogenicity islands or plasmids.

Keywords: virulence, host-pathogen interaction, local adaptation, biological invasion, emerging disease, Wadden Sea

INTRODUCTION

Vibrionaceae (thereafter named vibrios) are among the most common and wide spread infectious disease agents of marine wildlife (Hada et al., 1984; Rosenberg and Ben-Haim, 2002; Austin and Zhang, 2006; Austin and Austin, 2007; Perez-Cataluna et al., 2016) and cause substantial damage to the aquaculture industry, especially to that of bivalves (Paillard et al., 2004; Romalde et al., 2014; Travers et al., 2015; Dubert et al., 2017). Vibrios are genetically (Thompson et al., 2005) and ecologically (Takemura et al., 2014) highly diverse and their niche flexibility

has partly been attributed to their ability to exchange genetic material by horizontal gene transfer (Le Roux and Blokesch, 2018). The high genetic diversity alone complicates our understanding of virulence mechanisms, especially since multiple factors can act in concert (Le Roux and Blokesch, 2018). In this context, the repeated mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated to diverse populations of vibrios represent an excellent case study of *Vibrio*-related disease in natural and economically important systems (Le Roux et al., 2016).

Only a few virulence genes of vibrios infecting oysters have been functionally characterized. These include secreted metalloproteases (Le Roux et al., 2007; Binesse et al., 2008; Hasegawa et al., 2008; Labreuche et al., 2010), vesicular serine protease (Vanhove et al., 2015), outer membrane protein U (Duperthuy et al., 2010, 2011), resistance genes against oxidative stress or heavy metals, (*sodA*, *copA*; Vanhove et al., 2016), toxins (MARTX, Bruto et al., 2018) or regulators (*varS*, Goudenege et al., 2014). Others lack functional annotation despite being widespread throughout the *Vibrio* phylogeny (Lemire et al., 2014; Bruto et al., 2018), and especially the discovery of the functional importance of these uncharacterized genes highlights the need to employ a consequent combination of comparative genomics with functional genetics to grasp the full variety of virulence factors in *Vibrio*-oyster interactions.

To date, most studies have focused on vibrios associated with disease outbreaks in aquaculture favoring isolates from diseased animals that probably show higher virulence (Sundberg et al., 2016). Aquaculture practices (e.g., high density of farmed animal, use of antibiotics, and transfer of animals) radically alter the ecology of both host and pathogens (Pulkkinen et al., 2010). In that context it can be assumed that bacterial disease emerged after rapid spread of selectively favored virulence factors by horizontal transfer of large genomic islands or plasmids (Bruto et al., 2017; Le Roux and Blokesch, 2018).

In natural populations, the extended contact between host and parasite/pathogen over several generations can lead to an arms race like host parasite interaction, characterized by fast reciprocal evolutionary changes of both parties, i.e., coevolution (Buckling and Rainey, 2002; Decaestecker et al., 2007; Schulte et al., 2010; Eizaguirre et al., 2012). Within populations this fast reciprocal change can lead to strong genotype by genotype (GxG) interactions and fluctuating selection on host and parasite genotypes (Decaestecker et al., 2007) that maintains genetic diversity (Berenos et al., 2011). On larger geographic scales, asynchrony of coevolution between populations can lead to between-population differentiation of both parasites and hosts in geographic mosaics of coevolution (Thompson et al., 2005). Host-parasite coevolution thus leads to local adaptation of host and parasite genotypes (Kawecki and Ebert, 2004) that has been observed in several marine host-parasite pairs (Sotka, 2005). Furthermore, virulence-transmission trade-offs can lead to selection of lower virulence to optimize transmission and maximize basic reproductive rate R_0 (Acevedo et al., 2019). Identification of virulence factors in *Vibrio*-oyster interactions has so far ignored such coevolutionary interactions, despite of the ecological and evolutionary importance of host genetic background as one decisive determinant of disease outcome (Le Roux et al., 2016).

Here, we now exploit such coevolutionary interactions to identify virulence factors of vibrios from the *Splendidus*-clade that cause host-specific mortality patterns in natural beds of Pacific oysters in the North Sea. The *Splendidus*-clade is a diverse and species-rich group of vibrios that ancestrally carries several virulence factors (Bruto et al., 2018). Infection of larvae from two distinct oyster populations with sympatric or allopatric vibrios from the *Splendidus*-clade already showed that patterns of local adaptation can arise quickly after oysters have been introduced (Wendling and Wegner, 2015). In detail, *Vibrio* spp. from either location (Texel in the Southern Wadden Sea and Sylt in the Northern Wadden Sea) were much less harmful to sympatric oyster larvae from the same location than to allopatric isolates, i.e., high mortality on Sylt larvae was coupled to low mortality on Texel larvae and vice versa (Wendling and Wegner, 2015). These oyster populations represent two distinct invasion events and are genetically differentiated (Moehler et al., 2011). Crosses between Sylt and Texel oysters revealed a dominant inheritance of host resistance in F1 larvae of mixed genetic background suggesting that specificity between vibrios and oysters relies on few loci in the oyster host (Wendling and Wegner, 2015). If host resistance relies on few loci, it is likely that also the number of interacting genetic components on the pathogen side is small helping the identification of virulence factors. Furthermore, since directly opposite mortality patterns on sympatric and allopatric oysters were observed in several distinct *Vibrio* species found in both locations, we could single out pairs of phylogenetically closely related strains from both locations for our analyses (**Figure 1**). This choice of strains will thus generate a strong contrast between genome-wide phylogeny (i.e., the species tree) and gene specific phylogenies associated with the contrasted phenotypes (i.e., the phenotype tree). Within nine phenotypically and phylogenetically contrasted *Vibrio* genomes we could identify two widespread yet uncharacterized genes from the core genome that determined interactions between oyster larvae and their sympatric *Vibrio* communities. Furthermore, expression of alleles from both locations demonstrated the functional involvement of these genes, because phenotypes matching the origin of the allele in a knock out mutant could be recreated. By estimating synonymous and non-synonymous substitution rates (i.e., dN/dS) within and between locations we could further identify the specific amino acid positions responding to selection and leading to the genotype by genotype (G × G) interactions. This highlights the use of coevolution in natural populations to complete our understanding of the genetic architecture and molecular pathways of virulence phenotypes in *Vibrio*-oyster interactions.

MATERIALS AND METHODS

Strain Selection

The vast majority *Vibrio* strains previously characterized for specific virulence patterns in oyster larvae along a geographic gradient belonged to the *Splendidus*-clade (70 out of 76,

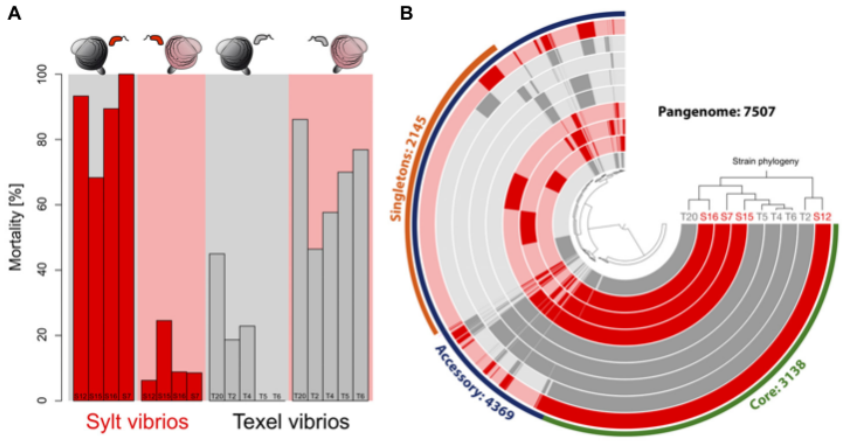


FIGURE 1 | (A) Specific virulence patterns of the *Vibrio* strains used for sequencing. Strains were isolated from Sylt and Texel oysters and tested on sympatric and allopatric oyster larvae. Red bars represent Sylt strains (S12, S15, S16, S7) and gray bars represent Texel strains (T20, T2, T4, T5, T6). A red background shows infection on Sylt oysters and a gray background infections on Texel oysters. **(B)** Pangenome of the Sylt and Texel *Vibrio* strains. Strains are ordered according to their phylogenetic tree. Strains from Texel are colored in gray while strains from Sylt are colored in red. A circular track shows the presence/absence of gene families. Core gene families that were present in all genomes are marked in green, and accessory gene families that were present in at least one strain are marked in blue. Within the accessory genome singleton genes are shown in orange. Gene families are organized in clusters (distance method = Euclidean; clustering method = Ward).

Wendling and Wegner, 2015). Therefore, we focused on this group and chose strains that came from the same location as the oyster brood stock (i.e., Sylt and Texel) to ensure the possibility for local coevolutionary interactions. Additionally, the chosen strains had to cause significantly less mortality on their sympatric host than on their allopatric one. This included the majority of strains isolated on Sylt (10 out of 18) and on Texel (6 out of 10). To maximize and replicate the contrast between phylogeny and virulence phenotype we then identified nine strains (S7, S12, S15, S16 isolated on Sylt and T2, T4, T5, T6, and T20 isolated on Texel) from different taxonomic species for genome sequencing based on previous MLST genotyping (Wendling and Wegner, 2015).

Genome Sequencing

High molecular weight DNA was extracted from overnight cultures using the Bacterial DNA kit (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) following the manufacturers instructions. After inspection of DNA amount and integrity paired-end library preparation and sequencing was performed using the Illumina NGS platform and methodology. Approximately 5 µg of DNA was used for PE library preparation according to the manufacturer's instructions (Illumina PE sample preparation kit). The libraries were sequenced on a HiSeq2000 in 100 bp PE mode. Reads were extracted in FastQ format using CASAVA v1.8.2 (supported by Illumina).

Bioinformatic Analyses

Raw sequencing reads were quality checked and trimmed of adapter sequences before they were assembled using the *de novo* assembly algorithm implemented in the CLC genomics workbench (CLC, Arhus, Denmark). High quality contigs are available under the accession numbers at NCBI (T20: VFEB00000000; T6: VFEC00000000; T5: VFED00000000; T4: VFEE00000000; T2: VFEF00000000; S7: VFEG00000000; S15: VFEH00000000; S12: VFEI00000000; S16: VFEJ00000000) and were annotated using the automated RAST pipeline at http://rast.nmpdr.org. A genome wide phylogeny of the strains sequenced here was based on a distance matrix of pairwise distances between genomes computed by the software *andi* (Haubold et al., 2015). The distances were clustered using the neighbor joining algorithm implemented in the *neighbor* routine of the PHYLIP software suite available at http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html.

Based on the gene annotations we constructed the accessory and core genome. We used OrthoMCL to identify orthologous groups from the genes predicted by the RAST annotation (Li et al., 2003). OrthoMCL uses a similarity matrix from an all-against-all protein BLAST (e cut-off = 10^{-5}) with subsequent Markov clustering to identify groups of orthologous genes and recent within species paralogs. The graphical representation of the pangenome encompassing all gene families was drawn with Anvio (Delmont and Eren, 2018). In order to study the accessory genome, we searched for gene families that formed gene pools that were exclusively shared by all strains from the same location. For the core genome analysis, we concentrated on 1:1 orthologs, i.e., genes with no paralogs within any strain. For this set of 1:1 orthologs we then calculated a genetic pairwise distance matrix based on the rate of non-synonmous substitutions (dN) by translating the protein alignment back to nucleotides using transAlign (Bininda-Emonds, 2005) and applying the *kaks* function of the *ade4* R package. Each resulting distance matrix was then correlated to the distance matrix from the whole genome sequence calculated by *andi* (see above) to obtain the phylogenetic correlation for each orthologous group

using mantel tests. We then correlated the genetic distance matrix of each orthologous group to the phenotypic distance matrix obtained from the virulence profiles. Also here mantel tests were performed and topologies of unrooted trees were checked for significant matrix correlations.

Functional annotation of candidate genes was obtained by identifying conserved protein domains in pfam and NCBI-CDD using *motif* available at https://www.genome.jp/tools/motif/ with a cutoff e-04. Localization in the cell was predicted using PSORTb available at https://www.psort.org/psortb/ with standard options. Transmembrane structure and signal peptide presence was determined via PHOBIUS (Kall et al., 2007).

Patterns of adaptive evolution were estimated by counting synonymous and non-synonymous substitutions. We grouped those in substitution that were fixed within locations (i.e., divergence substitutions D_n and D_s) and polymorphic substitutions (P_n and P_s) and calculated the Direction of Selection [$DoS = D_n/(D_n+D_s) - P_n/(P_n+P_s)$] as a less biased test statistic for the McDonald-Kreitman contingency table (Stoletzki and Eyre-Walker, 2011). Position specific signatures of selection were determined by ratios of non-synonymous to synonymous substitutions rates (dN/dS) along the protein sequence. We used Bayesian Markov chain Monte Carlo procedures implemented in omegaMap (Wilson and McVean, 2006) to calculate strength of selection by combining two independent runs of 100000 iterations and a thinning interval of 10 that was based on three random input orders of sequences. We used weak but proper inverse priors and determined dN/dS in a sliding window block size of 3 codons along the sequence. To differentiate diversifying selection within locations from positive selection between locations we ran this analysis with all sequences from Sylt and Texel as well as with sequences from each location separately.

Molecular Microbiology

Strains and plasmids used or constructed in the present study are described in **Supplementary Table S2**. *Vibrio* isolates were grown at 20°C in Luria-Bertani (LB) or LB-agar (LBA) + 0.5 M NaCl. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB or on LBA. Chloramphenicol (Cm, 5 or 25 $\mu g.ml^{-1}$ for vibrios and *E. coli,* respectively), thymidine (0.3 mM) and diaminopimelate (0.3 mM) were added as supplements when necessary. Induction of the P_{BAD} promoter was achieved by the addition of 0.02% L-arabinose to the growth media, and conversely, was repressed by the addition of 1% D-glucose. Deletion of selected regions or genes was performed by allelic exchange using the pSW7848T suicide plasmid (Val et al., 2012). To this end, two 500 bp fragments flanking the target gene were amplified and assembled by PCR (see primer details in **Supplementary Table S1**), cloned into pSW7848T as previously described (Lemire et al., 2014) and transferred by conjugation from *E. coli* donor and the *Vibrio* recipient strains. Subsequently, the first and second recombination events leading to pSW7848T integration and elimination were selected on Cm/glucose and arabinose containing media, respectively. For complementation experiments, the two alleles of OG3159 or *gfp* as a control were cloned into the Apa1/Xho1 sites of the pMRB plasmid resulting in a constitutive expression from a P_{LAC} promoter (Le Roux et al., 2011; Lemire et al., 2014). Conjugation between *E. coli* and *Vibrio* strains were performed at 30°C as described previously (Le Roux et al., 2007).

Experimental Infections

Virulence of wild type or mutant derivatives was tested on 3 day old oyster larvae by challenging 10–20 larvae with a concentration of 10^7 cells ml^{-1} in triple replicates. Dead larvae were counted after 24 h of exposure and mortality rates were calculated as the fraction of dead larvae of the total larvae, which were counted after the end of the experiment by killing all larvae. All mutants (two clones per gene) were tested on larvae from Texel and Sylt produced under standardized conditions (Helm and Bourne, 2004). After showing that the knock-outs worked in both larvae sources, we only tested complementation mutants on Sylt larvae as a proof of principle for the control of virulence patterns by the location specific alleles. Mortality proportions were analyzed by binomial generalized linear models (GLM) taking the number of dead larvae vs. the number of living larvae on day 2 of the experiment as a function of *Vibrio* strain (WT, knockout) and host origin (Sylt, Texel). Differences between groups of significant interactions and different factor levels were then tested by Tukey's *post hoc* test implemented in the R package *multcomp* (Hothorn et al., 2008).

RESULTS

Taxonomic Assignment Based on Genome Sequence Analyses

To explore molecular targets for local adaptation, we selected *Vibrio* strains from the *Splendidus*-clade isolated on Texel (T2, T4, T5, T6, T20) or Sylt (S7, S12, S15, S16) that were representative of the prevalent patterns of opposite mortality patterns on sympatric and allopatric oysters (**Figure 1A**). The *de novo* assembly of the nine genomes resulted in ∼99% coverage with genome size ranging from 4.5 to 5.6 Mb in length corresponding to 4013 genes and 4894 predicted genes for T2 and S7, respectively (**Table 1**). The genome-wide phylogeny (**Figure 1B**) confirmed the phylogenetic placement within the *Splendidus* clade of the previous classification by Multi Locus Sequencing Tag (MLST) analyses (Wendling and Wegner, 2015) for the majority of the strains. Strain T4, which was paired to S7 based on MLST, was, however, more closely related to T5 and T6 based on the whole genome phylogeny (**Figure 1B**). While this reduced the phylogenetic variability within the Texel strains, the contrast between phylogeny and virulence phenotypes (**Figure 2**) was still sufficiently large to identify the targeted virulence genes.

Two Core Genes Endorse Opposite Virulence on Sympatric and Allopatric Oysters

Virulence of *Vibrio* isolates toward allopatric hosts either suggests that: (i) isolates from the same location share a common and specific gene pool; (ii) adaptive alleles of core genes involved in virulence segregate between the different geographical areas.

TABLE 1 | Summary statistics of assembly and annotation for the sequenced *Vibrio* genomes.

Statistic	S7	S12	S15	S16	T2	T4	T5	T6	T20
# of reads (millions)	20.5	18.7	18.0	22.6	20.5	21.8	13.9	17.8	17.3
# of nucleotides (millions)	1975.3	1824.9	1750.1	2225.4	2012.5	2156.0	1378.7	1752.2	1699.8
# of contigs	257	155	450	400	192	318	235	114	259
N50	217'830	205'529	146'600	133'110	191'265	150'386	146'732	229'145	122'250
N75	109'863	95'225	78'430	76'994	82'060	80'151	95'051	120'531	215'231
Largest contig	669'531	341'281	591,072	336'801	511'873	612'686	612'755	755'092	468'870
Average sequencing depth	355	402	325	423	445	414	266	360	314
Estimated genome size	5'559'262	4'543'720	5'391'904	5'258'494	4'520'555	5'208'681	5'182'738	4'867'815	5412'861
Genome coverage	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%	≈99%
GC content	44.0	43.9	43.6	44.3	43.8	43.5	43.5	43.6	44.1
Predicted genes	4894	4022	4738	4576	4013	4542	4507	4253	4706

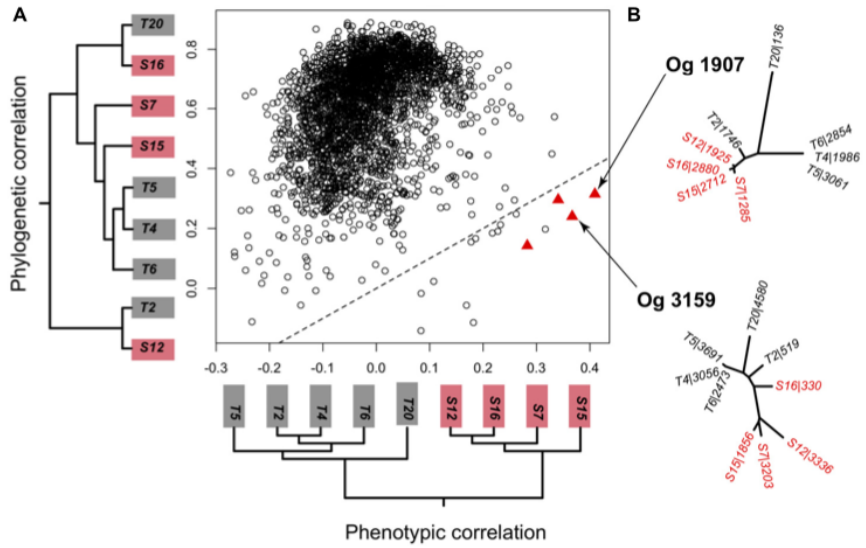


FIGURE 2 | (A) Correlation of each orthologous single-copy gene present in every strain to the genomewide phylogeny shown on the *y* axis (phylogenetic correlation) and to the phenotype tree reflecting virulence on the *x* axis (phenotypic correlation). Out of the 3089 1 on 1 orthologous groups (OG) only 4 showed a significant correlation to the phenotype tree that was higher than the phylogenetic correlation and only two of those produced a phylogenetic tree topography that was compatible to a split into two local groups. **(B)** Unrooted phylogenies of the orthologous genes OG1907 and OG3159 that significantly correlated to the phenotype matrix. Trees were based on a dN distance matrix. Labels show the strain identity and the number of the corresponding predicted protein-encoding gene.

To disentangle these hypotheses, we first explored the gene content and distribution of the flexible genome. The pan-genome of all nine strains consists of 7507 gene families encompassing 3138 core-genes (present in all 9 strains) and 4369 accessory gene families (present in 1 to 8 strains) (**Figure 1B**). None of the accessory genes was specifically found in all isolates from Texel and absent in all Sylt strains. On the other hand, six genes were only found in Sylt strains and absent in Texel strains. These genes encode a hypothetical protein, a putative orphan protein, a K + transporter, a *LysR* transcriptional regulator, and a small subunit of a D-amino acid dehydrogenase and are preceded upstream by an *integrase* gene suggesting that this cluster represents a local phage-mediated gene transfer. Since we could not observe a similar cluster within the Texel strains nor any Texel-specific genes, the content of the accessory genome, *i.e.,* a specific gene pool shared by all strains from the same geographical area, can probably not explain the contrasted host specific phenotypes.

We therefore focused on the core genome to identify orthologous core-gene groups (OG) where higher sequence diversity between than within geographical areas could explain the specific virulence patterns. Out of the 3138 OGs with representatives in each strain, 3089 OGs had only a single representative per strains (i.e., were 1 on 1 orthologs). The gene-based phylogeny reflected the species-based phylogeny for the majority of orthologous groups (2747 OGs with Mantel tests p-value < 0.05, **Figure 2A**). In contrast, only four genes correlated significantly with the virulence phenotype tree

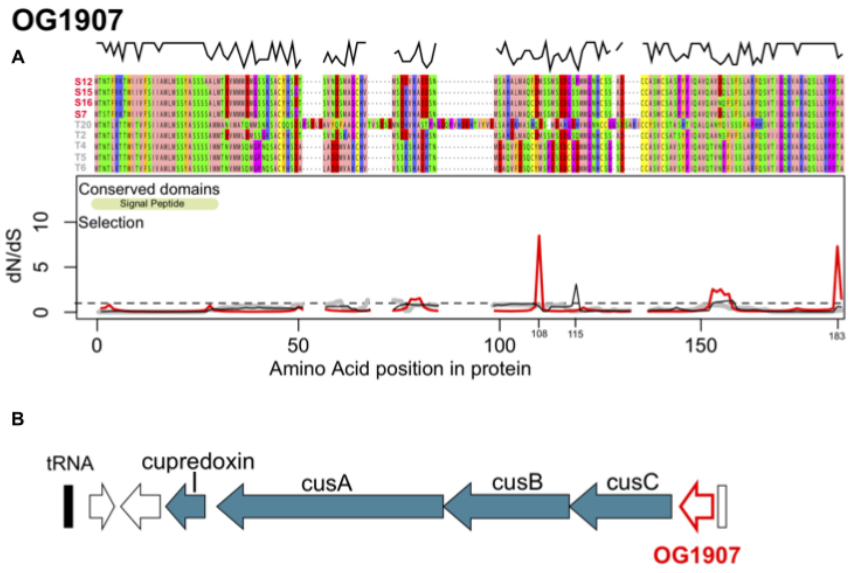


FIGURE 3 | (A) Protein alignment, conserved domains and selection along the protein sequence of OG1907. The alignment was color coded according to the Zappo color scheme according to their physicochemical properties. The black line above the alignment displays sequence similarity within the alignment. Synonymous to non-synonymous substitution rates (dN/dS) along the sequence are shown for Sylt sequences (red), Texel sequences (gray) and all sequences (Sylt + Texel, black), thus showing contributions of within vs. between location responses to selection. The dashed line shows neutral evolution while peaks above this line indicate positive selection. **(B)** Genomic context of OG1907 showing its tight link to the *cusABC* copper transporter.

(**Figure 2A**, red triangles). For two out of these four orthologous groups, tree topologies did not match the expected split between locations dictated by the virulence phenotypes. This indicates that a few large pairwise distances drove the correlation with virulence but not the tree topology. The other two OGs (OG1907 and OG3159) resembled the topology predicted from the phenotype tree (**Figure 2B**) and thus represent likely candidate genes underlying local virulence patterns.

The first orthologous group OG1907 encodes a 154–184 amino acid long protein with a theoretical molecular mass of 16.5 kDa and isoelectric point of 5.15 (**Figure 3A**). OG1907 in strain T20 showed reduced similarity to the other sequences due to several insertions elongating the protein alignment to184 amino acids (**Figure 3A**). Annotation using pSORTb and SigmaP predicted an extracellular localization and the presence of a signal peptide at position 1–29 (**Figure 3A**). Only Sylt sequences were predicted to contain a Glycosyl Hydrolase 3 domain (PF00933, $e = 6.2e^{-04}$) from position 21 to 96, which was not predicted for any of the Texel sequences. In all strain genomes, OG1907 is localized upstream of genes encoding *cusABC*, which are predicted to form a copper efflux pump (Pal et al., 2017; **Figure 3B**). The close association to *cusABC* together with its extracellular localization might therefore suggest that OG1907 encodes an extracellular protein involved in copper homeostasis by a mechanism that remains to be determined.

Overall, owing to the insertions in T20 and the high number of substitutions in T2 compared to the similar T4, T5, and T6 sequence similarity among strains was comparatively low along the sequence and only the terminal parts of the protein were reasonably conserved (**Figure 3A**). Low sequence similarity was, however, mainly found in sequences from Texel strains, while Sylt sequences were highly similiar. Accordingly, similarities within Texel strains (79 ± 15%) were significantly lower than within Sylt strains (97 ± 1.1%, $t = -3.449$, $p = 0.004$). Similarities between Sylt and Texel strains (76 ± 7.4%) were also significantly lower than within Sylt strains ($t = -4.467$, $p < 0.001$), but did not differ from within Texel diversity ($t = 0.770$, $p = 0.721$) indicating that differentiation between the locations was mainly caused by the highly similar alleles within Sylt strains whereas Texel strains accumulated alleles reflecting the whole diversity of the gene (**Figure 3B**). While differentiation between locations was reflected in a comparatively high number of non-synonymous fixed and polymorphic substitutions, especially synonymous polymorphic substitutions accumulated at a lower rate (**Table 2**), indicating only weak directional selection between locations. Accordingly, these substitution patterns resulted in a Direction of selection coefficient of DoS = −0.065 indicating rather neutral than adaptive evolution between locations. Whole gene estimates of selection can incorporate a mix of sites under purifying selection (dN/dS < 1) and sites under positive selection (dN/dS > 1) that cancel each other out in the overall analysis. This also applied to OG1907 where specific positions in the alignment showed signatures of strong positive selection with dN/dS ratios reaching as high as 8.48 for position 108 (**Figure 3A**, red line). Together with a second peak of selection in OG1907 at position 183 of the alignment (matching position 152 of

TABLE 2 | Number of fixed and polymorphic synonymous (D_S, P_S) and non-synonymous (D_N, P_N) substitutions for homologous sites of OG1907 and OG3159 between Sylt and Texel strains.

Substitution	OG1907	OG3159	% difference
D_N	11	2	−81%
D_S	8	2	−75%
P_N	150	69	−54%
P_S	83	197	+137%
Sum	252	270	
$DoS = D_n/(D_n + D_s) - P_n/(P_n + P_s)$	−0.06	0.24	

% difference shows the proportional change of each class of substitution between both genes.

the protein in T2) with a dN/dS ration of 7.303 these targets of selection were found in the data set only containing Sylt sequences, suggesting that local diversifying selection maintained polymorphism within this population despite of high overall sequence similarities in this group. To explain location specific virulence patterns, we needed to identify selection acting between locations rather than within. Therefore, we compared dN/dS ratios in the data set containing all sequences to the split data set containing sequences from each location separately. Amino acid position 115 showed such a between location target of selection with a dN/dS ratio of 3.113 for the complete data set (**Figure 3A**, black line), while purifying selection could be detected within the respective Sylt (dN/dS = 0.511) or Texel (dN/dS = 0.763) data sets.

The second orthologous group, OG3159 encodes a 153–159 amino acid long protein with a theoretical molecular mass of 15.8 kDa and isoelectric point of 10.2. This protein has four transmembrane domains (positions 15–37; 75–99; 102–121; 141–157) and is predicted to be localized in the cytoplasmic membrane (inner membrane) (**Figure 4A**). Proteins from this family showed significant sequence similarity with proteins from the YeeE/YeeD family of membrane transporters and especially with a transporter of sulfur-containing compounds, PmpA, identified in *Serratia* sp. ATCC39006 (Gristwood et al., 2011). This conserved domain (PF04143, $e = 6.9e^{-10}$) was found in the sequences of all strains used here and the gene was localized in close proximity of a glycosyltransferase, an acetyl transferase, a thiolase and a thioredoxine (**Figure 4B**), with the latter two suggesting that this protein family is a conserved transporter of sulfur containing molecules.

Large sections of the gene were highly conserved and especially the transmembrane domains of the protein show only little variation between the strains used here (**Figure 4A**). Consequently, we detected a low dN/dS = 0.145 for the whole gene that was mainly driven by purifying selection on these domains (**Figure 4A**). In contrast the cyto- and peri-plasmatic domains outside the membrane showed substantially more genetic variation, which also included a 6 amino acid insertion that was found in three out of four Sylt strains (**Figure 4A**). Accordingly, we found the lowest similarities between locations (79 ± 3.9%) while similarities were significantly higher within Texel (89 ± 7.4%, $t = 4.350$, $p < 0.001$). Similarities within Texel strains were also marginally higher than within Sylt (82 ± 6.5%, $t = 2.241$, $p = 0.078$), while we could not observe significant differences between within Sylt diversity and between Sylt-Texel diversity ($t = 1.133$, $p = 0.497$). Consequently, the distinct distribution of genetic diversity between locations for OG1907 and OG3159 suggests that both genes evolve along different evolutionary trajectories. This difference was also reflected in patterns of synonymous and non-synonymous substitutions observed between locations, that resulted in a DoS = 0.241 for OG3159 suggesting that differentiation might be a result of selection (**Table 2**). The difference in DoS values was mainly caused by an accumulation of polymorphic synonymous substitutions in OG3159. While both genes had a similar total number of substitutions, fixed and polymorphic non-synonymous (D_N, P_N) and fixed synonymous (D_S) accumulated at a much lower rate in OG3159 than in OG1907. For polymorphic synonymous substitutions (P_S) this pattern was reversed with more than twice as many substitutions in OG3159 further suggesting that purifying selection removed non-synonymous substitutions.

Despite of purifying selection acting on the majority of protein domains, signatures of positive selection could be detected in the first cytoplasmatic and the second periplasmatic domain (**Figure 4A**). Position 69 in the first cytoplasmatic domain showed positive selection mainly within the Sylt strains (dN/dS = 2.77, **Figure 4A**, red line). Adaptive evolution between locations might have been driven by positions 98 and 99, which showed elevated between location selection with dN/dS ratios of 2.064 and 2.120 for the whole data set containing all sequences (**Figure 4A**, black line). Constraining the data set to sequences from one location revealed purifying selection within the Sylt sequences (dN/dS = 0.377 and 0.403) and neutral evolution within the Texel sequences (dN/dS = 1.106 and 1.286). This between location selection peak fell into the second periplasmatic domain of the sulfur transporter. Together with the Sylt-specific insertion and the high dN/dS ratio within Sylt sequences in the first cytoplasmic domain this might suggest a potential functional role of these domains in ligand specificity for the transport between the cytoplasm and the periplasm (**Figure 4A**). The observed patterns of between host selection suggest that adaptive substitutions at a few amino acid sites of the two core-genome proteins were shaped by accentuated local selection pressures mediating G x G interactions between sympatric and allopatric combinations of vibrios and oysters.

The Two Loci Determine the Specific GxG Interactions Between Oyster Larvae and Sympatric Vibrios

The role of OG1907 and OG3159 for host specific virulence was assessed by gene knock out. Among the nine isolates, we were able to genetically manipulate only the T2 strain using our genetic tools. The genes OG3159 and OG1907 were deleted and two independent clones (T2Δ3159-1 and 2, T2Δ1907-1 and 2), which were then selected for experimental infection of larvae. We found a highly significant interaction between host sources (i.e., Texel vs. Sylt larvae) and wild type *Vibrio* strains (Deviance Host x *Vibrio* = 25.535, d.f. = 1,8, $p < 0.001$) that qualitatively

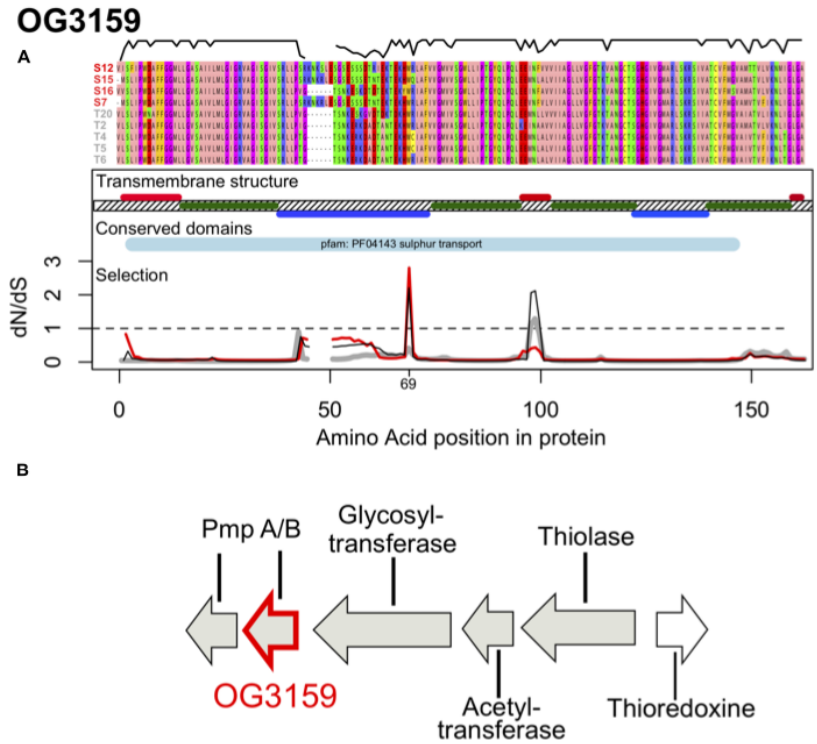


FIGURE 4 | (A) Protein alignment, transmembrane structure, conserved domains and selection along the protein sequence of OG3159. The alignment was color coded according to the Zappo color scheme according to their physicochemical properties. The black line above the alignment displays sequence similarty within the alignment. Transmembrane regions are shown in dark green, with periplasmatic regions above the hashed membrane in red and cytoplasmatic regions are shown below in blue. Synonymous to non-synonymous substitution rates (dN/dS) along the sequence are shown for Sylt sequences (red), Texel sequences (gray) and all sequences (Sylt + Texel, black), thus showing contributions of within vs. between location responses to selection. The dashed line shows neutral evolution while peaks above this line indicate positive divergent selection. **(B)** Genomic context of OG3159 showing its genetic neighborhood supporting its role as a sulfur transporter.

reproduced our previous results (Wendling and Wegner, 2015; **Figure 5**). In detail, S12 wild type (wt) induced higher mortality on Texel larvae than T2 wt (estimate = 1.695 ± 0.436, z = 3.883, $p < 0.01$), while T2 wt induced higher mortality on Sylt larvae (estimate = 1.547 ± 0.504, z = 3.070, p = 0.086, **Figure 5**). Deletion of either gene in strain T2 eliminated this Host × *Vibrio* interaction effect (Deviance Host x *Vibrio* = 1.396, d.f. = 3,16, p = 0.707) showing that the host specific virulence patterns were lost. In detail, virulence was significantly decreased on Sylt larvae for T2Δ1907-1 and 2, while it increased mortality on Texel larvae, albeit not significantly (**Figure 5**). Knock-out of OG3159 showed the opposite pattern as T2Δ3159-1 and 2 lead to decreased mortality in Sylt larvae, but increased mortality in Texel larvae. When the OG3159 gene ($OG3159_{T2}$ and $OG3159_{S12}$ for allele T2 or S12 respectively) was constitutively expressed in *trans* from a plasmid in the mutant T2Δ3159, the T2 wt, phenotype was restored only when complementing with the original T2 allele, while virulence was further reduced when the S12 allele was complemented (**Figure 5**). Altogether our data showed that both OG3159 and OG1907 drive the GxG interactions and are thus necessary for host specific virulence patterns while complementation with alleles from both locations could recreate the respective wild type phenotypes of OG3159.

DISCUSSION

The large genetic (Thompson et al., 2005) and ecological (Takemura et al., 2014) diversity of vibrios complicates the discovery of genetic factors causing adaptation to different environments or lifestyles. Identification of such genetic factors is particularly relevant for pathogenic vibrios that cause substantial damage to bivalve aquaculture (Paillard et al., 2004; Romalde et al., 2014; Travers et al., 2015; Dubert et al., 2017). However, aquaculture drastically changes the ecological conditions affecting the epidemiology of disease (Pulkkinen et al., 2010; Sundberg et al., 2016), and consequently most virulence factors associated with mortalities in aquaculture have missed the genetic targets of coevolutionary interactions that might be present in wild populations so far. Here, we show

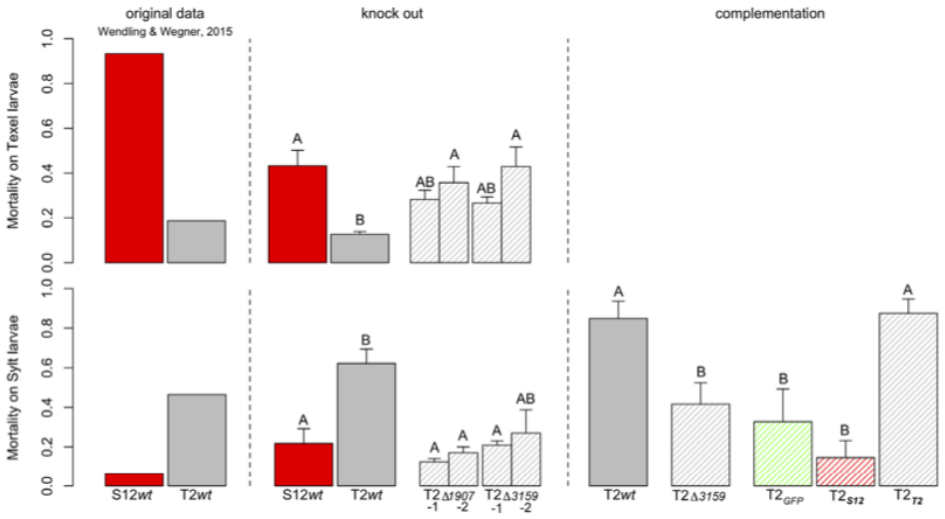


FIGURE 5 | Mortality of larvae exposed to wild-type and mutant strains of the isolates S12 and T2. The left panel shows the original data from Wendling and Wegner (2015). The central panel shows survival after repeated exposure to wild type strains and two knock-out mutants per target gene. Letter codes show pairwise *post hoc* comparisons with groups sharing no letter being significantly different from each other. Eliminating OG1907 from the T2 background removed the host specific virulence patterns by increasing mortality on Texel larvae and significantly decreasing mortality on Sylt larvae. Similarly, the knockout of OG3159 decreased mortality in Sylt larvae, but increased mortality in Texel larvae. The left panel shows the third exposure with the wild type and mutant T2 strains and reciprocal complementation with alleles from either T2 or S12. Letter codes show pairwise *post Hoc* comparisons with groups sharing no letter being significantly different from each other Elimination of T2 significantly reduced mortality compared to the wild type, but the wild type phenotype could fully be restored when the original T2 allele was used for complementation. In contrast, mortality was even further reduced when the mutant was complemented with the S12 allele. Complementation with GFP as procedural control did not change the mortality compared to the knock out mutant.

that exploiting such coevolutionary interactions between distinct host populations of the Pacific oyster and their sympatric and allopatric vibrios can reveal previously unrecognized virulence factors that mediate host specificity toward genetically distinct populations of Pacific oysters *C. gigas*. We identified two genes (OG1907 and OG3159) that regulate genotype by genotype (GxG) interactions by causing opposite virulence patterns on sympatric and allopatric oyster hosts. Both genes were not classical virulence gene candidates, such as toxin or colonization factors, and only our uninformed approach of filtering out candidates from the whole core genome in combination with genetic knock-out and complementation allowed us to identify these novel genetic targets of local adaptation and coevolutionary interactions between oysters and their *Vibrio* colonizers.

The Functional Role of OG3159 and OG1907 in *Vibrio*-Oyster Interactions

Annotation of OG3159 revealed a Yee/YeD domain present in all sequences analyzed here. This domain was originally characterized in *Serratia* sp. (strain ATCC 39006), where it is involved in the production of a pigment antibiotic prodigiosin as part of a four gene operon with PigS and three membrane bound molecules PmpABC functioning as a transporter for sulfur molecules (Gristwood et al., 2011). While the PigS and PmpC were absent from the cluster in the *Vibrio* sequences analyzed here, the proximity of genes catalyzing reactions containing sulfur compounds (Thioredoxine, Thiolase, **Figure 4**) suggests that this cluster is involved in transport of sulfur containing components. This putative function together with the localization in the inner cytoplasmatic membrane, that is not in direct contact with the oyster host, does not intuitively explain how this gene is involved in host-population specific virulence. Our genetic analyses do, however, clearly demonstrate its role in host specificity, because the complementation with the location specific alleles ($OG3159_{S12}$ and $OG3159_{T2}$) was sufficient to switch between the wild type virulence phenotypes of T2 and S12 (**Figure 5**). Complementation T2Δ3159 with the respective alleles of T2 and S12 mainly changed the protein sequences of the first cytoplasmatic and the second periplasmatic domain (**Figure 4A**). More amino acid substitutions could be observed between the S12 and T2 alleles in the first cytoplasmatic domain than in the second periplasmatic domain. Yet, substitutions in the cytoplasmatic domain did not show any signature of positive selection (with the exception of position 69, which codes for the same amino acid in both alleles, **Figure 4A**). The second periplasmatic domain, however, matches the between location peak of selection (**Figure 4A**), and complementation leads to an amino acid change from Alanine in T2 to Phenylalanine in S12. Since complementation exchanged the whole allele and not just the second periplasmatic domain, we cannot say for certain that this specific amino change causes the phenotype switch. Nevertheless, over all alleles substitution patterns suggest that selection was favoring the

different amino acid in Sylt and Texel strains by changing the predominant Leucine at position 99 in four out of five Texel strains to a Phenylalanine in three out of four Sylt strains (**Figure 4A**), thus changing from aliphatic to aromatic properties that might increase binding to hydrophobic substrates (Betts and Russel, 2003) and thus target different organosulphur substrates. Organosulphur compounds like prodigiosin, the target of the OG3159 homolog PmpB in Serratia (Gristwood et al., 2011), have been shown to have antimicrobial properties (Lapenda et al., 2015). They have also been shown to interfere with signal transduction pathways and act as an immunodepressive (Williamson et al., 2006). So, if different OG3159 alleles do indeed show different affinities for different organosulphur compounds for the production of different prodigiosin-like molecules it could mediate competitivity/resistance or the interaction with the oyster host even though the protein itself is not in contact with the host or other bacteria colonizing the oyster.

In the case of OG1907, the presence of a signal peptide and localization outside of the cell indicates that this gene is an extracellular protein that could potentially mediate the interaction with the oyster host directly. However, functional homology of conserved domains provides only little information on how such an interaction might look like. The only conserved domain was a Glycosyl hydrolase 3 domain, which was only predicted for the strains isolated on Sylt but not for strains isolated on Texel. Furthermore, even for the Sylt strains the confidence for the glycosyl hydrolase domain prediction was comparatively low (e = 6.4e−04) casting doubt on a function in saccharide modification of this gene. More interestingly, the gene was located directly upstream of the *cusABC* cluster in all strains. *cusABC* forms a periplasmatic copper efflux pump (Chacon et al., 2014) and has been implicated in copper homeostasis and resistance in various gram negative bacteria including vibrios (Hernandez-Montes et al., 2012). Moreover, also *copA*, which encodes a copper-exporting P-type ATPase, has been previously demonstrated to be an essential virulence factor in *V. tasmaniensis* (strain LGP32; Vanhove et al., 2016) and *V. crassostreae* (J2-9; Bruto et al., 2017). In LGP32 *copA* has been further shown to be required for copper resistance, intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes (Vanhove et al., 2016). Since oyster use copper for oxygen transport, copper concentrations in oysters can be very high (Amiard et al., 2008). Together with the results found in *V. tasmaniensis* (Vanhove et al., 2016) our findings might suggest a more general role for copper resistance in oyster associated life styles of vibrios. In addition, copper concentration in Sylt shellfish (blue mussel, *Mytilus edulis*) increased twofold between 1997 and 2004 reaching up to four times higher levels than the water background while concentrations on Texel stayed constant with twice the concentration as found in open water (Essink et al., 2005). The different accumulations of copper in shellfish might thus have formed the selective background driving the differentiation of the gene cluster containing OG1907 between Sylt and Texel that we observed here. We are aware that predicting the detailed function of genes from homology to known proteins will always harbor a speculative component. This also applies to the functional context suggested above, and further experiments are needed to gain a deeper insight into the functional relation of these genes to the host specific virulence phenotypes.

Selection Pressures

The different and partly opposing patterns of sequence diversity and nucleotide substitutions found for OG1907 and OG3159 indicate that different evolutionary forces and selection pressures shaped diversity of both genes. Yet, the gene knock-outs of both genes caused the specific virulence patterns against sympatric and allopatric oyster hosts of the wild type strains to break down. This obvious link to the host-specific virulence phenotypes may suggest that sites that display positive selection between locations might represent the mutations that were selected to evoke host specific virulence patterns. To fully understand what is driving the evolution of host-specific virulence patterns, one must also understand the selective pressures that cause adaptation. Increased virulence is often associated with increased fitness (Johnson, 2013), leading to the prediction that sympatric vibrios should cause higher mortality. Here, we find the opposite patterns that vibrios express lower virulence on their sympatric oyster hosts. Lower virulence on sympatric strains was not just observed in the 9 strains sequenced here but in the majority of all strains isolated on Sylt and Texel (*i.e.*, 61%, Wendling and Wegner, 2015) indicating that the evolution of host specific virulence is rather a rule than an exception. Since mortality in disease always reflects the balance between resistance/tolerance of the host and virulence of the pathogen (Feis et al., 2016), two adaptive scenarios could explain this pattern: For one, oysters could have evolved resistance against their local vibrios and use the OG1907 protein or the OG3159 ligands as molecular targets for recognition and resistance evolution. The dominant inheritance found in larvae of F1 crosses between oysters from both locations supports this as it signifies a strong host genetic component (Wendling and Wegner, 2015). Furthermore, it was already shown that cellular immune activity was stronger against sympatric vibrios in adult oysters from the same locations (Wendling and Wegner, 2015), suggesting specific immune stimulation in sympatric combinations of vibrios and oysters. While it is unclear to which stage the immune system of larval oysters is developed (Zhang et al., 2012) any increase in resistance or tolerance against infection can be considered adaptive for the oyster host and will be selected for.

On the other hand, the position specific patterns of positive selection found between locations for both *Vibrio* genes shows that also the *Vibrio* strains themselves responded to selection by adaptation. If the *Vibrio* strains used here indeed adapted to their respective location, higher virulence would not correlate to higher fitness. Indeed, maximizing virulence might not always be adaptive when transmission is impeded by reduced host density [i.e., virulence transmission trade off (Anderson and May, 1982)]. Aquaculture can select for higher virulence (Sundberg et al., 2016) also because host densities are kept high by artificial supplies of new hosts. Such a transition toward higher virulence was already observed in an aquaculture background when plasmid acquisition turned a benign oyster colonizer into an emerging pathogen (Bruto et al., 2017). Therefore, the natural oyster reefs on Sylt and Texel, where densities naturally

fluctuate (Troost, 2010; Reise et al., 2017), might actually select for lower virulence, that was repeatedly observed as a result of host-parasite coevolution (Acevedo et al., 2019). This could mean that *Vibrio* strains get selected that colonize oysters with causing only little harm and become part of the natural oyster microbiome. In general, the high abundance of vibrios in the hemolymph of healthy oysters shows that vibrios are enriched in oysters compared to the surrounding sea water and are important components of the hemolymph microflora (Lokmer et al., 2016). Some strains are even considered to be beneficial and were suggested as probiotic candidates (Gatesoupe, 1999) further suggesting that colonizing the oyster host does not necessarily lead to the evolution of virulence but can also select for mutualistic interactions. Detailed experiments investigating the colonization process against the backdrop of oyster resistance are, however, needed to differentiate between the alternative scenarios.

CONCLUSION

By exploiting coevolutionary *Vibrio*-oyster interactions in natural oyster beds we were able to identify two genes that could explain the host specific virulence patterns. These genes are putatively involved in functions very different from previously described virulence genes and would have never been picked as target genes to explain variation in virulence. Yet, our genetic analyses, although it is based on a limited number of strains, can demonstrate their functional role in the contrasted virulence patterns between sympatric and allopatric oyster hosts, highlighting the use of our approach to explore the "dark matter" of virulence genes. While virulence toward oysters can be an ancestral trait in the *Splendidus* group (Bruto et al., 2018), many other virulence factors have been discovered (Hasegawa et al., 2008; Labreuche et al., 2010; Duperthuy et al., 2011; Goudenege et al., 2014; Lemire et al., 2014). This diverse arsenal of population specific weapons does not only reflect the overall genomic and ecological diversity of vibrios (Thompson et al., 2005; Takemura et al., 2014), but also the diversifying forces inherent to host-parasite coevolution. The discovery of the two genetic factors in this study not only adds to this diversity, but describes genes that are responsible for host specific virulence patterns that constitute local adaptation and/or function as targets for coevolutionary interactions. Since only a few mutations in both genes showed signs of positive selection between locations, evolution of specificity might proceed swiftly and the increasing number of mass mortalities caused by disease also in natural populations (Fey et al., 2015) calls for a mechanistic understanding of the underlying causes. The analysis of oyster-*Vibrio* interactions from natural oyster beds that are largely independent from alteration of disease dynamics often caused by aquaculture influences (Pulkkinen et al., 2010; Sundberg et al., 2016) thus offers a promising experimental system to investigate disease dynamics and selective pressures in the wild (Le Roux et al., 2016).

DATA AVAILABILITY

Assembled sequences are available from NCBI under the accession numbers: VFEB00000000 (T20); VFEC00000000 (T6); VFED00000000 (T5); VFEE00000000 (T4); VFEF00000000 (T2); VFEG00000000 (S7); VFEH00000000 (S15); VFEI00000000 (S12); VFEJ00000000 (S16).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KW conceptualized the study. UJ sequenced the strains. ZM performed the initial assemblies and annotations. KW and MB performed the bioinformatics analyses. DP and FLR knocked out and complemented the target genes. MA-B, BP, KW, and FR bred oysters and performed the infection experiments. KW, MB, and FR wrote the manuscript. All authors commented and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the DFG Emmy Noether grant WE4641/1 given to KW, ANR grant REVENGE (ANR-16-CE32-0008-01) given to FR, IFREMER and Région Bretagne for funding DP, and the PACES Research Programme of the Alfred Wegener Institut - Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marco Groth and Ivonne Goerlich for their skillful and diligent assistance in the Illumina sequencing at Leibniz-Institute for Age Research, Fritz Lipmann Institute Jena, Germany.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02067/full#supplementary-material

TABLE S1 | Primers used in the present study.

TABLE S2 | Strains and plasmids used or constructed in the present study.

REFERENCES

Acevedo, M. A., Dillemuth, F. P., Flick, A. J., Faldyn, M. J., and Elderd, B. D. (2019). Virulence-driven trade-offs in disease transmission: a meta-analysis. *Evolution* 73, 636–647. doi: 10.1111/evo.13692

Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P. S., and Wang, W. X. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2010–2022. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.041

Anderson, R. M., and May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* 85, 411–426. doi: 10.1017/s0031182000055360

Austin, B., and Austin, D. A. (2007). *Bacterial Fish Pathogens - Disease of Farmed and Wild Fish*. Berlin: Springer.

Austin, B., and Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 119–124. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x

Berenos, C., Wegner, K. M., and Schmid-Hempel, P. (2011). Antagonistic coevolution with parasites maintains host genetic diversity: an experimental test. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 278, 218–224. doi: 10.1098/rspb.2010.1211

Betts, M. J., and Russel, R. B. (2003). "Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions," in *Bioinformatics for Geneticists*, eds M. R. Barnes, and I. C. Gray, (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons), 289–316. doi: 10.1002/0470867302.ch14

Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Verges, M. C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., et al. (2008). Metalloprotease *Vsm* is the major determinant of toxicity for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108–7117. doi: 10.1128/aem.01261-8

Bininda-Emonds, O. R. (2005). transAlign: using amino acids to facilitate the multiple alignment of protein-coding DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 6:156. doi: 10.1186/1471-2105-6-156

Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivesse, S., Alunno-Bruscia, M., et al. (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J.* 11, 1043–1052. doi: 10.1038/ismej.2016.162

Bruto, M., Labreuche, Y., James, A., Piel, D., Chenivesse, S., Petton, B., et al. (2018). Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *ISME J.* 12, 2954–2966. doi: 10.1038/s41396-018-0245-3

Buckling, A., and Rainey, P. B. (2002). Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 269, 931–936. doi: 10.1098/rspb.2001.1945

Chacon, K. N., Mealman, T. D., McEvoy, M. M., and Blackburn, N. J. (2014). Tracking metal ions through a Cu/Ag efflux pump assigns the functional roles of the periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15373–15378. doi: 10.1073/pnas.1411475111

Decaestecker, E., Gaba, S., Raeymaekers, J. A. M., Stoks, R., Van Kerckhoven, L., Ebert, D., et al. (2007). Host-parasite 'Red Queen' dynamics archived in pond sediment. *Nature* 450, 870–873. doi: 10.1038/nature06291

Delmont, T. O., and Eren, A. M. (2018). Linking pangenomes and metagenomes: the *Prochlorococcus* metapangenome. *PeerJ* 6:4320. doi: 10.7717/peerj.4320

Dubert, J., Barja, J. L., and Romalde, J. L. (2017). New insights into pathogenic *Vibrios* affecting bivalves in hatcheries: present and future prospects. *Front. Microbiol.* 8:762. doi: 10.3389/fmicb.2017.00762

Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., et al. (2010). The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster Crassostrea gigas. *Environ. Microbiol.* 12, 951–963. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., et al. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2993–2998. doi: 10.1073/pnas.1015326108

Eizaguirre, C., Lenz, T. L., Kalbe, M., and Milinski, M. (2012). Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. *Nat. Commun.* 3:621. doi: 10.1038/ncomms1632

Essink, K., Dettmann, C., Farke, H., Laursen, K., Lüerßen, G., Marencic, H., et al. (2005). "Wadden Sea Quality Status Report 2004," in *Wadden Sea Ecosystem No. 19*, eds K. Essink, C. Dettmann, H. Farke, K. Laursen, G. Lüerßen, H. Marencic, et al. (Wilhelmshaven: Common Wadden Sea Secretariat).

Feis, M. E., Goedknegt, M. A., Thieltges, D. W., Buschbaum, C., and Wegner, K. M. (2016). Biological invasions and host-parasite coevolution: different coevolutionary trajectories along separate parasite invasion fronts. *Zoology* 119, 366–374. doi: 10.1016/j.zool.2016.05.012

Fey, S. B., Siepielski, A. M., Nussle, S., Cervantes-Yoshida, K., Hwan, J. L., Huber, E. R., et al. (2015). Recent shifts in the occurrence, cause, and magnitude of animal mass mortality events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 1083–1088. doi: 10.1073/pnas.1414894112

Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180, 147–165. doi: 10.1016/s0044-8486(99)00187-8

Goudenege, D., Travers, M. A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., et al. (2014). A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ. Microbiol.* 17, 4189–4199. doi: 10.1111/1462-2920.12699

Gristwood, T., McNeil, M. B., Clulow, J. S., Salmond, G. P., and Fineran, P. C. (2011). PigS and PigP regulate prodigiosin biosynthesis in *Serratia* via differential control of divergent operons, which include predicted transporters of sulfur-containing molecules. *J. Bacteriol.* 193, 1076–1085. doi: 10.1128/JB.00352-10

Hada, H. S., West, P. A., Lee, J. V., Stemmler, J., and Colwell, R. R. (1984). *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of Bivlave mollusks. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 1–4. doi: 10.1099/00207713-34-1-1

Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A., and Hase, C. C. (2008). The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (Crassostrea gigas) larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4101–4110. doi: 10.1128/AEM.00061-8

Haubold, B., Klotzl, F., and Pfaffelhuber, P. (2015). andi: fast and accurate estimation of evolutionary distances between closely related genomes. *Bioinformatics* 31, 1169–1175. doi: 10.1093/bioinformatics/btu815

Helm, M. M., and Bourne, N. (2004). *Hatchery Culture of Bivalves - A Practical Manual*. Rome: FAO.

Hernandez-Montes, G., Arguello, J. M., and Valderrama, B. (2012). Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma *proteobacteria*. *BMC Microbiol.* 12:14. doi: 10.1186/1471-2180-12-249

Hothorn, T., Bretz, F., and Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biom. J.* 50, 346–363. doi: 10.1002/bimj.200810425

Johnson, C. N. (2013). Fitness factors in *Vibrios*: a mini-review. *Microb. Ecol.* 65, 826–851. doi: 10.1007/s00248-012-0168-x

Kall, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35, W429–W432. doi: 10.1093/nar/gkm256

Kawecki, T. J., and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x

Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., et al. (2010). *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 753–758. doi: 10.1016/j.fsi.2010.07.007

Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K., and Nascimento, S. C. (2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 399–406. doi: 10.1007/s11274-014-1793-y

Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007). Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 777–784. doi: 10.1128/aem.02147-6

Le Roux, F., and Blokesch, M. (2018). Eco-evolutionary dynamics linked to horizontal gene transfer in *Vibrios*. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 89–110. doi: 10.1146/annurev-micro-090817-62148

Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B. M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., et al. (2011). Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ. Microbiol.* 13, 296–306. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02329.x

Le Roux, F., Wegner, K. M., and Polz, M. F. (2016). Oysters and *Vibrios* as a model for disease dynamics in wild animals. *Trends Microbiol.* 24, 568–580. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.006

Lemire, A., Goudenege, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., et al. (2014). Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J.* 9, 1523–1531. doi: 10.1038/ismej.2014.233

Li, L., Stoeckert, C. J., and Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13, 2178–2189. doi: 10.1101/gr.1224503

Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J., and Wegner, K. M. (2016). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environ. Microbiol.* 18, 970–987. doi: 10.1111/1462-2920.13163

Moehler, J., Wegner, K. M., Reise, K., and Jacobsen, S. (2011). Invasion genetics of Pacific oyster *Crassostrea gigas* shaped by aquaculture stocking practices. *J. Sea Res.* 66, 256–262. doi: 10.1016/j.seares.2011.08.004

Paillard, C., Le Roux, F., and Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 17, 477–498. doi: 10.1051/alr:2004054

Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D. G. J., et al. (2017). Metal resistance and its association with antibiotic resistance. *Adv. Microb. Physiol.* 70, 261–313. doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.02.001

Perez-Cataluna, A., Lucena, T., Tarazona, E., Arahal, D. R., Macian, M. C., and Pujalte, M. J. (2016). An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 361–369. doi: 10.1016/j.syapm.2016.03.010

Pulkkinen, K., Suomalainen, L. R., Read, A. F., Ebert, D., Rintamaki, P., and Valtonen, E. T. (2010). Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proc. Biol. Sci.* 277, 593–600. doi: 10.1098/rspb.2009.1659

Reise, K., Buschbaum, C., Büttger, H., Rick, J., and Wegner, K. M. (2017). Invasion trajectory of Pacific oysters in the northern Wadden Sea. *Mar. Biol.* 164:68. doi: 10.1007/s00227-017-3104-2

Romalde, J. L., Dieguez, A. L., Lasa, A., and Balboa, S. (2014). New Vibrio species associated to molluscan microbiota: a review. *Front. Microbiol.* 4:413. doi: 10.3389/fmicb.2013.00413

Rosenberg, E., and Ben-Haim, Y. (2002). Microbial diseases of corals and global warming. *Environ. Microbiol.* 4, 318–326. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00302.x

Schulte, R. D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N. K., and Schulenburg, H. (2010). Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7359–7364. doi: 10.1073/pnas.1003113107

Sotka, E. E. (2005). Local adaptation in host use among marine invertebrates. *Ecol. Lett.* 8, 448–459. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00719.x

Stoletzki, N., and Eyre-Walker, A. (2011). Estimation of the neutrality index. *Mol. Biol. Evol.* 28, 63–70. doi: 10.1093/molbev/msq249

Sundberg, L. R., Ketola, T., Laanto, E., Kinnula, H., Bamford, J. K. H., Penttinen, R., et al. (2016). Intensive aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283:20153069. doi: 10.1098/rspb.2015.3069

Takemura, A. F., Chien, D. M., and Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front. Microbiol.* 5:38. doi: 10.3389/fmicb.2014.00038

Thompson, J. R., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Benoit, J., et al. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307, 1311–1313. doi: 10.1126/science.1106028

Travers, M. A., Boettcher Miller, K., Roque, A., and Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 11–31. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.010

Troost, K. (2010). Causes and effects of a highly successful marine invasion: case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *J. Sea Res.* 64, 145–165. doi: 10.1016/j.seares.2010.02.004

Val, M. E., Skovgaard, O., Ducos-Galand, M., Bland, M. J., and Mazel, D. (2012). Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genetics* 8:10. doi: 10.1371/journal.pgen.1002472

Vanhove, A. S., Duperthuy, M., Charriere, G. M., Le Roux, F., Goudenege, D., Gourbal, B., et al. (2015). Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ. Microbiol.* 17, 1152–1165. doi: 10.1111/1462-2920.12535

Vanhove, A. S., Rubio, T. P., Nguyen, A. N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., et al. (2016). Copper homeostasis at the host *Vibrio* interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ. Microbiol.* 18, 875–888. doi: 10.1111/1462-2920.13083

Wendling, C. C., and Wegner, K. M. (2015). Adaptation to enemy shifts: rapid resistance evolution to local *Vibrio* spp. in invasive Pacific oysters. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282:e20142244. doi: 10.1098/rspb.2014.2244

Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J., and Salmond, G. P. C. (2006). The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 887–899. doi: 10.1038/nrmicro1531

Wilson, D. J., and McVean, G. (2006). Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics* 172, 1411–1425. doi: 10.1534/genetics.105.044917

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., et al. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi: 10.1038/nature11413

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Wegner, Piel, Bruto, John, Mao, Alunno-Bruscia, Petton and Le Roux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Informations supplémentaires

Primers	Gene label MAGE	Gene label Mathias	Gene family	Objective	Sequence
290615-5	VSYLS12_v1_110049	S12|peg.3336_og3159	OG3159	Complementation	cggtggggcccGTGATTTAGTTTTTATACCTTGGGATG
290615-6					cggtctcgagTTACGCCCCCAAACCAATCATATTC
290615-7	VTEXT2_v1_200036	T2|peg.519_og3159	OG3159		cggtggggcccGTGCTTAGTTTGATTCCTTGGG
290615-8					cggtctcgagTTACGCCCCCAAACCAATCAG
290615-13	VTEXT2_v1_140094	T2|peg.1746_og1907	OG1907	Deletion	**GTATCGATAAGCTTGATATCgaattc**GTGATCACGGTTGGTGGTCTAAC
170216-1					GCAAAGATTGAGCGCGTGCGGTTGTTCGGAGTGTGTTTGTC
170216-2					GACAAACACACTCCGAACAAC**CGCACGCGCTCAATCTTTGC**
290615-16					**CCCCCGGGCTGCAGgaattc**TTCTGTTGGAGGTTAAGCGTATC
290615-21					**GTATCGATAAGCTTGATATCgaattc**TGATTTGCAATGGCCGGGTG
290615-22	VTEXT2_v1_200036	T2|peg.519_og3159	OG3159		CGATAGTAAACGAAGAGTTTTTCAAGACCTCTCCTATCCATATAC
290615-23					GTATATGGATAGGAGAGGTCTTGAAAAACTCTTCGTTTACTATCG
290615-24					**CCCCCGGGCTGCAGgaattc**ACTTAAAGCGAGTCAACCTCTC

Table 1 : amorces utilisées lors de l'étude

Original strain	Genotype (short name in the present article)	Media	GV number	Reference
P3813	B462 *DthyA::(erm-pir116)* [Erm^R]	LB dT Erm, 37°C	380	Le Roux et al., 2007
b3914	b2163 *gyrA462, zei298::Tn10* [Km^R Em^R Tc^R]	LB dap Kana, 37°C	46	Le Roux et al., 2007
P3813	pSW7848T	LB dap Cm25, 37°C	127	Val et al., 2012
b3914	pSW7848T::500bp flanking VTEXT2_v1_140094 (OG1907) of T2 strain	LB dap Cm25, 37°C	1563	This study
b3914	pSW7848T::500bp flanking VTEXT2_v1_200036 (OG3159) of T2 strain	LB dap Cm25, 37°C	1427	This study
b3914	pMRB_Plac_GFP between apa1 and Xho1, high copy CmR	LB dap Cm25, 37°C	535	Lemire et al., 2015
b3914	pMRB_Plac_ VTEXT2_v1_200036 (OG3159) of T2 strain between apa1 and Xho1, high copy CmR	LB dap Cm25, 37°C	2400	This study
b3914	pMRB_Plac_ VSYLS12_v1_110049 (OG3159) of S12 strain between apa1 and Xho1, high copy CmR	LB dap Cm25, 37°C	2401	This study
T2	Wild type (wt)	LB NaCl, 20°C	1557	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_140094 (OG1907), clone 1 (D1907-1)	LB NaCl, 20°C	1559	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_140094 (OG1907), clone 2 (D1907-2)	LB NaCl, 20°C	1560	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_200036 (OG3159), clone 1 (D3159-1)	LB NaCl, 20°C	1561	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_200036 (OG3159), clone 2 (D3159-2)	LB NaCl, 20°C	1562	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_200036 (OG3159), clone 1 + pMRB_Plac_GFP between apa1 and Xho1, high copy CmR (D3159-1+gfp)	LB NaCl Cm5, 20°C	2411	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_200036 (OG3159), clone 1 + pMRB_Plac_ VSYLS12_v1_110049 (OG3159) of S12 strain between apa1 and Xho1, high copy CmR (D3159-1+3159_S12)	LB NaCl Cm5, 20°C	2412	This study
T2	Deletion of VTEXT2_v1_200036 (OG3159), clone 1 + pMRB_Plac_ VTEXT2_v1_200036 (OG3159) of T2 strain between apa1 and Xho1, high copy CmR (D3159-1+3159_T2)	LB NaCl Cm5, 20°C	2413	This study

Table 2 : souches utilisées lors de l'étude

I-B Déterminants moléculaires de l'adaptation locale en zone impactée par la maladie (article 2)

Les vibrios ne sont pas des parasites obligatoires, ils ont une vie hors de l'huître, et certaines populations écologiques se comportent comme des généralistes. Cependant notre équipe a montré que certaines populations étaient préférentiellement associées à l'huître (Bruto et al., 2017). Parmi elles *V. crassostreae* regroupe une majorité de souches virulentes et n'est détectée que pendant les épisodes de mortalité des juvéniles. Ces résultats nous amènent à adresser un certain nombre de questions : i) quel est le réservoir de *V. crassostreae* hors contexte de maladie ? ii) il y a t'il eut émergence de vibrios plus virulents dans les zones ostréicoles impactées par la maladie des juvéniles ? Peut-on mettre en évidence une adaptation locale dans l'interaction huitres-vibrios dans des zones fortement impactées par la maladie ?

Réservoir et émergence de *V. crassostreae* plus virulent en zone ostréicole.

Des souches de *V. crassostreae* ont été collectées à Brest (France), une zone d'élevage ostréicole intensif qui subit des épisodes de mortalité récurrents, et à Sylt (Allemagne), où une invasion massive d'huîtres a formé des gisements naturels qui n'ont pas encore souffert de maladie (Reise et al. 2017). Le plasmide pGV1512 n'a été détecté que dans des isolats de Brest et sa présence est corrélée à la virulence pour l'huître (Article 2, figure 1). Nous avons en outre montré qu'à une température inférieure à 16°C, les huîtres constituaient un réservoir de souches virulentes de *V. crassostreae.*

Nous avons ensuite exploré les déterminants moléculaires portés par le plasmide pGV1512. Une série de mutants de délétion de différentes régions de ce plasmide a été réalisée, puis testée *in vivo* par infections expérimentales et *in vitro* lors d'essais de cytotoxicité pour les hémocytes. Un seul gène est nécessaire à la virulence portée par la région Px3 (Article 2, figure 2). Ce gène code un facteur de transcription de la famille AraC. Pour identifier le ou les gène(s) régulé(s) par ce facteur de transcription, nous avons effectué une analyse transcriptomique. Cette technique a permis d'établir que seuls les gènes codant un système de sécrétion de type 6 sont surexprimés par le facteur de transcription par l'intermédiaire d'un promoteur bidirectionnel (Article 2, figures 3 et 4). Nous avons ensuite démontré le rôle de ce T6SS dans la virulence chez l'huître et la cytotoxicité pour les hémocytes.

En plus du plasmide pGV1512, de précédents travaux ont montré que le gène chromosomique *r5.7,* codant une protéine exportée de fonction inconnue, est nécessaire à la pleine virulence de *V. crassostreae* (Lemire et al. 2014). Chez *V. crassostreae*, ce gène est impliqué dans les mécanismes cytotoxicité dépendant du contact des hémocytes (Rubio et al. 2019). La protéine R5.7 n'est pas létale lorsqu'elle est injectée dans des huîtres, mais celle-ci est capable de restaurer la virulence lorsqu'elle est co-injectée avec un mutant délété de ce gène (Bruto et al. 2018). Ces résultats suggèrent que R5.7 interagit avec la surface externe du vibrio et/ou avec une cible cellulaire, **nous conduisant à émettre l'hypothèse que R5.7 facilite la fonction du T6SS en favorisant le contact vibrio-hémocyte.** Dans un tel type d'interaction, la délétion du plasmide ou la délétion du gène R5.7 devrait avoir un effet similaire sur la virulence. Cependant, nos résultats ont montré que la cytotoxicité du double mutant (ΔpGV ΔR5.7) est significativement plus atténuée que celle des simples mutants ΔpGV ou ΔR5.7 (Article 2, figure 6), laissant suggérer un effet additif de ces déterminants de virulence.

Dans cette étude j'ai réalisé l'analyse des structures des populations isolées à Brest et Sylt et j'ai confirmé, par Multilocus sequencing Typing (MLST), l'assignation taxonomique des souches de V. crassostreae. J'ai recherché la présence du plasmide pGV1512 dans la collection de V. crassostreae. J'ai réalisé les infections des huîtres ainsi qu'une partie des tests de cytotoxicité.

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2019) **00**(00), 00–00 doi:10.1111/1462-2920.14776

Selection of *Vibrio crassostreae* relies on a plasmid expressing a type 6 secretion system cytotoxic for host immune cells

Damien Piel,[1,2†] Maxime Bruto,[2†] Adèle James,[1,2†] Yannick Labreuche,[1,2] Christophe Lambert,[3] Adrian Janicot,[2] Sabine Chenivesse,[2] Bruno Petton,[1,3] K. Mathias Wegner,[4] Candice Stoudmann,[5] Melanie Blokesch[5] and Frédérique Le Roux[1,2*]

[1]*Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, Ifremer, F-29280, Plouzané, France.*

[2]*Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff cedex, France.*

[3]*Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 CNRS UBO IRD IFREMER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopôle Brest-Iroise – Rue Dumont d'Urville, F-29280, Plouzané, France.*

[4]*AWI - Alfred Wegener Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar und Meeresforschung, Coastal Ecology, Wadden Sea Station Sylt, 25992, Hafenstrasse 43,List, Germany.*

[5]*Laboratory of Molecular Microbiology, Global Health Institute, School of Life Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015, Lausanne, Switzerland.*

Summary

Pacific oyster mortality syndrome affects juveniles of *Crassostrea gigas* oysters and threatens the sustainability of commercial and natural stocks of this species. *Vibrio crassostreae* (*V. crassostreae*) has been repeatedly isolated from diseased animals, and the majority of the strains have been demonstrated to be virulent for oysters. In this study, we showed that oyster farms exhibited a high prevalence of a virulence plasmid carried by *V. crassostreae*, while oysters, at an adult stage, were reservoirs of this virulent population. The pathogenicity of *V. crassostreae* depends on a novel transcriptional regulator, which activates the bidirectional promoter of a type 6 secretion system (T6SS) genes cluster. Both the T6SS and a second chromosomal virulence factor, *r5.7*, are necessary for virulence but act independently to cause haemocyte (oyster immune cell) cytotoxicity. A phylogenetically closely related T6SS was identified in *V. aestuarianus* and *V. tapetis*, which infect adult oysters and clams respectively. We propose that haemocyte cytotoxicity is a lethality trait shared by a broad range of mollusc pathogens, and we speculate that T6SS was involved in parallel evolution of pathogen for molluscs.

Received 24 June, 2019; revised 1 August, 2019; accepted 5 August, 2019. *For correspondence. E-mail frederique.le-roux@sb-roscoff.fr; Tel. (+33) 2 98 29 56 47; Fax (+33) 2 98 29 23 24. †These authors contributed equally to this work.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

Introduction

The Pacific oyster mortality syndrome (POMS) affects juveniles of *Crassostrea gigas*, the main oyster species exploited worldwide. This syndrome occurs when the seawater temperature reaches 16 °C and is caused by multiple infections with an initial and necessary step relying on the infection of the haemocytes, the oyster immune cells, by the endemic ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) µVar (de Lorgeril *et al*., 2018). Viral replication leads to the host entering an immune-compromised state, evolving towards subsequent bacteraemia involving opportunistic bacteria such as *Vibrio* sp. Exploring POMS in an oyster-farming area from the French North Atlantic cost (Brest), we showed previously that the onset of the disease is associated with progressive replacement of diverse benign colonizers by the members of a phylogenetically coherent virulent population, *Vibrio crassostreae* (*V. crassostreae*; Lemire *et al*., 2015). The virulent population is genetically diverse but most members of the population can cause disease. We further demonstrated that *V. crassostreae* virulence depends on the presence of a large mobilizable plasmid, pGV1512 (hereafter named pGV for simplicity) although the mechanisms underpinning virulence remain to be elucidated (Bruto *et al*., 2017). Having observed that juvenile infection by *V. crassostreae* is recurrent in the POMS occurring in Brest (Bruto *et al*., 2017, de Lorgeril *et al*., 2018, Lemire *et al*., 2015), the questions arose whether oyster farms create conditions that lead to the

selection of this virulence plasmid and whether oysters (farmed or wild) represent a reservoir of virulent *V. crassostreae*. Indeed, it has been suggested that, during cold months, oysters act as a reservoir for *V. aestuarianus* (Goudenege *et al*., 2015, Parizadeh *et al*., 2018), a pathogen that primarily targets adult animals, and hence is not thought to be involved in POMS (Azema *et al*., 2017).

Pathogenic lifestyles are typically associated with horizontal acquisition of virulence genes (Le Roux and Blokesch, 2018), but pre-existing genomic features might be necessary for the acquisition and/or the functionality of these virulence genes (Shapiro *et al*., 2016). Indeed, we showed that a core gene, *r5.7*, which encodes an exported protein of unknown function, is necessary for full virulence in *V. crassostreae* (Lemire *et al*., 2015). This gene is widely distributed across the *splendidus* clade, a large group of closely related species (e.g. *V. splendidus*, *V. crassostreae* and *V. cyclitrophicus)*. The *r5.7* gene was acquired by the common ancestor of this group and co-diversified in some populations while being lost from non-virulent populations (Bruto *et al*., 2018). The widespread occurrence of *r5.7* across environmental *Vibrio* populations suggests that it has an important biological role but its frequency also indicates that this role is population-specific. Indeed, it was recently showed that *r5.7* is involved in population-specific mechanisms of haemocyte cytotoxicity (Rubio *et al*., 2019). In *V. crassostreae*, haemocyte cytotoxicity is contact-dependent and requires *r5.7*. The R5.7 protein is not lethal when injected into oysters, but this protein is able to restore virulence when co-injected with a mutant lacking the *r5.7* gene (Bruto *et al*., 2018). This suggests that R5.7 interacts with the external surface of *Vibrio* and/or with a cellular target. Whether *r5.7* and the virulence gene(s) encoded by the pGV plasmid act in concert or independently to promote *V. crassostreae* virulence and cytotoxicity was a goal of this study.

Here, we explored the distribution and functional interaction of two *V. crassostreae* virulence determinants: R5-7 and the plasmid pGV. *V. crassostreae* strains were collected from Brest (France), an area of intense oyster farming that is experiencing recurrent mortality events, and from Sylt (Germany) where a massive oyster invasion formed natural beds that have not yet suffered from *Vibrio*-related disease outbreaks (Reise *et al*., 2017). While the *r5.7* gene was detected at high frequency in *V. crassostreae*, the pGV plasmid was detected only in isolates from Brest and its presence correlated with virulence as assessed by experimental oyster infections. We further showed that, at a temperature of < 16 °C, oysters act as a reservoir of *V. crassostreae* strains. Exploring genetically the virulence determinants carried by the plasmid, we showed that a transcriptional regulator is necessary for pGV-mediated virulence. This regulator induces the expression of a molecular killing device called the type 6 secretion system (T6SS), which is also necessary for full virulence. RNA sequencing (RNAseq) followed by transcriptional fusion analysis led us to identify a bidirectional promoter within the T6SS genes cluster that is up-regulated by the transcriptional activator. Gene deletions and complementation experiments further confirmed the role of the *r5.7* and the T6SS in haemocyte cytotoxicity and indicated that they act in an additive manner. Finally, the identification of a similar type of T6SS in *V. aestuarianus* and *V. tapetis* led us to hypothesize a parallel evolution of mollusc pathogens.

Results

The virulence plasmid is widespread in Vibrio crassostreae *population occurring in oyster farms*

We previously hypothesized that the introgression of the virulence plasmid pGV into *V. crassostreae* might have been favoured by elevated host density in farming areas (Bruto *et al*., 2017). However, wild oyster beds can also reach high densities, as exemplified by the recent invasion of *C. gigas* oysters into the Wadden Sea (North Sea) (Reise *et al*., 2017). To date, no *Vibrio*-associated mass mortalities have been observed in this area, in contrast to observations in heavily farmed areas. We thus investigated the presence and frequency of the pGV plasmid in *V. crassostreae* strains sampled from Sylt. For this, 910 *Vibrio* strains were isolated from seawater fractions and oysters from Sylt, genotyped by partial *hsp60* gene sequencing and assigned to *Vibrio* populations as described previously (Supporting Information Fig. S1). Multilocus sequence typing further confirmed the taxonomic assignment of 47 *V. crassostreae* strains isolated from Sylt (Fig. 1, beige squares) as well as 42 isolates from Brest (Fig. 1, brown squares) (Supporting Information Table S1). The phylogenetic structure partitioned these strains into two clades representing the two locations. The first clade contained the majority of strains from Sylt (68%, 32 out of 47), while the second clade principally contained strains from Brest (80%, 34 out of 42). The pGV *repB* gene was never detected in isolates from Sylt and was mainly detected in strains from Brest that belonged to clade 2 (Fig. 1, plain blue circles). Only one clade 1 strain (8T5_11), originating from Brest, was found to be positive for *repB*. The presence of the plasmid was confirmed by sequencing the genome of the 8T5_11 strain (Supporting Information Table S2). We next explored the virulence of these isolates by experimental infection. When the 47 and 42 *V. crassostreae* strains isolated from Sylt and Brest, respectively, were injected individually into oysters, we observed that virulence was strongly correlated with the presence of the plasmid (50%–100% oyster mortalities, 24 h postinjection), supporting previous findings (Bruto

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

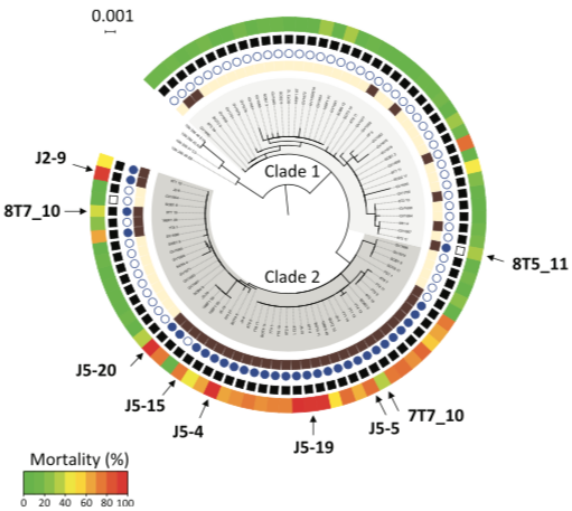


Fig. 1. The presence of the pGV plasmid is correlated with the geographic origin and virulence of *V. crassostreae* strains. Phylogenetic tree of 89 *V. crassostreae* isolates based on the *gyrB*/*rctB*/*rpoD* gene fragments. Dark/light shades of grey indicate the two clades within the species. Rings, from inside to outside, indicate (i) the geographic origin of the isolates (Brest, brown square; Sylt, beige square); (ii) the presence (blue circles) or absence (white circles) of pGV-like plasmids; (iii) the presence (black squares) or absence (white squares) of the *r5-7* gene and (iv) the mortality rate (colour gradient from green to red corresponding to 0%–100%) induced by individual strains 24 h after injection in oysters ($n = 20$). Experiments were performed in duplicate with two distinct oyster batches. The arrows highlight the virulent strains previously sequenced (Lemire *et al*., 2015) the non-virulent strain from clade 1 (8T5_11) and the two plasmid carrying but non-virulent strains from clade 2 (7T7_10 and 8T7_10).

et al., 2017). Only three strains carrying the plasmid (8T5_11, 7T7_10 and 8T7_10) induce a weak mortality (< 20%) (Fig. 1). Gene loss could explain this non-virulent phenotype. Indeed, comparative genomic analyses identified 44 genes that were absent from the 8T5_11 genome but were present in all of the sequenced virulent strains of *V. crassostreae* (Fig. 1 and Supporting Information Table S3). These 44 genes included *r5.7*, which is necessary for virulence and is located in a region that was previously identified as being specific to *V. crassostreae* (Lemire *et al*., 2015). However, the expression of *r5.7* from a plasmid had no effect on 8T5_11 virulence (Supporting Information Fig. S2). Furthermore, the *r5.7* gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) in the non-virulent strains 7T7_10 and 8T7_10 that carry the pGV plasmid (Fig. 1, black squares). Together these results indicate a role for pGV in virulence but additional genomic components appear to be necessary.

Oysters act as reservoir of the V. crassostreae *pathogen*

V. crassostreae infection has been recurrently associated with POMS events that affect juvenile oysters at a temperature threshold of 16 °C (Bruto *et al*., 2017, de Lorgeril *et al*., 2018, Lemire *et al*., 2015). In oyster farming areas such as Brest, roughly 700 tons of farmed oysters are introduced into a site where 10 000 tons of wild oysters reside (Pouvreau, personal communication). We thus asked whether oysters may asymptomatically host *V. crassostreae*, and hence play a role as a reservoir of this pathogen. Wild adult animals were collected from Brest at 12 °C and returned to the laboratory where they were transferred into a tank at 21 °C, a procedure previously shown to allow the development and transmission of oyster diseases (Petton *et al*., 2015a, Petton *et al*., 2015b, Petton *et al*., 2013). Mortality started at day 8, reached 90% after day 14 and was accompanied by the presence of *V. crassostreae* in the water tank and in the haemolymph of moribund animals (Supporting Information Fig. S3). The pGV plasmid was detected in 39 of 41 (95%) *V. crassostreae* strains isolated during this experiment. We noted that *V. aestuarianus* was not isolated on *Vibrio* selective media (TCBS, see *Materials and methods*), although it was detected by PCR in animal tissues, co-occurring or not with *V. crassostreae*. On the other hand, OsHV-1 was never detected in DNA extracted from the oysters. Contaminated seawater (CSW) was collected at day 11 from the tank containing the moribund wild oysters, and three-month-old specific-pathogen-free oysters (SPF juveniles) were exposed to this CSW at 21 °C (Petton *et al*., 2013). Mortalities of the juveniles started at day 3 and reached 100% after 6 days. No mortality occurred when SPF juveniles were kept in filtered seawater at the same temperature. *V. crassostreae* and *V. aestuarianus*, but not OsHV-1, were detected in moribund animal tissues. These results showed that wild adult oysters are reservoirs of virulent *V. crassostreae*, and increasing the temperature can induce disease symptoms.

A transcriptional regulator is necessary for pGV-mediated virulence and cytotoxicity

Having shown that oyster farming correlates with a high prevalence of the virulence plasmid, we next explored the virulence trait(s) encoded by pGV. A previous study identified a region within pGV (Px3, Fig. 2A) that is necessary for virulence in *V. crassostreae* (Bruto *et al*., 2017). Manual annotation of the genes within this region did not reveal any known virulence determinants, but a putative transcriptional regulator (labelled VCR9J2v1_750086 in J2-9 and hereafter named TF for simplicity) was identified. We assessed the importance of TF for virulence using a genetic knockout approach. Deletion of this gene (Δtf) resulted in a significant decrease in mortality after oyster injection (Fig. 2B). Constitutive expression of *tf* from a plasmid was sufficient to restore virulence both in the Δtf mutant and in a mutant lacking the complete Px3 region (ΔPx3). On the other hand, expression of *tf* in a pGV-cured strain did not result in

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

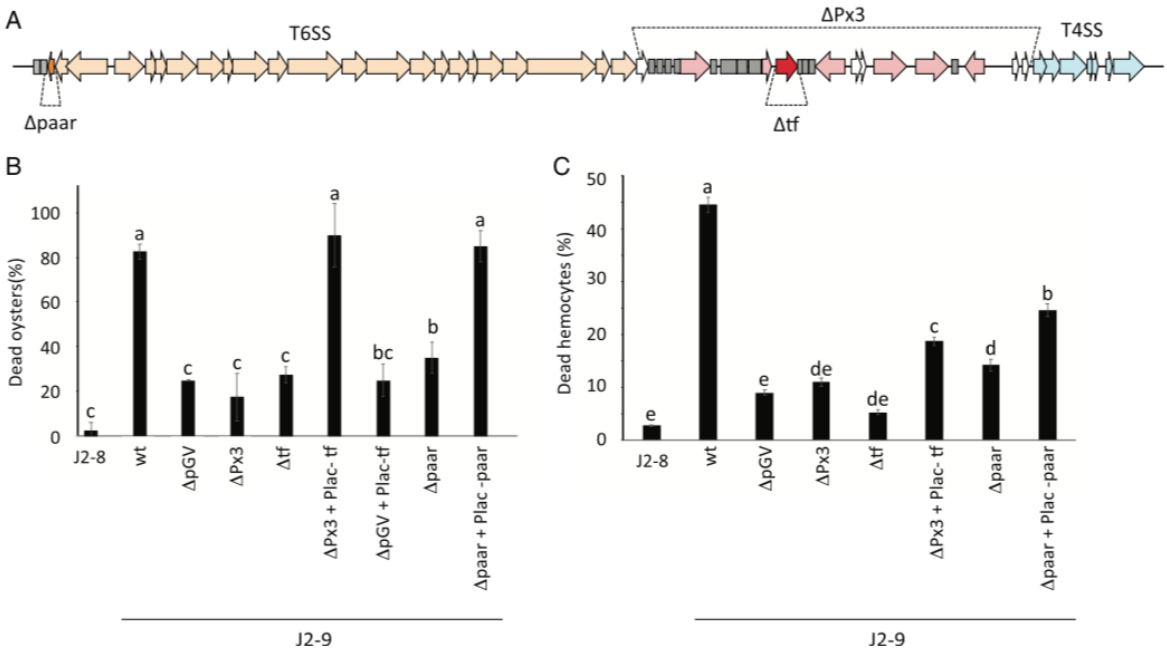


Fig. 2. Experimental assessment of pGV loci as virulence determinants. A. The indicated region or genes were deleted by allelic exchange, and the virulence of *V. crassostreae* J2-9 WT, mutants of specific loci (Δ) and complemented strains (+Plac_tf or *paar*) was compared by (B). B. Injection of strains (10^6 or 10^7 cfu depending on the cohort susceptibility, see *Materials and methods*) in 20 oysters and counting the percentage of mortalities after 24 h. C. Haemocyte cell viability evaluated by flow cytometry using a double-staining procedure (SYBR Green and PI, Sigma). Injection and cell viability assays were performed in duplicate and triplicate, respectively, and reproduced at least twice. A single experiment is represented here for each method. Letters indicate significant differences of mortality assessed by simultaneous tests for general linear hypotheses with Tukey contrasts ($p < 0.05$).

increased mortality (Fig. 2B). These results showed that the gene encoding the TF regulator is the only gene involved in Px3-mediated virulence but that additional determinant(s), carried by this plasmid, are involved in *V. crassostreae* virulence.

V. crassostreae virulence has been recently demonstrated to be intimately related with its cytotoxic effects on haemocytes (Rubio *et al*., 2019). Here, using flow cytometry, we observed that *V. crassostreae* effects on haemocyte viability require the presence of pGV. Deletion of the Px3 region or of the *tf* gene also led to an attenuation of cytotoxicity (Fig. 2C). Expression of the *tf* gene *in trans* complemented the ΔPx3 deletion with respect to haemocyte toxicity, mirroring the phenotype observed following oyster injection. This result was surprising as pGV was previously described as dispensable for *V. crassostreae* cytotoxicity (Rubio *et al*., 2019). This discrepancy might be explained by the different methodological approaches used to assess cell viability. In the previous study, bacteria were added to haemocyte monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of 50 and viability monitored for 15 h by a SYTOX green assay (Rubio *et al*., 2019). Here, the exposition of haemocytes to Vibrios was performed in a cell suspension at an MOI of 10 for 6 h before addition of SYBR Green I and propidium iodide (PI) to determine cell viability by flow cytometry. To verify that the plasmid is essential for toxicity, we thus incubated the haemocytes with a wild-type (WT) *V. crassostreae* strain (J2-9) or with a plasmid-cured strain (ΔpGV) at MOIs of 10 or 100 for 6 h. These tests revealed a dose-dependent effect in which low levels of the plasmid-cured strain were less cytotoxic, while high levels could overcome the plasmid deficiency (Supporting Information Fig. S4). Altogether, our results showed that the TF regulator controls plasmid-carried genes involved in haemocyte cytotoxicity.

The TF transcriptional regulator activates a T6SS

The *tf* gene encodes a putative transcriptional regulator of the AraC family that contains two domains: an N-terminal domain with putative Class I glutamine amidotransferase function and a C-terminal helix–turn–helix DNA binding domain (Supporting Information Fig. S5). To identify its target gene(s), we conducted an RNAseq analysis to compare the transcriptomes of a *V. crassostreae* derivative ΔPx3 constitutively expressing either the *tf* or the gene encoding the green fluorescent protein (*gfp*), as a control. Expression of *tf* resulted in significant changed mRNA levels for only 27 predicted protein-coding genes (Log2Fold change > 2; Supporting Information Table S4) of which

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

6 and 21 genes were down- and up-regulated, respectively, in a TF-dependent manner. All 21 up-regulated genes were located on the virulence plasmid and encode a putative T6SS (hereafter named $T6SS_{pGV}$) (Fig. 3). The induction of two of the $T6SS_{pGV}$ genes (*vipA* and *vgrG*, the first gene of each operon) by TF was further validated by RT-PCR in two biologically independent experiments (Supporting Information Fig. S6).

The $T6SS_{pGV}$ locus is organized into at least two operons with *vgrG*, a gene encoding unknown function and *paar* being expressed in the opposite direction compared with the rest of the $T6SS_{pGV}$ genes. Between these two operons, we predicted a bidirectional promoter (−10/−35 boxes on each operon site) as well as a putative TF target site that comprised a palindromic sequence of six nucleotides spaced by five nucleotides (Fig. 4). This motif was not identified at other loci within the *V. crassostreae* genome. To test whether the transcription factor (TF) and this putative promoter region were sufficient to drive the expression of adjacent genes in a heterologous host, we cloned the promoter between GFP- and DsRed-encoding genes in a replicative plasmid. Next, we transformed this reporter plasmid into an unrelated *Vibrio* species (in this case, *V. cholerae*), which had been engineered to chromosomally encode *tf* under the control of an arabinose-inducible promoter (P_{BAD}) (see *Materials and methods* for details). Induction of *tf* expression by arabinose resulted in the production of both GFP and DsRed demonstrating that the promoter was indeed bidirectional and activated by the TF (Fig. 4). Deletion of the palindromic sequence altered the induction capacity of TF, while inversion or mutation of one of the six nucleotide sites did not abrogate gene activation (Fig. 4). We therefore concluded that the TF drives T6SS expression in *V. crassostreae*.

The $T6SS_{pGV}$ is involved in virulence and haemocyte cytotoxicity

T6SSs are contact-dependent contractile nanomachines used by many Gram-negative bacteria as weapons against a variety of prokaryotic and eukaryotic organisms (Cianfanelli *et al*., 2016). Indeed, T6SSs allow bacteria to translocate a wide variety of toxic effectors into target cells. Formed by a minimum of 13 conserved 'core' components, T6SSs are made up of three large substructures: a trans-membrane complex, a baseplate and a tail composed of an inner tube formed by hexamers of haemolysin-coregulated protein encased within an outer VipA/VipB sheets complex and topped with a VgrG spike, which can be extended by a final tip formed by a PAAR-motif protein. T6SS effectors are frequently fused to C-termini of T6SS structural proteins, such as VgrG or PAAR (Shneider *et al*., 2013). However, *in silico* analysis did not predict any C-terminal extension of the VgrG or PAAR proteins of *V. crassostreae*. We also failed to identify any putative effector protein using a public database (http://db-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/).

A genetic approach was therefore used to test the importance of the $T6SS_{pGV}$ for *V. crassostreae* virulence. We had previously generated a knockout mutant that lacked this locus and observed no effect on virulence (Bruto *et al*., 2017). However, re-investigating this mutant, we identified an unexpected duplication of this region resulting in one deleted and one whole T6SS cluster. Several attempts to delete the *vgrG* or *vipA* genes were unsuccessful, repeatedly resulting in complete loss of the plasmid, suggesting that these mutations come at a cost for the bacteria. However, deletion of the T6SS *paar* gene was successful (Δ*paar*) and led to decreased virulence (Fig. 2A). Complementation by

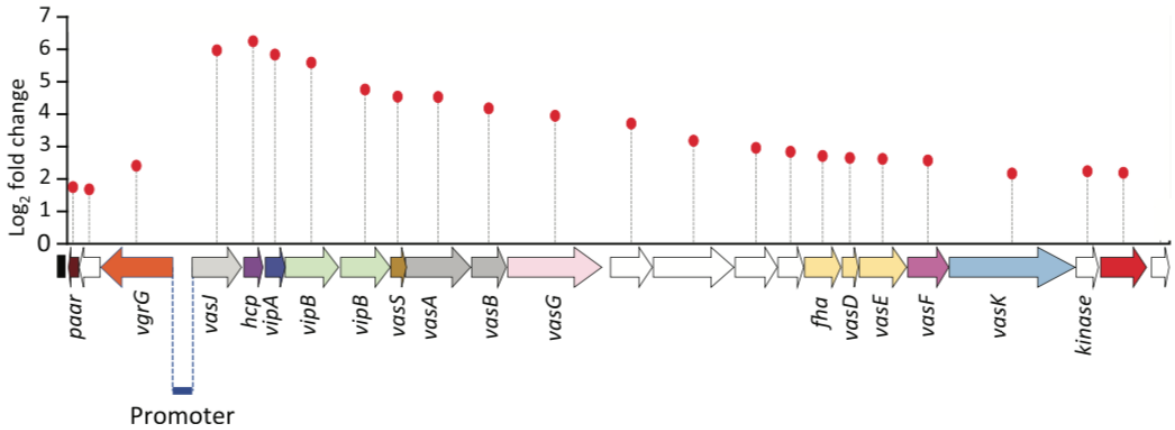


Fig. 3. The identified TF activates both $T6SS_{pGV}$ operons. RNAseq analyses revealed that the expression of *tf* resulted in changed mRNA levels (Log2Fold change on the y-axis) of 21 genes belonging to the $T6SS_{pGV}$ cluster (x-axis). The $T6SS_{pGV}$ locus is organized into two putative operons expressed in opposite directions.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

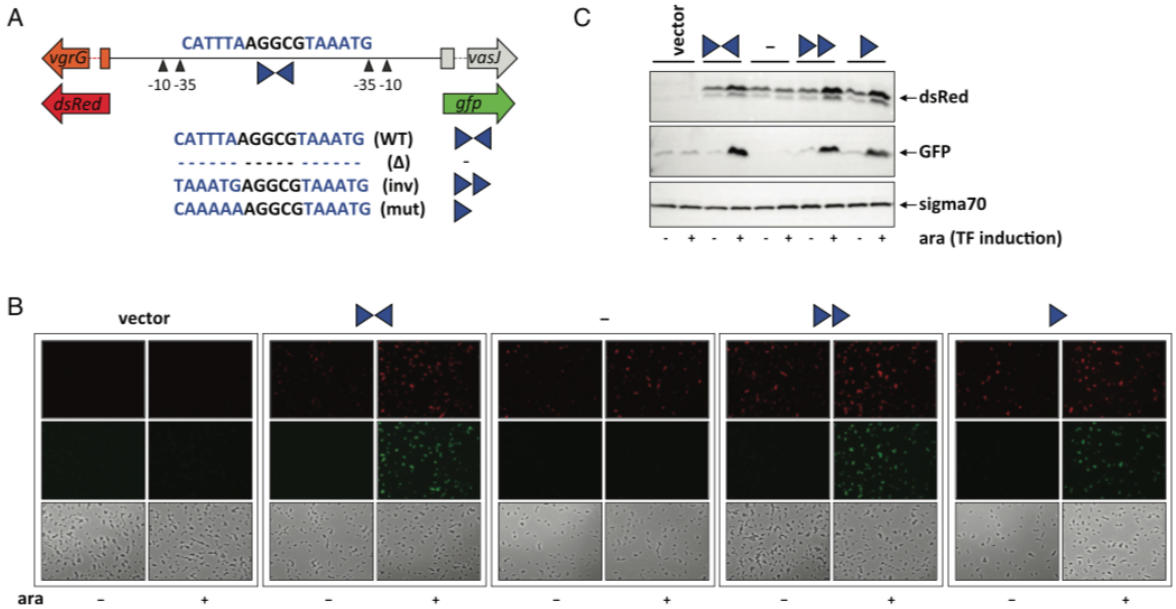


Fig. 4. The identified TF activates a bidirectional promoter. The putative bidirectional promoter containing a palindromic sequence (shown in the middle in A) was cloned between *gfp* and *dsRed* in a replicative plasmid, which was used to transform *V. cholerae* strain A1552-TnTF. This strain carries *tf* behind an arabinose inducible promoter within a miniTn7 transposon. Induction of the TF by arabinose resulted in the production of both GFP and DsRed as observed by epifluorescence microscopy (B) or Western blotting (C).

constitutively expressing *paar in trans* restored the virulence potential to similar levels as observed for the WT.

Having demonstrated a role for the T6SS in virulence, we next explored its cellular target. In many bacterial models, T6SSs are used to kill competing bacteria (Cianfanelli *et al*., 2016). We thus asked whether *V. crassostreae* that constitutively expressed *tf* would be able to kill bacteria in an *in vitro* killing assay (Borgeaud *et al*., 2015). When the *tf*-expressing strain was used as a predator and *E. coli*, *V. cholerae* or a collection of 40 diverse *Vibrio* strains isolated from oysters were used as prey, we did not observe any killing under the tested conditions. The T6SS has also been demonstrated to mediate toxicity for eukaryotic cells. For example, non-pandemic *V. cholerae* exhibits T6SS-mediated cytotoxicity towards macrophages and the soil amoeba *Dictyostelium discoideum* (Pukatzki *et al*., 2007), while the aquatic amoeba *Acanthamoeba castellanii* is not affected (Van der Henst *et al*., 2018). Here, we observed that the *V. crassostreae* Δ*paar* mutant has decreased cytotoxicity towards haemocytes compared with the WT and that expression of the *paar* gene *in trans* partially restored cytotoxicity (Fig. 2C). Our results therefore suggest a critical role for the virulence plasmid, TF and $T6SS_{pGV}$ in *V. crassostreae*-mediated killing of oyster immune cells and, therefore, pathogenicity towards this animal host.

Looking at the distribution of the $T6SS_{pGV}$ in publicly available *Vibrio* genomes, we found that closely related loci are present in *V. aestuarianus* (11/11 genomes) and *V. tapetis* (1/1 genome), which are pathogens of adult oysters and clams respectively (Travers *et al*., 2015). Overall, the synteny and amino acid identities between core components of the T6SSs were high with the exception of genes localized after the *vasK* gene that could be candidate effectors (Fig. 5). In *V. aestuarianus*, a specific gene (VIBAEv3_A30819 in the strain 02-041) encodes a protein with weak sequence identity (25%) with a T3SS effector from *Bordetella bronchiseptica* named BteA. This secreted protein has been reported to inhibit phagocytosis by macrophage and induce necrosis through an actin cytoskeleton-signalling pathway (Kuwae *et al*., 2016). In the $T6SS_{pGV}$, a specific gene (VCRJ2v1_750073 in strain J2-9) encodes a protein with 38% similarity and 13% identity to the C-terminal and N-terminal domains of an insecticidal delta endotoxin found in *Bacillus thuringiensis*. Unfortunately, deletion of this gene in *V. crassostreae* also resulted in loss of pGV preventing further functional analysis. An ortholog of VCRJ2v1_750073 in *V. tapetis* has been pseudogenized, potentially leading to its functional inactivation. On the other hand, a second, species-specific gene in the *V. tapetis* T6SS encodes a protein with only 60% similarity and 29% identity within 45 amino acids of the central domain of nigritoxin, a toxin for crustaceans and insects (Labreuche *et al*., 2017). Hence, while annotation and localization of these genes suggest a role as T6SS effectors for the three pathogens, the formal demonstration of their function remains to be done.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

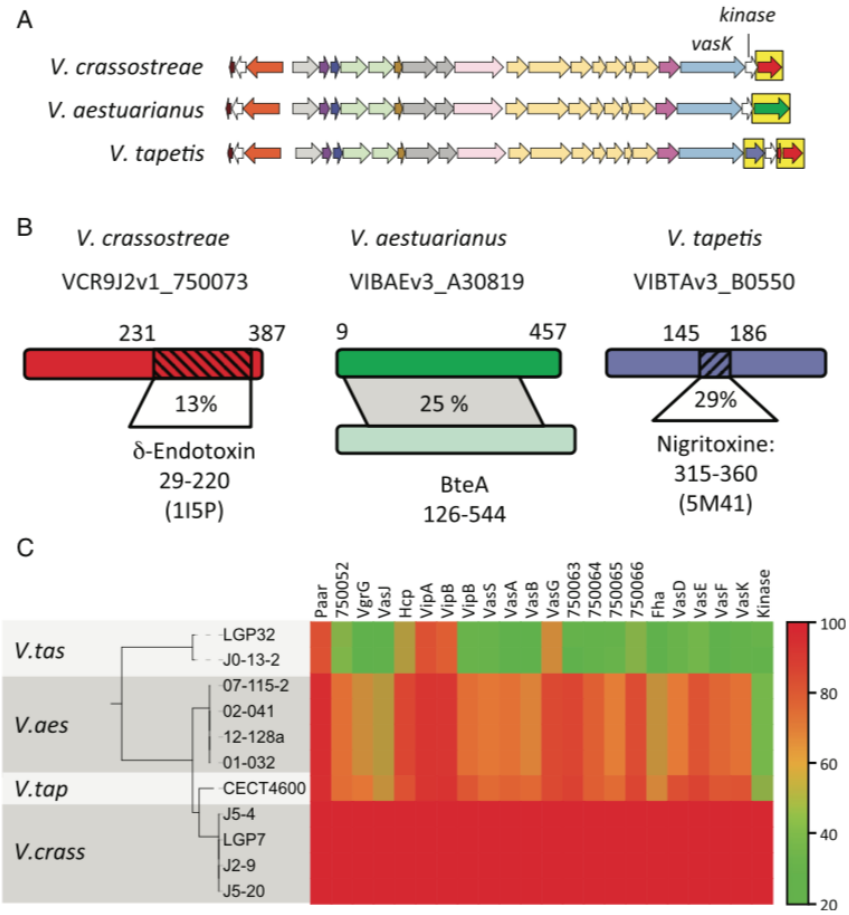


Fig. 5. Comparative genomic of *V. crassostreae*, *V. aestuarianus* and *V. tapetis* T6SS and putative effectors.
A. Synteny of the T6SS in the three strains compared. Genes with the same colour code are homologous (> 40% amino acid identity). Specific genes in each T6SS are shaded in yellow and described in (B).
B. Schematic representation of the sequence identity or structural similarity of the putative effector of *V. crassostreae* $T6SS_{pGV}$ in strain J2-9, *V. aestuarianus* 02–041 and *V. tapetis* CECT4600. Structural similarities were identified with Phyre2.
C. Phylogeny based on a concatemer of T6SS homologues found in *V. crassostreae* (J5-4; LGP7; J2-9; J5-20), *V. tapetis* (CECT4600), *V. aestuarianus* (07-115; 02-041; 12-128a; 01-032) and *V. tasmaniensis* (LGP32; J0-13). The matrix shows the conservation of the different T6SS homologues with $T6SS_{pGV}$ as a reference. A scale bar indicating amino acid sequence identity is located to the right of the matrix.

The $T6SS_{pGV}$ and R5.7 protein act independently to mediate V. crassostreae *cytotoxicity*

We showed in a previous study (Bruto *et al.*, 2018) that *V. crassostreae* evolution as pathogen involved sequential acquisition of virulence genes, including (i) acquisition of the *r5.7* gene, which encodes an exported protein that may be involved in the contact-dependant cytotoxicity (Rubio *et al.*, 2019) and (ii) more recent acquisition of $T6SS_{pGV}$ that, in our experimental design, appeared necessary for the killing of host immune cells. It is therefore tempting to hypothesize that these two virulence traits work in concert to mediate cytotoxicity, R5.7 potentially favouring attachment of the vibrio to the haemocyte and facilitating anchorage of the $T6SS_{pGV}$, which then injects a toxic effector into the cell. Under such a hypothesis, deletion of the *r5.7* gene (Δ*r5.7*) or curing of the plasmid (ΔpGV) should decrease the cytotoxicity of *V. crassostreae* to a similar level to that observed with the double mutant ΔpGV1512Δ*r5.7*. However, as we observed that the cytotoxicity of the double mutant was significantly more attenuated than that of the single mutants (Fig. 6), we suggest that these virulence factors act additively rather than being functionally connected.

Discussion

In recent years, a syndrome affecting juveniles of *C. gigas* (POMS) has become panzootic, being observed in all coastal regions of France and numerous other countries worldwide, threatening the long-term survival of commercial and natural stocks of oysters (Le Roux *et al.*, 2015). A study recently demonstrated that this syndrome results from an intense replication of the oyster herpes virus OsHV-1 μVar, creating an immune-compromised state that permits secondary infections by opportunistic bacteria (de Lorgeril *et al.*, 2018). An unresolved question, however, is whether diverse bacterial species can be considered to be opportunistic or whether specific bacterial species cooperate to induce this syndrome. Here, we provide evidence that *V. crassostreae* is a

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

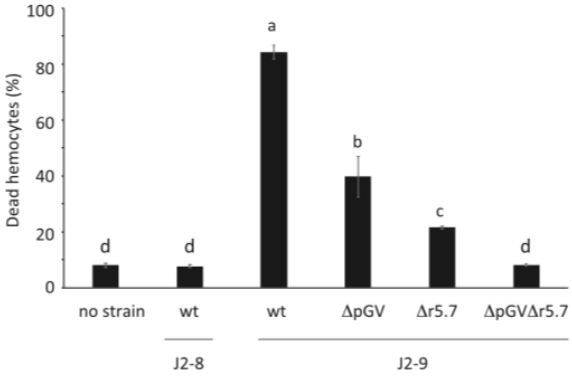


Fig. 6. Cytotoxic activities of T6SS and R5.7. The cytotoxicity of *V. crassostreae* wt. or mutant strains (Δ) was assessed by flow cytometry using a double-staining procedure. Control haemocytes were either incubated in the absence of any bacteria or with a non-virulent strain (J2-8). The experiment was performed in triplicate and reproduced twice. A single experiment is represented here. Letters indicate significant differences of mortality assessed by simultaneous tests for general linear hypotheses with Tukey contrasts ($P < 0.05$).

major player of this syndrome. First, we propose that the recurrent detection of *V. crassostreae* in an area affected by POMS might indicate that it originates from a reservoir in oysters. Second, a high prevalence of a virulence plasmid is observed in oysters affected by POMS, suggesting that strains carrying this plasmid have a selective advantage. Third, cellular characterization of virulence traits sequentially acquired by *V. crassostreae* revealed a lethal activity on haemocytes by distinct pathways.

Oyster-associated Vibrios have been previously analysed in the context of a metapopulation framework, i.e. by considering potential overlap or differences in populations collected from spatially and temporally distinct habitats, which are connected by dispersal (Bruto *et al*., 2017). This study showed that *V. crassostreae* was abundant in diseased animals while nearly absent in the surrounding seawater, suggesting that its primary habitat is not the water column. Potential alternative reservoirs for *V. crassostreae* at temperature < 16 °C were still undetermined. Here, we showed that oysters that reside in farming areas year-round asymptomatically host *V. crassostreae* and hence potentially serve as a pathogen reservoir. An increase in temperature triggered active multiplication of *V. crassostreae* leading to a sufficiently high bacterial load and/or virulence state allowing the pathogen to colonize and infect juvenile oysters. As *V. aestuarianus* was detected in both adult and the juvenile oysters, it is impossible to discriminate the respective roles of *V. crassostreae* and *V. aestuarianus* in the induction of oyster mortality in the present experiment. It should be noticed, however, that *V. aestuarianus* virulence seems to be restricted to the adult stage of oyster (Azema *et al*., 2017). Importantly, OsHV-1 μVar was never detected in our experiments, confirming previous observations that infection of juveniles can occur in the absence of OsHV-1μVar (Petton *et al*., 2015b). Hence, our present results suggest that oyster mortality syndrome might have different aetiologies. It remains to be determined how temperature acts on *V. crassostreae* infective status. In the context of global warming, how temperature influences the virulence of these pathogens as well as oyster resistance or resilience is a major concern to predict sustainability of commercial and natural stocks of this species.

Another argument strengthening a role for *V. crassostreae* in oyster juvenile mortality syndrome is the high frequency of the pGV plasmid in farming areas that are affected by the syndrome. Although we were able to isolate *V. crassostreae* from oysters in Sylt, none of these isolates were virulent in an infection assay. This observation is consistent with the absence of the pGV plasmid in these isolates and strengthens our hypothesis that the introgression of pGV into the *V. crassostreae* population has played a major role in its emergence as a pathogen (Bruto *et al*., 2017). By identifying virulence traits of *V. crassostreae* encoded by this plasmid, i.e. the $T6SS_{pGV}$ and its transcriptional activator TF, we deciphered a mechanism that increases haemocyte cytotoxicity of *V. crassostreae* worsens oyster disease. In the future, identification of the effector protein(s) of the $T6SS_{pGV}$ should help decipher its effect on haemocytes. In addition, exploring the role of the T6SSs and its effector(s) in the virulence of *V. aestuarianus* and *V. tapetis* may support a parallel evolution from harmless to pathogenic states of these mollusc pathogens.

We also demonstrated that the T6SS and R5.7 are not co-dependent for their function, ruling out the hypothesis that R5.7 acts as a facilitator of T6SS-mediated injection of a toxic effector into haemocytes. Within the *splendidus* clade, a few populations have lost the *r5.7* gene and are not able to kill oysters (Bruto *et al*., 2018). When infecting the host, these non-virulent strains are highly controlled by cellular (phagocytosis) and humoral (antimicrobial peptides, reactive oxygen species and heavy metals) immunity mediated by the haemocytes (Rubio *et al*., 2019). However, several *Vibrio tasmaniensis* (*V. tasmaniensis*) strains isolated from diseased oysters (Le Roux *et al*., 2009, Lemire *et al*., 2015) that do not carry the *r5.7* gene were able to induce mortalities when injected to oysters. Compared with *V. crassostreae*, the haemocyte cytotoxicity of these strains was demonstrated to be dependent on phagocytosis and required a distinct T6SS localized on the chromosome 1 of the strain LGP32 ($T6SS_{Chr1\text{-}LGP32}$, Rubio *et al*., 2019) (Fig. 5C). Consideration of these data led to the hypothesis that R5.7 may act as an inhibitor of phagocytosis and *V. tasmaniensis* secondary evolved as pathogen by the acquisition of $T6SS_{Chr1\text{-}LGP32}$ that is active at the intracellular stage as described for the *V. cholerae* T6SS (Ma *et al*., 2009). Alternatively, the acquisition of a $T6SS_{Chr1\text{-}LGP32}$ that functions exclusively during the

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

intracellular stage may have further selected for *r5.7* loss. Hence, in addition to Rubio *et al*.'s article (Rubio *et al*., 2019), the present study suggests multiple evolutionary scenarios leading to the emergence of pathogenic populations with common and specific virulence traits converging on a common objective: killing of the major actors of the oyster immune response. Finally, our results confirm the functional diversity of the T6SS nanomachine and its effectors, acting against bacterial competitors (Unterweger *et al*., 2014) against amoeba or phagocytic cells at an intracellular stage (Ma *et al*., 2009) or directly by contact with the target eukaryotic cell.

Experimental procedures

Isolation of bacteria and gene sequencing

In July 2015 and 2016, 24 live oysters, together with surrounding seawater (temperature 18 °C), were collected from Sylt. To collect zooplankton, large phytoplankton and organic particles, a 50 l sample was filtered through a 60 μm plankton net and the collected material was subsequently washed with sterile seawater. Small organic particles and free-living bacterial cells were collected from 2 l water samples pre-filtered through the 60 μm plankton net and sequentially filtered through 5, 1 and 0.22 μm pore size filters. These filtrates were directly placed onto *Vibrio* selective media (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS). The zooplankton and oyster tissues were ground in sterile seawater (10 ml/g of wet tissue) and streaked onto TCBS. About 150 colonies per seawater fraction and 300 colonies per oyster tissue sample were randomly picked and re-streaked on TCBS first and subsequently on Zobell agar (15 g/l agar, 4 g/l bactopeptone and 1 g/l yeast extract in artificial seawater, pH 7.6). All isolates were genotyped by partial *hsp60* gene sequencing and stored in 10% dimethylsulphoxide (DMSO) at −80 °C. A total of 910 *hsp60* sequences were obtained from the two samplings performed in Sylt. This set of data was complemented with 719 *hsp60* sequences obtained from previous samplings at Brest in 2014 (Bruto *et al*., 2017) and 2016 (seawater temperature above 18 °C).

Strains, plasmids and culture conditions

The strains used in this study are described in Supporting Information Table S5. *Vibrio* isolates were grown at 20 °C in Zobell broth or agar, Luria-Bertani (LB) or LB-agar (LBA) + 0.5 M NaCl. *Vibrio cholerae*, strain A1552, was grown in LB at 30 °C. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB or on LBA. Chloramphenicol (5 or 25 μg/ml for *Vibrio* and *E. coli* respectively), spectinomycin (100 μg/ml), kanamycin (75 μg/ml for *V. cholerae*), thymidine (0.3 mM) and diaminopimelate (0.3 mM) were added as supplements when necessary. Induction of the P_{BAD} promoter was achieved by the addition of 0.2% L-arabinose to the growth media and, conversely, was repressed by the addition of 1% D-glucose where indicated.

Vector construction and mutagenesis

All plasmids used or constructed in the present study are described in Supporting Information Table S6. Deletion of selected regions or genes was performed by allelic exchange using the pSW7848T suicide plasmid (Le Roux *et al*., 2007, Val *et al*., 2012). To this end, two 500 bp fragments flanking the target region or gene were amplified (see primer details in Supporting Information Table S7), assembled by PCR and cloned into pSW7848T as previously described (Lemire *et al*., 2015). The suicide plasmid was then transferred by conjugation from *E. coli* as donor to *Vibrio* as recipient. Subsequently, the first and second recombinations leading to pSW7848T integration and elimination were selected on Cm/glucose and arabinose containing media respectively. For the complementation experiments, genes were cloned into the Apa1/Xho1 (*paar*) or EcoR1/Xho1 (tf) sites of the pMRB plasmid, which is stable in *Vibrio* spp. (Le Roux *et al*., 2011), resulting in constitutive expression from a P_{lac} promoter. Conjugations between *E. coli* and *Vibrio* were performed at 30 °C as described previously (Le Roux *et al*., 2007). The T6SS intergenic region (i.e. putative promoter region) was PCR amplified, digested and cloned into *Sma*I and *Stu*I sites in pBR-GFP_dsRed (Lo Scrudato and Blokesch, 2012) before being transferred to the *V. cholerae* strain A1552 carrying the arabinose-inducible *tf* on a mTn7 transposon. Mutagenesis of the palindromic region was performed by PCR assembly as described earlier (Matsumoto-Mashimo *et al*., 2004).

Fluorescence microscopy

V. cholerae cells were back-diluted (1:100) from an overnight culture and grown for 2 h at 30 °C in LB medium containing kanamycin. At this point, 0.2% arabinose was added to the culture where indicated and the growth was continued for 2 h before the bacteria were mounted onto agarose pads (in 1% PBS) and imaged with a Plan-Apochromat 100×/1.4 Ph3 oil objective using a Zeiss Axio Imager M2 epifluorescence microscope. Image acquisition occurred with the Zeiss AxioVision software. Depicted images are representative of three independent biological replicates.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

SDS-PAGE and Western blotting

V. cholerae cells were grown for 5 h at 30 °C in LB medium with or without 0.2% arabinose supplementation (after 3 h of growth) to induce *tf* in the respective strains. Cells were lysed by resuspension in 2× Laemmli buffer (100 μl of buffer per OD_{600} unit of 1) and boiling at 95 °C for 15 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (10% resolving gels) and blotted onto PVDF membranes. Detection of proteins was carried out as described (Lo Scrudato and Blokesch, 2012) using primary antibodies against GFP (Roche, #11814460001; diluted 1:5 000) and mCherry (BioVision, #5993-100; diluted 1:5 000). Anti-mouse-HRP (Sigma, #A5278; diluted 1:20 000) and anti-rabbit-HRP (Sigma, #A9169; diluted 1:20′000) were used as secondary antibodies. An anti-RNA Sigma 70-HRP conjugate (BioLegend, #663205; diluted 1:10 000) was used to validate equal loading. Lumi-Light^{PLUS} (Roche) served as an HRP substrate, and the signals were detected using a ChemiDoc XRS+ station (BioRad). Western blots were performed three independent times with comparable results.

Experimental infections

Animals. Three-month-old SPF oysters were descendants of a pool of 100 genitors that were produced in a hatchery under highly controlled conditions to minimize the influence of genetic and environmental parameters that could affect host sensitivity to the disease (Petton *et al*., 2015a, Petton *et al*., 2015b, Petton *et al*., 2013). These animals were used for experimental infections by immersion (see below) or by intramuscular injections of bacteria into the adductor muscle. Triploid adult oysters (24–30 months old) were provided by a local oyster farm (Coïc, Pointe du Château, Logonna-Daoulas, France) and were used to collect haemolymph for cytotoxicity assays. Wild adult *C. gigas* oysters ($n = 50$) were collected from the Bay of Brest (Pointe du Château, 48° 20′ 06.19″ N, 4° 19′ 06.37″ W) in April 2019 (seawater temperature 12 °C).

Disease monitoring in wild adult oysters. After sampling in the Bay of Brest, wild adult oysters were immediately returned to the laboratory (Station Biologique de Roscoff, Roscoff, France). Upon arrival, the animals were first cleaned using a bristle brush and briefly rinsed to remove sand, sediments and other shell debris before being placed in a 300 l tank under static conditions (no change of seawater) with aerated 5 μm filtered seawater at 21 °C. Mortality was recorded daily for 14 days. Vibrios were isolated daily from the tank seawater (100 μl) or from the haemolymph of moribund animals (10 μl) by plating onto selective media (TCBS; Difco, BD, France). Randomly selected colonies were mixed into 20 μl of molecular biology grade water and heated using a thermal cycler (2720 thermal cycler, Applied Biosystems) at 98 °C for 10 min and stored at −20 °C for PCR testing.

Infection by immersion in contaminated seawater. Contaminated seawater containing the oyster-shed bacteria was obtained by sampling the seawater from the 300 L tank in which wild adult oysters had been held for 14 days. SPF oysters were transferred to aerated aquaria (20 oysters per 2.5 l aquarium) filled with either 1 l CSW or with fresh 5 μm filtered seawater as a control. Mortality was recorded daily for 6 days, and moribund animals were removed and analysed for the presence of *V. crassostreae*, *V. aestuarianus* and OsHV-1.

Nucleic acid extraction and polymerase chain reaction

Haemolymph of moribund wild adult oysters was withdrawn from the adductor muscle using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle, centrifuged for 5 min at 5000 rpm and the cell pellet kept at −20 °C until further use. In the case of three-month-old juvenile oysters, the whole wet body of dead animals was crushed in marine broth (1 mg/ml) using a TissueLyser II (Qiagen). Genomic DNA was purified from homogenized oyster tissues or haemocyte cell pellets by resuspension in lysis buffer (NaCl 0.1 M, pH 8 EDTA 0.025 M, SDS 1%, proteinase K 100 μg/ml) for 16 h (56 °C) followed by phenol:chloroform:isoamyl alcohol (Sigma-Aldrich, #77617) extraction.

The primer pairs and PCR conditions used for the detection of *V. crassostreae* (de Lorgeril *et al*., 2018), *V. aestuarianus* (Saulnier *et al*., 2010) and the herpes virus OsHV-1 (Martenot *et al*., 2010) have been described elsewhere. PCRs were performed on 300 ng oyster DNA for oyster pathogen detection or on 1 μl cell lysate obtained from *Vibrio* randomly picked on TCBS for *V. crassostreae* identification.

Bacterial virulence determination by intramuscular injection

Several cohorts of SPF-oysters were used to perform experimental infections by intramuscular injections of bacteria into the adductor muscle. Because the susceptibility to bacterial infection of these cohorts may have varied over the course of this study depending on biotic (size) and abiotic (temperature) parameters, each cohort was systematically submitted to an experimental infection by injection with three different concentrations (1×, 0.1× and 0.01×) of the pathogenic *V. crassostreae* wt. strain J2-9 used here as a reference. The bacterial concentration determined to induce between 50%–90% mortality was subsequently used on the considered cohort to evaluate

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

bacterial virulence. Bacteria were grown under constant agitation at 20 °C for 24 h in Zobell media; 100 μl of the culture (10^6 or 10^7 colony-forming unit, cfu, depending on the susceptibility of the considered cohort) was injected intramuscularly into oysters. The bacterial concentration was confirmed by conventional dilution plating on Zobell agar. After injection, the oysters were transferred to aquaria (20 oysters per 2.5 l aquarium) containing 1 l of aerated 5 μm filtered seawater at 20 °C, and kept under static conditions. Experiments were performed in duplicate and repeated at least once. Mortality was assessed after 24 h.

In vitro *cytotoxicity assays*

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscle through a notch previously ground in the oyster shell using a 1 ml plastic syringe fitted with a 25-gauge needle. After bleeding, syringes were maintained on ice and individually controlled by microscope observation to retain only haemolymph that was free of contaminating particles (sperm, ovocytes and small debris). Selected samples were filtered through an 80 μm mesh to eliminate aggregates or large pieces of debris (to avoid clogging of the flow cytometer flow cell) and pooled.

In order to adjust the bacteria/haemocyte ratio, haemocyte and bacterial cell concentrations were measured by incubating 300 μl of the considered suspension (diluted at 10–2 in filtered sterile seawater, FSSW, in the case of bacterial suspensions) with SYBR Green I (DNA marker, Molecular Probes, 10 000× in DMSO) at 1× final concentration, in the dark at room temperature for 10 min before flow-cytometric analysis (FACSVerseTM, Becton Dickinson, CA). Haemocytes or bacterial cells were detected on the FITC detector (527/32 nm) of the flow cytometer and their concentration calculated using the flow rate value given by the Flow-Sensor device integrated to the flow cytometer.

After haemocyte counting, the haemolymph pool was divided into 200 μl subsamples maintained on ice. Each subsample received 200 μl of the different bacterial suspensions (WT or derivatives) at an MOI of 10:1 or 200 μl of FSSW as a control. Each condition was tested in three replicates, and the experiment was performed twice. Tubes were maintained at 18 °C for 5.5 h. Then, SYBR Green I and PI (Sigma-Aldrich) were added to each tube at final concentrations of 1× and 10 $\mu g\, mL^{-1}$, respectively, and incubation was continued for another 30 min (6 h total incubation time): PI only permeates haemocytes that lose membrane integrity and are considered to be dead cells, whereas SYBR Green I permeates both dead and living cells. SYBR Green and PI fluorescence were measured on the FITC detector (527/32 nm) and on the PerCP-Cy5-5 detector (700/54 nm) respectively. Results are expressed as percentage of dead haemocytes.

Genome sequencing, assembly and annotation. The 8T5-11 strain was sequenced by the JGI using illumina HiSeq2000 technology and 300bp library. Contigs were assembled *de novo* using Spades (Bankevich *et al*., 2012). Computational prediction of coding sequences together with functional assignments was performed using the automated annotation pipeline implemented in the MicroScope platform (Vallenet *et al*., 2013). Some gene annotations were manually curated using InterPro, FigFam, PRIAM, COGs, PsortB, TMHMM and synteny group computation. General features of the genome sequenced in the present study are presented Supporting Information Table S2.

In silico *analyses*

Species trees were reconstructed based on an MLST containing three markers for *V. crassostreae* isolates phylogeny (*gyrB*, *rctB* and *rpoD*). Nucleotide sequences were aligned with muscle and concatenated using Seaview (Gouy *et al*., 2010). Phylogenetic reconstruction was done using RAxML (Stamatakis, 2006) on this concatemer with the GTR model. Tree visualization was performed with iTOL (Letunic and Bork, 2011).

RNAseq experimentation

The *Vibrio* strains J2-9 ΔPx3 constitutively expressing *tf* or *gfp* from a plasmid (pMRB) were grown in LB-NaCl. Bacteria were sampled at OD 0.3, 0.6 and 1.0, and RNA extraction was performed using TRIzol reagent and following manufacturer's instructions (Invitrogen). Total nucleic acids were quantified based on absorption at 260 nm, and RNA integrity was verified by gel electrophoresis. DNA was removed by DNase I digestion using the Turbo DNA-free kit (Ambion). RNAs from the three OD conditions were pooled. The experiment was performed three times. Directional cDNA libraries were constructed with the ScriptSeq RNA-Seq Library Preparation Kit (Illumina). Sequencing was done with the NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (Illumina) on a NextSeq 500 Mid (Illumina) by the 'Plateforme de Séquençage haut-débit' at I2BC-UMR9198. Data treatment and mapping onto *V. crassostreae* J2-9 reference genome was performed with the TAMARA pipeline hosted by the MAGE platform (http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/transcriptomic/NGSProjectRNAseq.php?projType=RNAseq).

Statistical analyses

Survival of oysters after injection with the different genetic construct was analysed by binomial generalized linear mixed models with logit link function taking the number of survivors versus the number of dead oysters as response

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

variable and strain identity as predictor. Owing to the high number of cells analysed in flow cytometry assays of haemocyte mortality, we used linear mixed models with the proportions of alive and dead cells as response variable. Experimental trial was added as a random to account for differences between independent experiments when repeated trials were performed. To identify pairwise difference between strains, we used simultaneous tests for general linear hypotheses implemented in the multcomp package (Hothorn *et al*., 2008) applying Tukey contrasts.

Acknowledgements

We are grateful to Mark Cock (Marine station of Roscoff) for his thoughtful comments and English editing, which improved the manuscript. We thank the staff of the station Ifremer Argenton and Bouin, the ABIMS and CRBM (Roscoff) and LABGeM (Evry) platforms for technical assistance. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE32-0008-01 « REVENGE ») to FLR, Ifremer and the Region Bretagne to DP and AJ. The 8T5-11 genome sequence data were produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute http://www.jgi.doe.gov/ in collaboration with the user community. MBI is a Howard Hughes Medical Institute (HHMI) International Research Scholar (Grant #55008726), and the work in her group was supported by a Swiss National Science Foundation Scientific Exchange Grant (IZSEZ0_181044) and an ERC Consolidator Grant from the European Research Council (724630-CholeraIndex).

References

Azema, P., Lamy, J.B., Boudry, P., Renault, T., Travers, M. A., and Degremont, L. (2017) Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet Sel Evol* **49**: 23.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., *et al*. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455–477.

Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scrignari, T., and Blokesch, M. (2015) The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* **347**: 63–67.

Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivesse, S., Alunno-Bruscia, M., *et al*. (2017) *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* **11**: 1043–1052.

Bruto, M., Labreuche, Y., James, A., Piel, D., Chenivesse, S., Petton, B., *et al*. (2018) Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *ISME J* **12**: 2954–2966.

Cianfanelli, F.R., Monlezun, L., and Coulthurst, S.J. (2016) Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends Microbiol* **24**: 51–62.

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., *et al*. (2018) Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* **9**: 4215.

Goudenege, D., Travers, M.A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., *et al*. (2015) A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ Microbiol* **17**: 4189–4199.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**: 221–224.

Hothorn, T., Bretz, F., and Westfall, P. (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* **50**: 346–363.

Kuwae, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y., and Abe, A. (2016) Btea secreted from the *Bordetella bronchiseptica* type III secetion system induces necrosis through an actin cytoskeleton signaling pathway and inhibits phagocytosis by macrophages. *PLoS One* **11**: e0148387.

Labreuche, Y., Chenivesse, S., Jeudy, A., Le Panse, S., Boulo, V., Ansquer, D., *et al*. (2017) Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. *Nat Commun* **8**: 1248.

Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a Vibrio splendidus mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counter-selectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777–784.

Le Roux, F., and Blokesch, M. (2018) Eco-evolutionary dynamics linked to horizontal gene transfer in Vibrios. *Annu Rev Microbiol* **72**: 89–110.

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

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

Le Roux, F., Zouine, M., Chakroun, N., Binesse, J., Saulnier, D., Bouchier, C., *et al*. (2009) Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol* **11**: 1959–1970.

Lemire, A., Goudenege, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., and Le Roux, F. (2015) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* **9**: 1523–1531.

Letunic, I., and Bork, P. (2011) Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res* **39**: W475–W478.

Lo Scrudato, M., and Blokesch, M. (2012) The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* **8**: e1002778.

Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009) Translocation of a Vibrio cholerae type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **5**: 234–243.

Martenot, C., Oden, E., Travaille, E., Malas, J.P., and Houssin, M. (2010) Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J Virol Methods* **170**: 86–89.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Matsumoto-Mashimo, C., Guerout, A.M., and Mazel, D. (2004) A new family of conditional replicating plasmids and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Res Microbiol* **155**: 455–461.

Parizadeh, L., Tourbiez, D., Garcia, C., Haffner, P., Degremont, L., Le Roux, F., and Travers, M.A. (2018) Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* **20**: 4343–4355.

Petton, B., Boudry, P., Alunno-Bruscia, M., and Pernet, F. (2015a) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostreae gigas*. *Aquacult Environ Interact* **6**: 205–222.

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

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

Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508–15513.

Reise, K., Buschbaum, C., Buttger, H., Rick, J., and Wegner, K.M. (2017) Invasion trajectory of Pacific oysters in the northern Wadden Sea. *Mar Biol* **164**: 68.

Rubio, T., Oyanedel-Trigo, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., *et al*. (2019) Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116:14238–14247. https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116

Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., and Garcia, C. (2010) A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb Ecol* **59**: 787–798.

Shapiro, B.J., Levade, I., Kovacikova, G., Taylor, R.K., and Almagro-Moreno, S. (2016) Origins of pandemic *Vibrio cholerae* from environmental gene pools. *Nat Microbiol* **2**: 16240.

Shneider, M.M., Buth, S.A., Ho, B.T., Basler, M., Mekalanos, J.J., and Leiman, P.G. (2013) PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature* **500**: 350–353.

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.

Travers, M.A., Boettcher Miller, K., Roque, A., and Friedman, C.S. (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* **131**: 11–31.

Unterweger, D., Miyata, S.T., Bachmann, V., Brooks, T. M., Mullins, T., Kostiuk, B., *et al*. (2014) The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat Commun* **5**: 3549.

Val, M.E., Skovgaard, O., Ducos-Galand, M., Bland, M.J., and Mazel, D. (2012) Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet* **8**: e1002472.

Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., *et al*. (2013) MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* **41**: D636–D647.

Van der Henst, C., Vanhove, A.S., Drebes Dorr, N.C., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Clerc, S., *et al*. (2018) Molecular insights into *Vibrio cholerae's* intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun* **9**: 3460.

Supporting Information

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

Figure S1. Population structure of *Vibrio* isolates (n = 1629) recovered from seawater fractions or oyster tissues from two geographic areas, Brest (France) and Sylt (Germany). Phylogenetic tree (maximum likelihood) based on partial *hsp60* sequences. The grey areas correspond to different clades labelled by letters (from A to V) and taxonomically assigned to known *Vibrio* species, i.e. *V. breogani* (A), *V. pacinii* (B), *V. fischeri* (C), *V. alginolyticus* (E, F), *V. jasicida* (G), *V. chagasii* (L), *V. crassostreae* (P) also indicated with a black arrow, *V. kanaloae* (T), *V. cyclitrophicus* (U) and *V. splendidus* (V) or *Vibrio* sp. *nov* (D, H, I, J, K, M, N, O, Q, R, S). The inner and outer rings indicate the origin of the strain and the site of sampling, respectively, following the colour code given on the right panel.

Fig. S2. Role of R5-7 in the cytotoxic activity of 8 T5-11 strains. The *r5-7* gene or *gfp* as a control were expressed *in trans* from a plasmid in *V. crassostreae* strain 8 T5-11 or in a mutant *V. crassostreae* strains J2-9Δ*r5-7*. Cytotoxic activity was assessed by flow cytometry using a double-staining procedure after exposition of the cells with bacteria at a ratio of 50 bacteria/haemocyte. As control, haemocytes were either incubated with the WT strain J2-9 or with a non-virulent strain (J2-8). The experiment was performed in duplicate. A single experiment is represented here. Letters indicate significant differences of mortality assessed by simultaneous tests for general linear hypotheses with Tukey contrasts ($P < 0.05$).

Fig. S3. Experimental infection in mesocosm.

A. Description of the 'natural' experimental infection. Wild adult oysters (n = 50) (animals coloured in blue) sampled in the Bay of Brest (seawater temperature of 12 °C) were returned to the laboratory and held in a 300 L tank under static conditions with aerated 5 μm filtered seawater at 21 °C. At day 11, three-month-old SPF oysters (n = 20) (animals coloured in orange) were immersed in 1 l of CSW collected from the tank containing the moribund wild oysters or in fresh 5 μm filtered seawater as a control.

B. Oyster disease dynamic. Mortality in wild adult oysters (blue line) or in three-month-old juvenile oysters (orange line) was recorded daily for 14 days and 6 days respectively. Cumulative mortality rates are indicated in % (y axis).

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Supplementary data

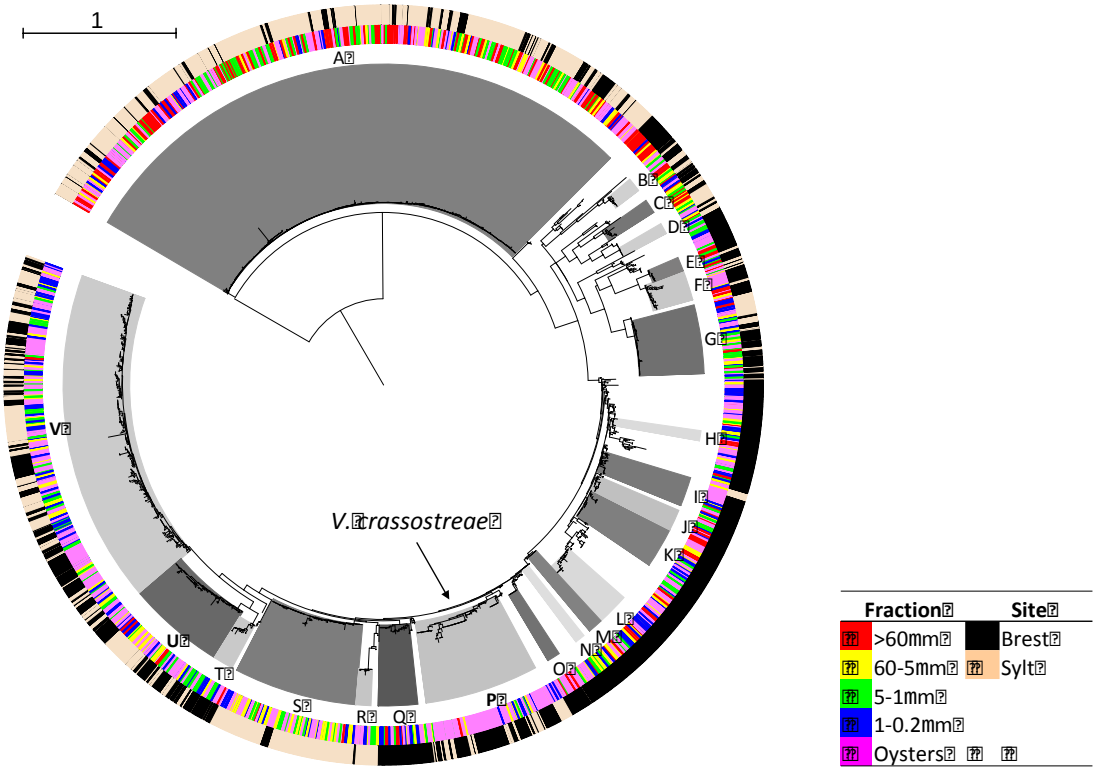


Figure S1: Population structure of *Vibrio* isolates (n=1629) recovered from seawater fractions or oyster tissues from two geographic areas, Brest (France) and Sylt (Germany). Phylogenetic tree (Maximum Likelihood) based on partial *hsp60* sequences. The grey areas correspond to different clades labelled by letters (from A to V) and taxonomically assigned to known *Vibrio* species, *i.e. V. breogani* (A), *V. pacinii* (B), *V. fischeri* (C), *V. alginolyticus* (E, F), *V. jasicida* (G), *V. chagasii* (L), *V. crassostreae* (P) also indicated with a black arrow, *V. kanaloae* (T), *V. cyclitrophicus* (U) and *V. splendidus* (V) or *Vibrio sp. nov* (D, H, I, J, K, M, N, O, Q, R, S). The inner and outer rings indicate the origin of the strain and the site of sampling, respectively, following the colour code given on the right panel.

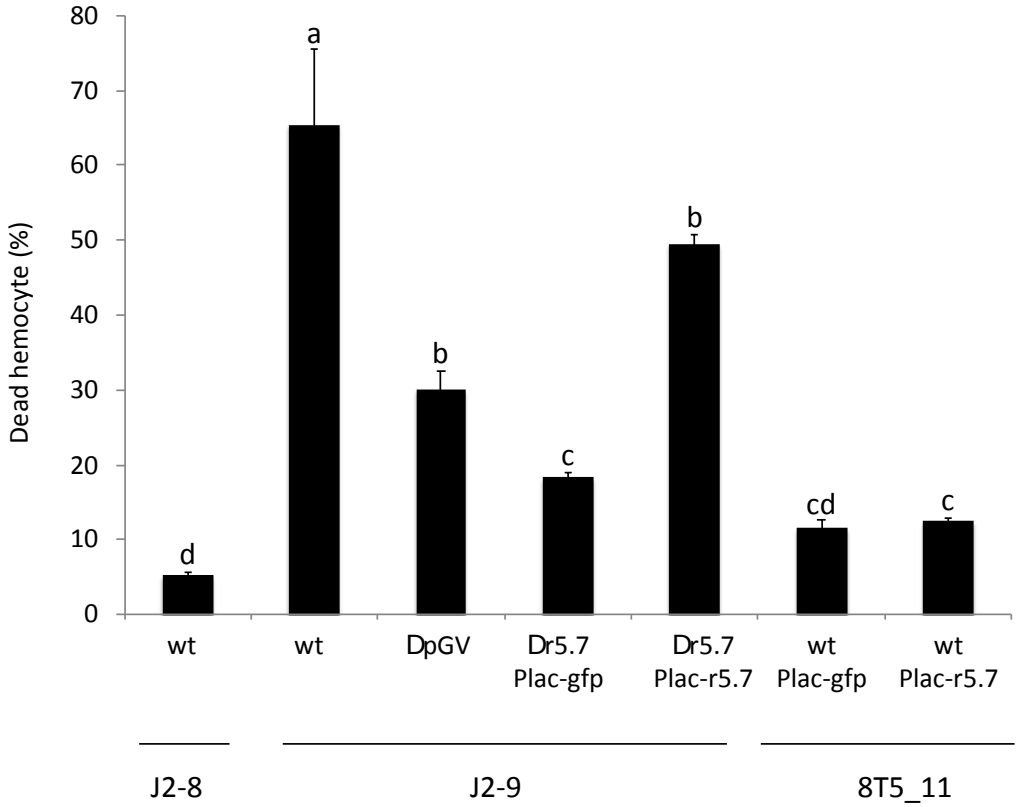


Figure S2: Role of R5-7 in the cytotoxic activity of 8T5-11 strains. The *r5-7* gene or *gfp* as a control were expressed *in trans* from a plasmid in *V. crassostreae* strain 8T5-11 or in a mutant *V. crassostreae* strains J2-9Δ*r5-7*. Cytotoxic activity was assessed by flow cytometry using a double staining procedure after exposition of the cells with bacteria at a ratio of 50 bacteria/hemocyte. As control, hemocytes were either incubated with the wild-type (WT) strain J2-9 or with a non-virulent strain (J2-8). The experiment was performed in duplicate. A single experiment is represented here. Letters indicate significant differences of mortality assessed by simultaneous tests for general linear hypotheses with Tukey contrasts ($P < 0.05$).

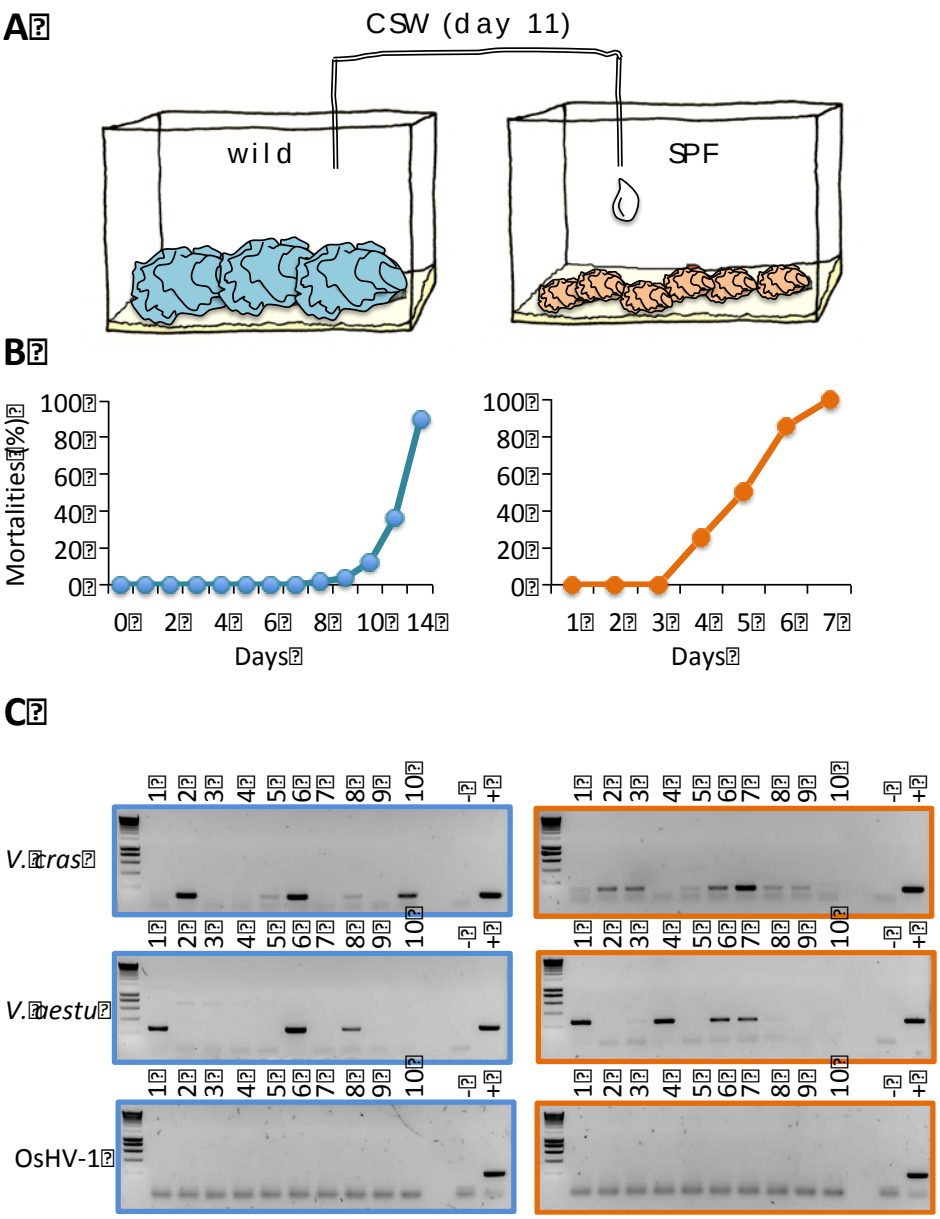


Figure S3: Experimental infection in mesocosm. A. Description of the 'natural' experimental infection. Wild adult oysters (*n* = 50) (animals coloured in blue) sampled in Bay of Brest (seawater temperature of 12°C) were returned to the laboratory and held in a 300-L tank under static conditions with aerated 5-µm-filtered seawater at 21°C. At day 11, three-months-old specific pathogen free oysters (*n* = 20) (animals coloured in orange) were immersed in 1L of contaminated seawater (CSW) collected from the tank containing the moribund wild oysters or in fresh 5-µm-filtered seawater as a control. **B.** Oyster disease dynamic. Mortality in wild adult oysters (blue line) or in three-months-old juvenile oysters (orange line) was recorded daily for 14 days and 6 days, respectively. Cumulative mortality rates are indicated in % (y axis). **C.** PCR detection of different oyster pathogens. *Vibrio crassostreae, V. aestuarianus* and the Herpes virus OsHV-1 µVar were detected in hemolymph of moribund wild adult oysters (blues boxes) sampled at day 10 (lanes 1 to 4) and day 11 (lanes 5 to 10) or from tissues of moribund three-months-old oysters (orange boxes) exposed to contaminated seawater (CSW) and sampled at day 3 (lanes 1 to 5), day 4 (lanes 6 to 10), day 5 (lanes 11 to 17) and day 6 (18 to 20) post-immersion. The positive (+) and negative (-) signs indicate the positive and negative controls, respectively.

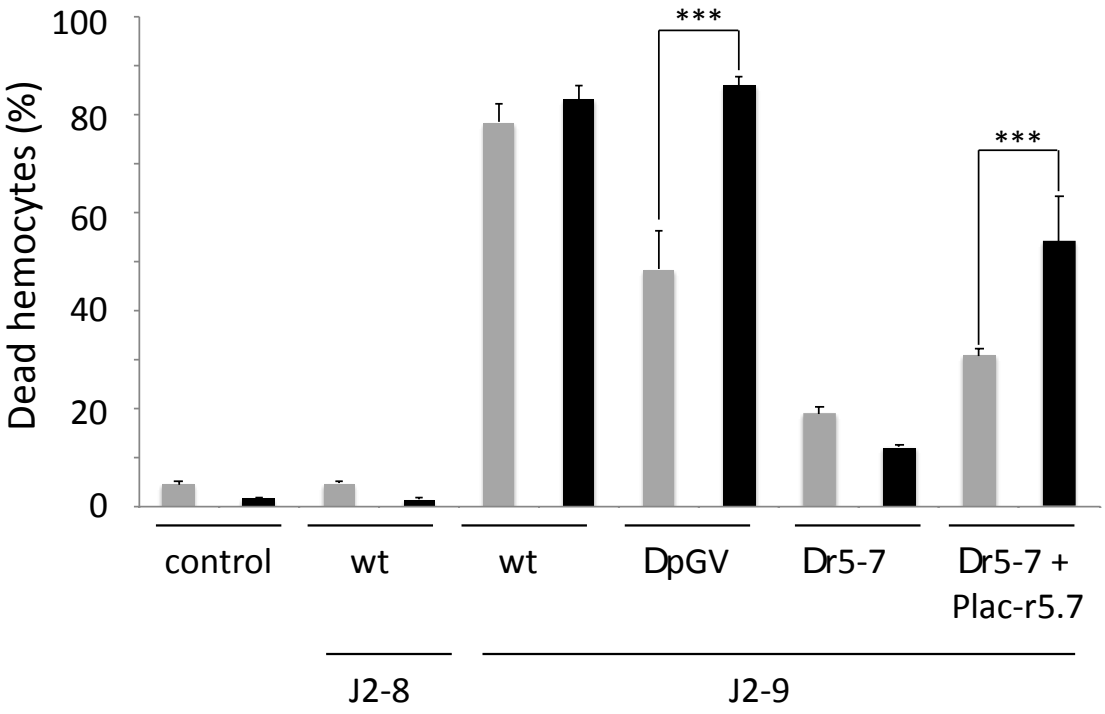


Figure S4: Cell viability assay of oyster hemocytes exposed to different ratios of *V. crassostreae* WT or mutants (Δ). Control hemocytes were incubated without bacteria (control) or with a non-virulent strain (J2-8). Cell viability was evaluated by flow cytometry using a double staining procedure after exposure of the hemocytes to bacteria at a ratio of 10 bacteria/hemocyte (grey bars) or 100 bacteria/hemocyte (black bars) for 6 hours. The assay was performed in triplicate. Asterisks indicate significant differences of mortality assessed by simultaneous tests for general linear hypotheses with Tukey contrasts ($P < 0.05$).

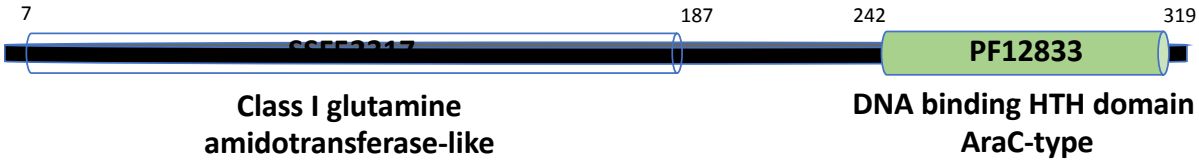


Figure S5: Protein domains found in the transcription factor TF. The protein was annotated with Interproscan. The two domains are represented by colored tubes with numbers indicating the beginning and the end of each domain on the protein. The accession numbers in domain databases (SSF52317 = Superfamily (http://supfam.org/); PF12833 = PFAM (https://pfam.xfam.org/)) are indicated with their putative function beneath.

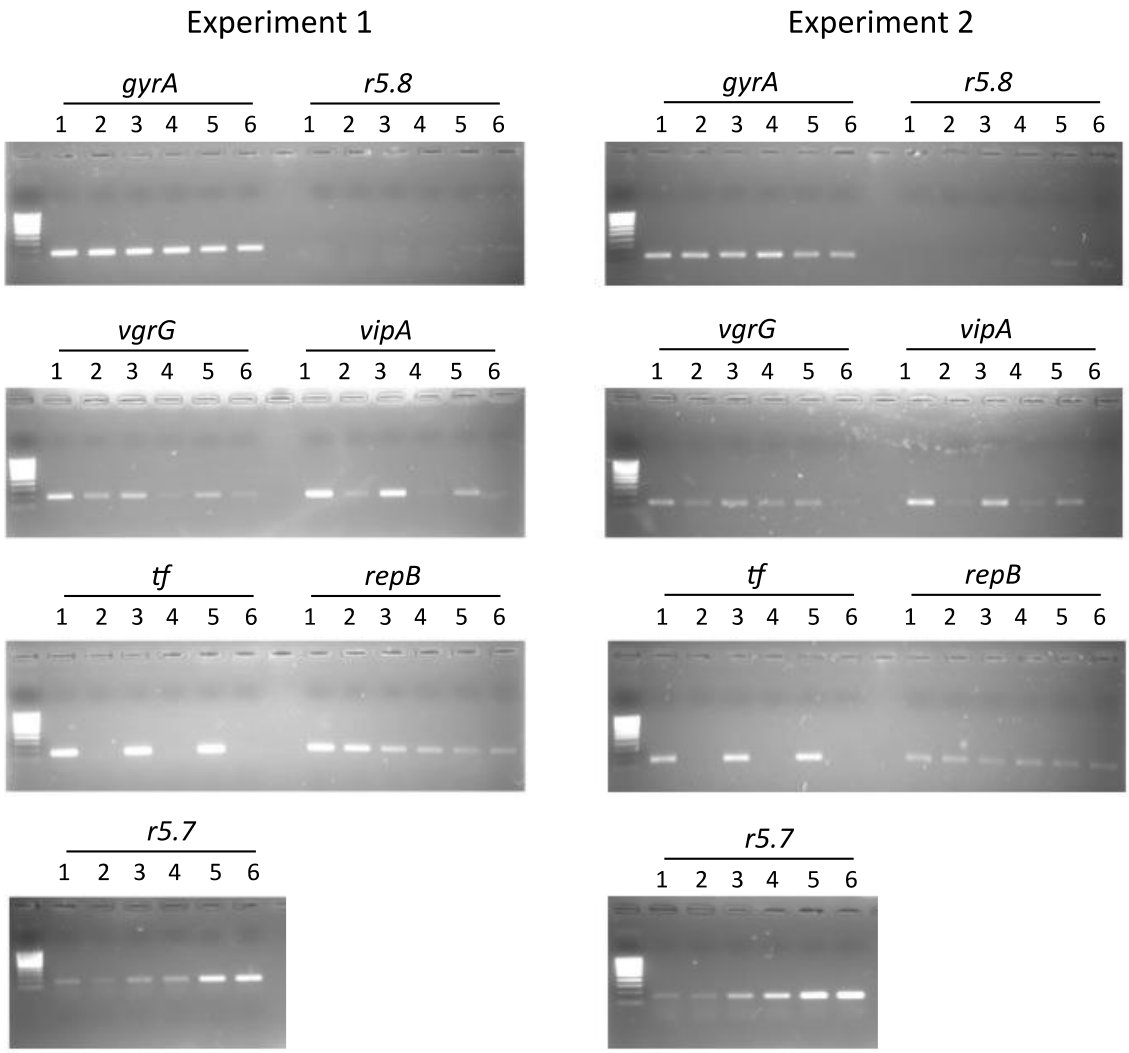


Figure S6: Activation of T6SS genes by the transregulator TF. *V. crassostreae* expressing constitutively the transcriptional factor *tf* (lines 1, 3, 5) or, as a control, the *gfp* (lines 2, 4, 6) were cultivated in marine broth to an optical density of 0.3 (lines 1, 2), 0.6 (lines 3, 4) and 1.0 (lines 5, 6), RNA were extracted, reverse transcribed and used for PCR detection of *gyrA* and *repB* (internal controls), *vgrG* and *vipA* (T6SS), *r5.7* and *r5.8* (chromosomal genes) and the *tf* expressed *in trans* from a plasmid. This experiment was performed twice, as indicated.

Strains	Isolation site	Isolation date	Fraction	Plasmid	Oyster batch 1		Oyster batch 2	
					Mortality (%)	Deviation	Mortality (%)	Deviation
16BF1_28	Brest	2016	1-5 µM	0	20.0	14.1	15.0	7.1
16BF1_56	Brest	2016	1-5 µM	1	70.0	14.1	72.5	3.5
16BF1_95	Brest	2016	1-5 µM	0	5.0	0.0	2.5	3.5
16BF5_48	Brest	2016	5-1 µM	1	72.5	17.7	67.5	17.7
7F5_27	Brest	2014	5-1 µM	1	40.0	21.2	45.0	7.1
7G1_1	Brest	2014	Oyster	0	0.0	0.0	5.0	7.1
7P_6	Brest	2014	1-0.2 µM	0	7.5	0.0	3.5	0.0
7T1_10	Brest	2014	Oyster	1	30.0	0.0	67.5	3.5
7T1_12	Brest	2014	Oyster	1	70.0	7.1	80.0	14.1
7T3_1	Brest	2014	Oyster	1	65.0	7.1	80.0	14.1
7T4_11	Brest	2014	Oyster	1	60.0	14.1	67.5	3.5
7T4_12	Brest	2014	Oyster	1	72.5	3.5	35.0	7.1
7T5_9	Brest	2014	Oyster	1	52.5	3.5	57.5	3.5
7T6_10	Brest	2014	Oyster	1	67.5	3.5	70.0	7.1
7T8_1	Brest	2014	Oyster	1	60.0	7.1	82.5	3.5
7T8_11	Brest	2014	Oyster	1	65.0	7.1	65.0	7.1
8F5_39	Brest	2014	5-1 µM	0	7.5	10.6	5.0	7.1
8H1_4	Brest	2014	Oyster	0	10.0	7.1	10.0	7.1
8T1_12	Brest	2014	Oyster	1	45.0	7.1	50.0	21.2
8T2_1	Brest	2014	Oyster	1	92.5	3.5	97.5	3.5
8T2_10	Brest	2014	Oyster	0	5.0	7.1	12.5	3.5
8T2_4	Brest	2014	Oyster	1	67.5	3.5	57.5	3.5
8T5_10	Brest	2014	Oyster	1	75.0	14.1	57.5	3.5
8T5_11	Brest	2014	Oyster	1	27.5	10.6	15.0	0.0
8T7_10	Brest	2014	Oyster	1	35.0	7.1	62.5	10.6
8T7_11	Brest	2014	Oyster	0	22.5	3.5	2.5	3.5
8T7_4	Brest	2014	Oyster	1	90.0	7.1	97.5	3.5
8T8_11	Brest	2014	Oyster	0	2.5	3.5	7.5	10.6
8T8_2	Brest	2014	Oyster	1	60.0	0.0	82.5	10.6
8T8_7	Brest	2014	Oyster	1	70.0	0.0	72.5	3.5
BOB3_6	Brest	2016	Oyster	1	65.0	7.1	70.0	21.2
BOT2_10	Brest	2016	Oyster	1	57.5	3.5	67.5	10.6
BOT3_9	Brest	2016	Oyster	0	10.0	7.1	45.0	7.1
BOT4_11	Brest	2016	Oyster	1	47.5	10.6	67.5	3.5
BOT4_5	Brest	2016	Oyster	1	60.0	14.1	67.5	17.7
BOT5_11	Brest	2016	Oyster	1	70.0	0.0	57.5	10.6
J2-9	Brest	2011	Oyster	1	87.1	9.1	89.6	6.6
J5-15	Brest	2011	Oyster	1	70.0	14.1	77.5	3.5
J5-19	Brest	2011	Oyster	1	90.0	0.0	100.0	0.0
J5-20	Brest	2011	Oyster	1	92.5	3.5	75.0	14.1
J5-4	Brest	2011	Oyster	1	92.5	3.5	100.0	0.0
J5-5	Brest	2011	Oyster	1	72.5	24.7	82.5	10.6
16SF1_51	Sylt	2016	1-5 µM	0	27.5	24.7	5.0	7.1
16SF1_87	Sylt	2016	1-5 µM	0	0.0	0.0	0.0	0.0
S16	Sylt	2016	Oyster	0	25.0	14.1	35.0	21.2
GV1664	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	2.5	3.5
GV1666	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	0.0	0.0
GV1667	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	0.0	0.0
GV1671	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	2.5	3.5	0.0	0.0
GV1672	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	2.5	3.5	2.5	3.5
GV1674	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	12.5	3.5	15.0	7.1
GV1675	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	12.5	3.5	27.5	10.6
GV1676	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	0.0	0.0
GV1677	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	10.0	7.1
GV1678	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	12.5	3.5	0.0	0.0
GV1679	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	5.0	7.1
GV1680	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	7.5	3.5	7.5	3.5
GV1681	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	2.5	3.5
GV1682	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	7.5	3.5	10.0	7.1
GV1683	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	7.5	10.6
GV1684	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	5.0	0.0	15.0	0.0
GV1685	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	7.5	3.5	47.5	10.6
GV1687	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	15.0	7.1	17.5	3.5
GV1688	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	40.0	7.1
GV1689	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	12.5	3.5	20.0	7.1
GV1690	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	10.0	0.0	2.5	3.5
GV1691	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	2.5	3.5
GV1692	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	5.0	0.0	12.5	3.5
GV1693	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	42.5	3.5	50.0	7.1
GV1694	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	2.5	3.5	10.0	0.0
GV1695	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	5.0	0.0	5.0	0.0
GV1696	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	5.0	7.1	2.5	3.5
GV1698	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	0.0	0.0	2.5	3.5
GV1699	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	10.0	7.1	5.0	7.1
GV1700	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	17.5	10.6	27.5	3.5
GV1701	Sylt	2016	1-0.2 µM	0	7.5	10.6	0.0	0.0
SOB1_2	Sylt	2016	Oyster	0	25.0	14.1	42.5	17.7
SOB1_3	Sylt	2016	Oyster	0	0.0	0.0	5.0	0.0
SOB1_6	Sylt	2016	Oyster	0	2.5	3.5	32.5	3.5
SOB1_8	Sylt	2016	Oyster	0	5.0	7.1	0.0	0.0
SOB4_6	Sylt	2016	Oyster	0	30.0	7.1	27.5	10.6
SOB6_12	Sylt	2016	Oyster	0	7.5	3.5	5.0	7.1
SOB7_9	Sylt	2016	Oyster	0	7.5	10.6	0.0	0.0
SOS2_11	Sylt	2016	Oyster	0	0.0	0.0	10.0	7.1
SOS2_6	Sylt	2016	Oyster	0	7.5	3.5	10.0	7.1
SOS4_4	Sylt	2016	Oyster	0	5.0	0.0	10.0	7.1
SOT2_12	Sylt	2016	Oyster	0	0.0	0.0	7.5	3.5
SOT3_10	Sylt	2016	Oyster	0	0.0	0.0	17.5	24.7
SOT8_11	Sylt	2016	Oyster	0	20.0	7.1	20.0	7.1

Table S1 : Supplementary Table.

Strain name	8T5_11
Number of contigs	29
Genome size	5383205
Number of CDSs	4742
pGV1512-like size	142833
pGV1512-like CDS number	170
Number of genes shared with pGV1512	160
Genome Accession number	NZ_RJJZ01000000.1
pGV1512-like accession number	RJJZ01000012.1

Table S2. Supplementary Table.

Label in J2-9 (VCR9J2v1_ in MAGE; VCR9J2 in NCBI)	Product
10047	Protein of unknown function
40072	Conserved membrane protein of unknown function
40090	Protein of unknown function
50182	Maltoporin
60118	Protein of unknown function
60146	Hypothetical protein
100001	Putative transposase, IS116/IS110/IS902
130061	Conserved protein of unknown function
150072	Putative LysR family transcriptional regulator
150073	Putative exported metal-dependent hydrolase
150074	Exported protein of unknown function
180046	Putative Integral membrane protein, two-component signal transducer
180047	Protein of unknown function
180060	Protein of unknown function
190033	Hypothetical protein
720145	Conserved protein of unknown function
730019	Conserved exported protein of unknown function
730020	Conserved exported protein of unknown function
730260	Putative outer membrane protein
730261	Putative Transcriptional regulator
730262	Putative Phosphotransferase system, fructose-specific IIC component (FruA)
730263	Putative Alpha-mannosidase
730264	Putative sucrose phosphorylase
730265	Putative PTS fructose-specific enzyme IIA component-like protein
730266	Glycerate kinase
730267	Mannose-6-phosphate isomerase
730268	**Conserved exported protein of unknown function (R5.7)**
730269	Conserved exported protein of unknown function
760172	Conserved protein of unknown function
920002	Hypothetical protein
920039	Conserved protein of unknown function
920043	Conserved hypothetical protein
960144	Conserved hypothetical protein
1330033	Conserved membrane protein of unknown function
1350183	Protein of unknown function
1420001	Transposase
1440001	Transposase (fragment)
1570004	Putative membrane-fusion protein
1570005	Putative N-acetylglucosaminyltransferase
1570006	Conserved hypothetical protein
1600060	Conserved protein of unknown function
1620002	Protein of unknown function
1620025	Protein of unknown function
1630029	Protein of unknown function

Table S3. Supplementary Table.

Label (VCR9J2v1_)	Name	Product	Begin	End	Length	Frame	Normalized average read count	Log2 fold change	Adjusted pvalue (FDR)
30006	argB	Acetylglutamate kinase	454077	454865	789	3	738	-2.22	3.42e-44
30005	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	453060	454064	1005	3	1055	-2.85	5.73e-73
720146	hisM	Histidine transport system permease protein hisM	2950116	2950784	669	-3	176	-2.94	2.92e-55
720148	artI	Arginine ABC transporter: substrate binding protein	2951471	2952202	732	-1	515	-2.97	1.19e-66
720147	-	ABC transporter: transmembrane protein; Arginine uptake	2950781	2951467	687	-1	395	-3.21	4.93e-72
720149	artP	Arginine transporter: ATP-binding protein	2952323	2953066	744	-1	608	-3.74	4.51e-98
750071	***tssM (vasK)***	**Putative type VI secretion protein ImpF/VasK/VtsI**	**3615265**	**3618720**	**3456**	**1**	**9708**	**2.17**	**2.11e-51**
750073	**-**	**Conserved protein of unknown function**	**3619396**	**3620673**	**1278**	**1**	**1.49e+4**	**2.19**	**2.11e-51**
750072	**-**	**Conserved protein with serine threonine kinase domain**	**3618736**	**3619368**	**633**	**1**	**4688**	**2.24**	**7.53e-55**
750053	***tssI (vgrG)***	**Putative type VI secretion protein VgrG**	**358282**	**359470**	**1989**	**-1**	**5560**	**2.41**	**3.37e-62**
750070	***tssL (vasF)***	**Putative type VI secretion protein VasF/VtsH/IcmU**	**3614121**	**3615263**	**1143**	**3**	**3046**	**2.57**	**5.69e-68**
750069	***tssK (vasE)***	**Putative type VI secretion protein VasE/VtsG/ImpJ**	**3612797**	**3614113**	**1317**	**2**	**3996**	**2.62**	**1.26e-71**
750068	***tssJ (vasD)***	**Putative type VI secretion protein VasD-1 (VtsF)**	**3612330**	**3612794**	**465**	**3**	**1451**	**2.65**	**5.23e-65**
750067	***fha***	**Putative type VI secretion protein VasC/VtsE with forkhead domain (FHA)**	**3611302**	**3612333**	**1032**	**1**	**2832**	**2.71**	**1.89e-74**
750066	**-**	**Putative type VI secretion protein VtsD**	**3610581**	**3611300**	**720**	**3**	**2200**	**2.84**	**3.97e-78**
750065	**-**	**Putative type VI secretion protein VtsC**	**3609412**	**3610584**	**1173**	**1**	**3497**	**2.96**	**3.09e-88**
750064	**-**	**Putative type VI secretion protein VtsB**	**3607172**	**3609415**	**2244**	**2**	**6116**	**3.18**	**2.24e-101**
750063	**-**	**Putative type VI secretion protein VtsA D-alanine-D-alanine ligase**	**3606015**	**3607169**	**1155**	**3**	**5249**	**3.71**	**2.61e-131**
750062	***tssH (vasG)***	**Type VI secretion protein VasG (ClpV1)**	**3603206**	**3605818**	**2613**	**2**	**1.50e+4**	**3.95**	**4.18e-142**
750061	***tssG (vasB)***	**Putative type VI secretion protein VasB/ImpH**	**3602217**	**3603179**	**963**	**3**	**7245**	**4.18**	**2.19e-159**
750060	***tssF (vasA)***	**Putative type VI secretion protein VasA/ImpG/TssF**	**3600415**	**3602217**	**1803**	**1**	**8209**	**4.53**	**6.50e-181**
750059	***tssE (vasS)***	**Putative type VI secretion protein VasS**	**360000**	**3600422**	**423**	**3**	**2482**	**4.54**	**5.92e-168**
750058	***tssC-2 (vipB-2)***	**Putative type VI secretion protein, tail sheath-like q (VasR/B)**	**3598642**	**3600003**	**1362**	**1**	**1.04e+4**	**4.76**	**2.40e-193**
750057	***tssC-1 (vipB-1)***	**Putative type VI secretion protein, tail sheath-like (VasR A/ImpC)**	**3597115**	**3598593**	**1479**	**1**	**2.07e+4**	**5.59**	**1.89e-234**
750056	***tssB (vipA)***	**Putative type VI secretion protein Hcp2/ VasQ/ImpB/VipA**	**3596606**	**3597115**	**510**	**2**	**1.79e+4**	**5.84**	**4.07e-253**
750054	***tssA (vasJ)***	**Putative type VI secretion protein VasJ**	**3594584**	**3595966**	**1383**	**2**	**3.45e+4**	**5.97**	**5.62e-240**
750055	***tssD (hcp)***	**Putative type VI secretion protein, hemolysin-coregulated protein (Hcp1)**	**3595998**	**3596531**	**534**	**3**	**2.74e+4**	**6.25**	**9.85e-265**
750086	-	Putative transcriptional regulator (FTT1512)	3627769	3628749	981	1	1.78e+4	9.19	0

Table S4. Supplementary Table.

Strain	Description	Reference
P3813	*lacIQ, thi1, supE44, endA1, recA1, hsdR17, gyrA462, zei298::Tn10*, Δ*thyA::(erm-pir116)* [Tc^R Erm^R]	Le Roux et al., 2007
b3914	(F^-) RP4-2-Tc::Mu ΔdapA ::*(erm-pir116), gyrA462, zei298::Tn10* [Km^R Em^R Tc^R]	Le Roux et al., 2007
GV1975	8T5_11; *V. crassostreae*	this study
GV1460	J2-8, *Vibrio sp.* (accession number PRJEB5890)	Lemire et al., 2015
GV2798	J2-9, *V. crassostreae* (accession number PRJEB5876)	Lemire et al., 2015
GV1438	J2-9 ΔpGV1512	Bruto et al., 2017
GV1542	J2-9 ΔPx3 (deletion of the Px3 region within the pGV1512 plasmid)	Bruto et al., 2017
GV2445	J2-9 Δtf (deletion of the transcriptional activator *tf* within the pGV1512 plasmid)	This study
GV2702	J2-9 ΔPx3 + Plac-tf (constitutive expression of *tf*, from a pMRB plasmid)	This study
GV2800	J2-9 ΔpGV + Plac-tf	This study
GV2470	J2-9 Δ*paar*	This study
GV3196	J2-9 Δpaar + Plac-paar (constitutive expression of paar, from a pMRB plasmid)	This study
GV2829	J2-9 ΔPX3 + Plac-tf	This study
GV2833	J2-9 ΔPX3 + Plac-gfp (constitutive expression of gfp, from a pMRB plasmid)	This study
A1552	*V. cholerae* O1 El Tor Inaba; WT (#1)	Yildiz and Schoolnik, 1998
A1552-TnTF1512	A1552 carrying arabinose-inducible TF on mTn7 transposon (#6624)	This study
GV1495	J2-9 Δr5-7	Lemire et al., 2015
GV2723	J2-9 Δr5-7 ΔpGV1512	This study
GV1141	J2-9 Δr5-7 + Plac-r5-7 (constitutive expression of *r5.7*, from a pMRB plasmid)	Lemire et al., 2015
GV1484	J2-9 Δr 5-7 + Plac-gfp	Lemire et al., 2015
GV3226	8T5_11 + Plac-r5-7	This study
GV3225	8T5_11 + Plac-gfp	This study

Table S5. Supplementary Table.

Plasmid	Description	Reference
pSW23T	*ori*V_{R6K} ; *ori*T_{RP4}, [Cm^R]	Demarre et al., 2005
pSW7848T	*ori*V_{R6K} ; *ori*T_{RP4}; *araC*- P_{BAD}*ccdB*; [CmR]	Val et al., 2012
pSW7848 ΔPx3	pSW7848T :: ΔPx3	Bruto et al., 2018
pSW7848 Δtf	pSW7848T :: ΔPx3-2.5	This study
pMRB-P_{LAC}-*gfp*	*ori*V*R6K*; *ori*T*RP4*; *ori*V*pB1067* ; P_{LAC}-*gfp* [CmR]	Le Roux et al., 2011
pMRB-P_{LAC}-tf	*ori*V*R6K*; *ori*T*RP4*; *ori*V*pB1067* P_{LAC}-Px3-2.5 [CmR]	This study
pSW7848 Δpaar	pSW7848T :: Δpaar	This study
pMRB-P_{LAC}-paar	*ori*V*R6K*; *ori*T*RP4*; *ori*V*pB1067* ; P_{LAC}-paar [CmR]	This study
pMRB-P_{LAC}-*R-5.7*	*ori*V_{R6Kg} ; *ori*T_{RP4}; *ori*V_{pB1067}; P_{LAC}-*R-5.7* [Cm^R]	This study
pSW8742D R5-7	pSW8742T :: *D R5-7*	Lemire et al., 2015
pGP704-TnAraC	pGP704 with mini-Tn7 carrying araC and PBAD (#5513)	Adams et al., 2019 in press
pGP704-TnTF1512	TF cloned behind PBAD promoter of pGP704-TnAraC (#6618)	This study
pBR-GFP_dsRED_Kan	Promoter-less gfp and dsRed (DsRed.T3[DNTI]) reporter genes in aph-carrying plasmid (#1650)	Lo Scrudato and Blokesch, 2012
pTFrep - intergenic region containing putative TF1512 binding site (#6650)	pBR-GFP_dsRED_Kan with intergenic region containing putative TF1512 binding site (#6650)	This study
pTFrep - pTFrep deleted for palindromic region (#6685)	pBR-GFP_dsRED_Kan with pTFrep deleted for palindromic region (#6685)	This study
pTFrep - pTFrep inversion of palindromic region (#6686)	pBR-GFP_dsRED_Kan with pTFrep inversion of palindromic region (#6686)	This study
pTFrep - pTFrep side-specific mutagenesis of palindromic region (#6687)	pBR-GFP_dsRED_Kan with pTFrep side-specific mutagenesis of palindromic region (#6687)	This study

Table S6. Supplementary Table.

Primer	Sequence 5'-3'
hsp60 For	GAATTCGAIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC
hsp60 Rev	CGCGGGATCCYKIYKITCICCRAAICCIGGIGCYTT
gyrB For	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYRA
gyrB Rev	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGYCAT
rctB For	CAGGAAACAGCTATGACCATHGARTTYACNGAYTTYCARYTNCAY
rctB Rev	GATAAACGACGGCCAYTTNCTYTGHATNGGYTCRAAYTCNCCRT
rpoD For	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT
rpoD Rev	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT
pGV1512 *repB* For	CCTCTCTCGACTACACGAAG
pGV1512 *repB* Rev	CATGCAACTTCATTCCAGGC
r5.7 detection For	CGTATGCCTGAACATAGTTAG
r5.7 detection Rev	GGGATCTGATGATCACCGAG
V. crassostreae detection For	AGGTCGCCACTTACTTGCTC
V. crassostreae detection Rev	TGCCTTCAGTGAGTTGGGTC
OsHV-1 detection For	ATTGATGATGTGGATAATCTGTG
OsHV-1 detection Rev	GGTAAATACCATTGGTCTTGTTCC
V. aestuarianus detection For	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA
V. aestuarianus detection Rev	CAATTTCTTTCGAACAACCAC
FT deletion-1	GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGGAGGAGTTCATGACCTACA
FT deletion-2	GCAGTCTCTCAATAACACCGCGCTTCTCTTTTGTGTCCCA
FT deletion-3	TGGGACACAAAAGAGAAGCGCGGTGTTATTGAGAGACTGC
FT deletion-4	CCCCCGGGCTGCAGGAATTCGCCATTTCCTATCCAGCGTA
paar deletion-1	GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCTGCCCATGCCTTACCTGTCC
paar deletion-2	GGTACGAATTTTGAGTAAGTTATTCTAGGCCTCCAACGGTTGTAG
paar deletion-3	CTACAACCGTTGGAGGCCTAGAATAACTTACTCAAAATTCGTACC
paar deletion-4	CCCCCGGGCTGCAGGAATTCTGGTGTCAAGGCCTCGTGGG
FT complementation For	GCCCGAATTCATGCTCGACAAAAGAAAACC
FT complementation Rev	GCCCCTCGAGCTAAACCTTACAAACCTGTG
paar complementation For	GGGCGGGCCCATGTTACCAGCAGCAAGAGC
paar complementation Rev	GGGCCTCGAGTTAACCGCCAATTAAGACGGTTG
PCR VipA For	TGTCGGCGTAATTGGCGATT
PCR VipA Rev	GAACGGAAGTTCATGCTCAC
PCR FT For	GAAATGCTGACAATCGCTGC
PCR FT Rev	CACCACATGCGCCTATTAGT
PCR repB For	CACTCTTCCTCTCTCGACTA
PCR repB Rev	CATTAAGCCTACTTTGCGCG
PCR gyrA For	GTTCATACCTAGACTACGCG
PCR gyrA Rev	ATGCGGGTGGTATTTACCGA
PCR vgrG For	GCCTCAGTTTAGCCTCTATC
PCR vgrG Rev	CTCAAAGGGTCTTGTGCTTC
Mutagenesis inthe promoter 1	CCTTTTCGTCCTAAAAGCCAACCATCTTTATCATCTACCTTTTATTG
Mutagenesis inthe promoter 2	CAATAAAAGGTAGATGATAAAGATGGTTGGCTTTTAGGACGAAAAGG
Mutagenesis inthe promoter 3	CTTTTCGTCCTAAAAGCCAACtaaatgaggcgtaaatgCATCTTTATCATC
Mutagenesis inthe promoter 4	GATGATAAAGATGcatttacgcctcatttaGTTGGCTTTTAGGACGAAAAG
Mutagenesis inthe promoter 5	CTTTTCGTCCTAAAAGCCAACcaaaaaaggcgtaaatgCATCTTTATCATC
Mutagenesis inthe promoter 6	GATGATAAAGATGcatttacgccttttttgGTTGGCTTTTAGGACGAAAAG
Clonage DSred/GFP promoter FT in a MRB plasmid 1	GCCCGAATTCCGTTAAGTGTTCCTGTGTCAC
Clonage DSred/GFP promoter FT in a MRB plasmid 2	GCCCCTCGAGCTGCAGACGCGTCG
Clonage DSred/GFP promoter FT in a MRB plasmid 3	GCCCCTCGAGTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC
Clonage DSred/GFP promoter FT in a MRB plasmid 4	GCCCGAATTCCTACAGGAACAGGTGGTGGC

Table S7. Supplementary Table.

Chapitre II Étude des interactions entre *V. crassostreae* et les phages

Introduction

L'abondance des populations de vibrios peut varier de manière importante en fonction des dates d'échantillonnage (Bruto et al. 2016; partie I-B), suggérant une forte dynamique de ces populations dans l'environnement. Les facteurs abiotiques tels que la température et la salinité ont été corrélés à cette dynamique dans l'environnement (Takemura, Chien, and Polz 2014). Le déclin de blooms de vibrios pourrait résulter de compétition entre bactéries ou de prédation par des protozoaires ou des bactériophages (ou phages). Selon les études, les phages sont associés à 20-50% de la mortalité bactérienne (Hennes et al. 1995 ; Mathias et al. 1995 ; Díaz-Muñoz et al. 2014).

Des travaux ont décrit l'abondance de phages virulents chez l'huître (DePaola, 1997 ; DePaola 1998) et ont proposé l'utilisation de phages pour éliminer des pathogènes bactériens de l'Homme chez l'huître (Le et al. 2018 ; Zhang et al. 2018). A ce jour aucune étude n'a exploré le rôle des phages virulents dans le contrôle des vibrios pathogènes de l'huître. **Notre hypothèse de travail est que ces phages pourraient i) influencer l'abondance des pathogènes par prédation (dynamique écologique) ; ii) influencer leur diversité par sélection (dynamique évolutive).**

Dans l'objectif de mieux comprendre le rôle des phages dans la dynamique éco-évolutive de *V. crassostreae,* nous avons réalisé un échantillonnage temporel les lundi, mercredi et vendredi pendant une période de 5 mois dans une zone d'élevage intensif d'huîtres (mai-septembre 2017 ; Brest). Cet échantillonnage couvre un épisode de mortalité des juvéniles (juin-aout 2017). Les souches de *V. crassostreae,* isolées uniquement au cours des mortalités d'huîtres, ont été utilisées pour isoler des phages virulents. Cette collection a été complétée par des isolats de *V. crassostreae* et d'autres espèces de *Vibrio* isolées entre 2000 et 2014 (archives). Enfin nous avons isolé des souches de *V. crassostreae* et des phages à Sylt lors d'une campagne d'échantillonnage de deux jours effectuée en 2016.

Des tests d'infections croisées ont permis d'évaluer l'importance de la co-occurrence dans le temps et dans l'espace pour les interactions phage-vibrio. Nous avons identifié des groupes de phages spécifiques de sous-populations de *V. crassostreae*, définies comme unité de prédation. Au sein de ces unités de prédation, la structure des réseaux d'interactions nous

permet de proposer des hypothèses sur les modes de coévolution phage-vibrio (Weitz et al. 2013 ; Gandon et al. 2008). Un nombre restreint de gènes coïncide avec le spectre d'hôte des phages et la résistance de l'hôte. Ces éléments seront caractérisés génétiquement.

La théorie prédit que l'évolution de la résistance aux phages entraîne un coût sur la fitness de la bactérie (Trade-off) et dans certains cas peut se traduire par une atténuation de la virulence (Friman and Buckling 2014). Nous avons développé un système d'infection phage-vibrio en conditions semi-environnementales (hémolymphe de l'huître) permettant d'évaluer ce trade-off.

Résultats

1. Dynamique de *V. crassostreae* chez les huîtres malades.

Nous avons réalisé un échantillonnage de 57 dates entre début mai et fin septembre à Brest. A chaque date d'échantillonnage, les vibrios ont été isolés à partir d'eau de mer (fraction planctonique : 5-0.2 µm ; 48 isolats/date) et de broyats d'huîtres (48 isolats/date). La présence de *V. crassostreae* a été recherchée par PCR sur colonies (marqueur *r5.2* puis spécifique de *V. crassostreae,* voir matériel et méthodes). Les colonies positives ont été ré-isolées et conservées en glycérol à -80°C. L'assignation taxonomique de ces isolats a ensuite été validée par séquençage Sanger d'un fragment du gène *gyrB*. Un total de 195 souches de *V. crassostreae* a été isolé, dont 39 proviennent de la fraction planctonique et 156 de l'huître, soit 20% et 80% respectivement. Ce résultat confirme l'association de *V. crassostreae* avec l'huître (Chapitre 2, figure 1) et la forte dynamique de *V. crassostreae* qui se caractérise par une succession de proliférations et de déclins.

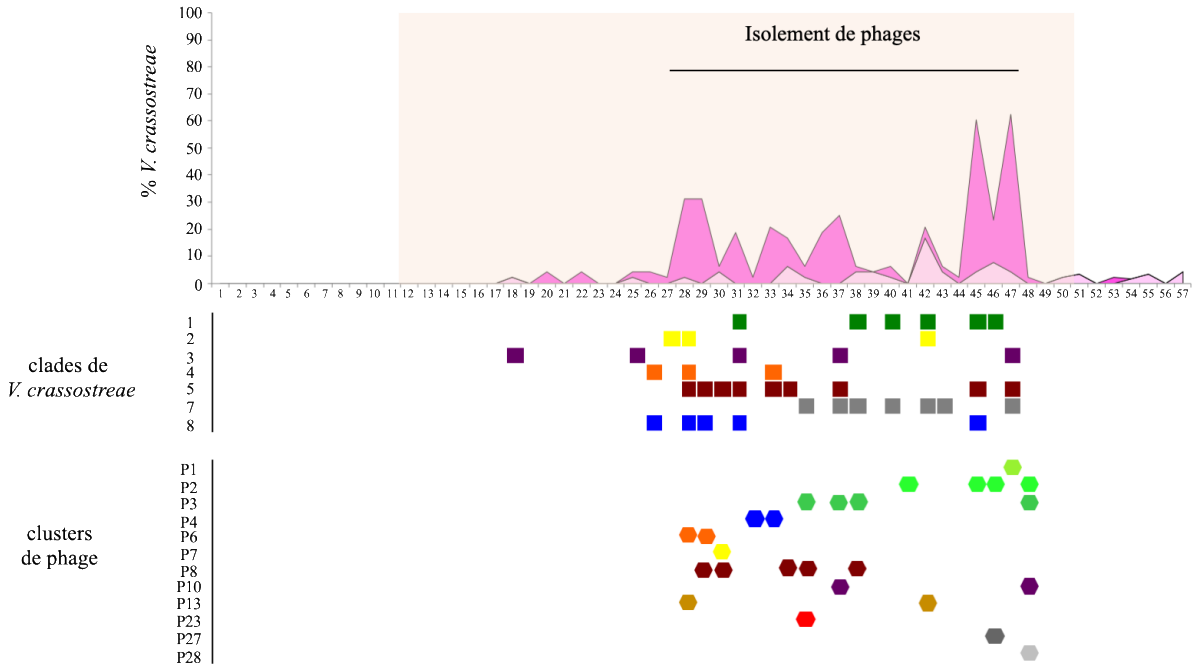


Figure 1 : Dynamique de *V. crassostreae* isolés d'huîtres (rose foncé) ou d'eau de mer (rose pâle), avant et pendant la survenue d'un évènement de mortalité de l'huître (ombre orange). La période d'isolement de phages est indiquée sur le graphique. Les carrés de couleur indiquent les dates d'isolements de souches appartenant aux différents clades de *V. crassostreae*. Les losanges indiquent les dates d'isolements des phages appartenant aux différents clusters de phages. Le code couleur sera identique pour toutes les figures.

2. Isolement des phages.

A chaque date d'échantillonnage le broyat d'huître a été filtré à 0.2 µm pour rechercher la présence de phages dans les tissus (i.e. broyat). Les virus totaux présents dans les échantillons d'eau de mer (<0.2 µm) ont été concentrés 1000 fois par précipitation au chlorure de fer (voir Matériel et méthodes) (i.e. floculat). La recherche de phages a été réalisée en mélangeant une culture pure d'hôte bactérien (DO = 1 ; 100 µl) à un floculat de phages (10µl) dans une gélose molle (top agar). L'induction spontanée de phage(s) tempéré(s) a été contrôlée en incubant uniquement la souche de vibrio en top agar. Dans le cas d'apparition de plages de lyse avec uniquement la souche de vibrio, ces souches ont été retirées de notre échantillonnage. Nous avons choisi de sélectionner des phages dont les plages de lyses apparaissent rapidement (24-48 heures). Notre échantillonnage ne permet donc pas d'isoler des phages à réplication lente comme les *Autolykiviridae* (Kauffman et al. 2018). Ce choix est basé sur la volonté de manipuler génétiquement les phages dans l'avenir.

Dans un premier temps chacun des 195 isolats de *V. crassostreae* a été incubé avec le broyat ou le floculat correspondant à sa date d'isolement. Seules 19/195 souches (~10%) ont permis d'obtenir des plages de lyse (Chapitre 2, table 1). Un total de 36 et 9 Pfu (plaque forming unit, Pfu) a été obtenu à partir de floculats d'eau de mer et de broyats d'huîtres respectivement

(Chapitre 2, table 1). Cette proportion de vibrios sensibles à des phages co-occurrents est similaire à celle observée par Katherine Kauffman (Kauffman 2014) et Moebus (Moebus 1980) lors de l'isolement de vibriophages à partir d'eau de mer. Angelo de Paola a observé que les huîtres contiennent une forte abondance de phages infectant *V. vulnificus* (> 10^4 phages / g de tissus d'huître) (DePaola et al. 1997; Angelo DePaola et al. 1998). L'abondance de phages dans l'huître dirigés contre *V. crassostreae* semble similaire à cette observation, bien que peu de souches soient sensibles à un phage co-occurrent.

souches	phages co-occurents	
	floculat	huître
28_O_18	1	
28_O_23	3	
28_O_30	1	1
29_O_34	1	1
29_O_41		1
29_O_46	1	
30_P_64	4	6
30_P_66	2	
33_O_91	1	
33_O_93	1	
33_O_95	2	
33_O_97	2	
36_O_159	4	
37_O_184	4	
42_O_252	2	
42_P_264	3	
42_P_268	1	
47_O_340	2	
48_O_431	1	
total	36	9

Tableau 1 : Souches ayant permis d'isoler des phages co-occurrents à partir de floculat ou d'huîtres.

Lorsque ~100 souches de *V. crassostreae* isolées en juillet 2017 ont été incubées avec 20 floculats de la même période (soit 2 000 interactions), 41% des souches ont permis d'obtenir des plages de lyse, permettant un enrichissement de notre collection de phages.
Les 20 floculats ont ensuite été mélangés (pool) et testés sur 146 souches de *V. crassostreae* n'ayant pas permis précédemment d'isoler des phages. Cette technique nous a permis d'isoler 21 phages supplémentaires infectant cinq souches de *V. crassostreae.*

Selon les combinaisons hôte/source virale (floculat ou broyat d'huître), une à plusieurs plages de lyse ont été obtenues, présentant des morphotypes très variables (0,1 mm à 4 mm, halot net ou trouble). Une à six plages de lyse par morphotype ont été sélectionnées. Ces phages ont été

ré-isolés trois fois et stockés individuellement à 4°C et -80°C à Roscoff (collection GV) et Paris (duplicat Eligobioscience). Au total, 250 phages infectant *V. crassostreae* ont été isolés à Brest. Lors d'une autre campagne d'échantillonnage à Sylt (deux jours consécutifs), 51 souches de *V. crassostreae* et 33 phages ont été isolés.

3. Détermination du spectre d'hôte des phages.

Un total de 283 phages a été testé en infections croisées. Nous avons sélectionné des souches *V. crassostreae* isolées au cours de l'échantillonnage en série 2017 (n = 115) ou précédemment à Brest (n = 25, génome disponible) ou à Sylt (n = 50) ainsi que cinq membres représentatifs de 23 autres populations de vibrios isolées à Brest (5x23 = 115).

Un total de 86 315 interactions a été testé en déposant 5 µl de phages (10^3 pfu) sur les tapis bactériens afin de déterminer la formation de plaques par l'un des 283 virus sur l'un des 305 hôtes de notre collection. Les observations ont été réalisées après 24 et 48 heures. Aucune différence n'a été observée entre les résultats obtenus à 24 et 48 heures. Un total de 1 838 interactions (2%) ont produit des plages de lyses (Chapitre 2, figure 2).

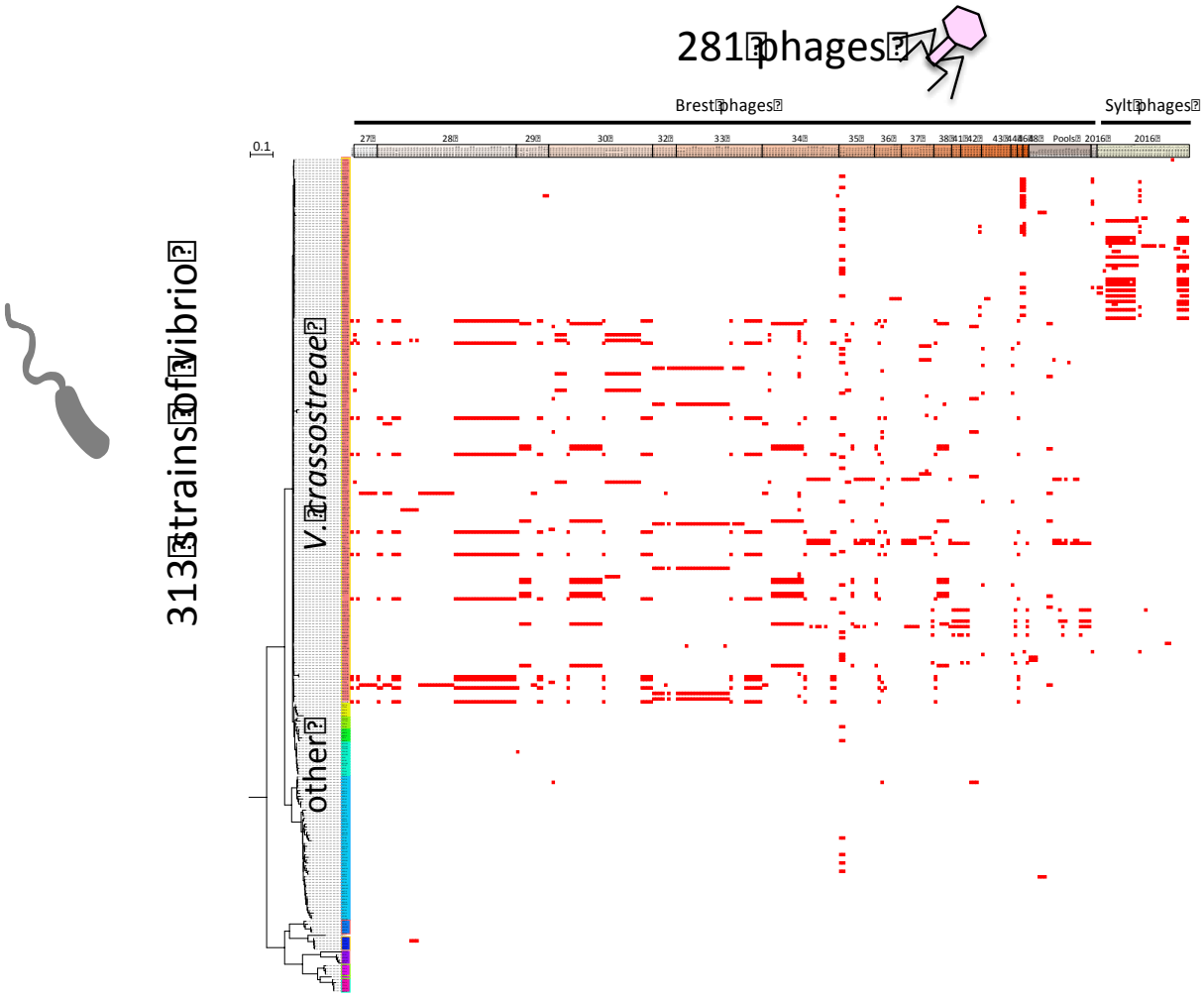


Figure 2 : Résultats des infections croisées. Les souches (gauche) sont ordonnées suivant la phylogénie *gyrB* (maximum de vraisemblance). Les souches appartenant à l'espèce *V. crassostreae* sont indiquées en orange et les souches appartenant aux espèces externes sont indiquées par le gradient de couleurs. Les phages (haut) sont ordonnés selon la date et lieu d'isolement. Chaque carré rouge représente une interaction lytique.

Un total de 224 phages présente un profil d'infection similaire et ont donc été classés en 32 groupes alors que 43 phages ont un profil unique, nous amenant à sélectionner 75 phages représentatifs d'un patron d'infection.

Les souches de *V. crassostreae* présentant un profil d'infection similaire ainsi qu'une identité de séquence *gyrB* de 100% ont été considérées comme « clonales », nous permettant de sélectionner 158 *V. crassostreae* pour le séquençage de génomes complets.

La matrice finale comprend donc 158 souches x 75 phages (Chapitre 2, figure 3).

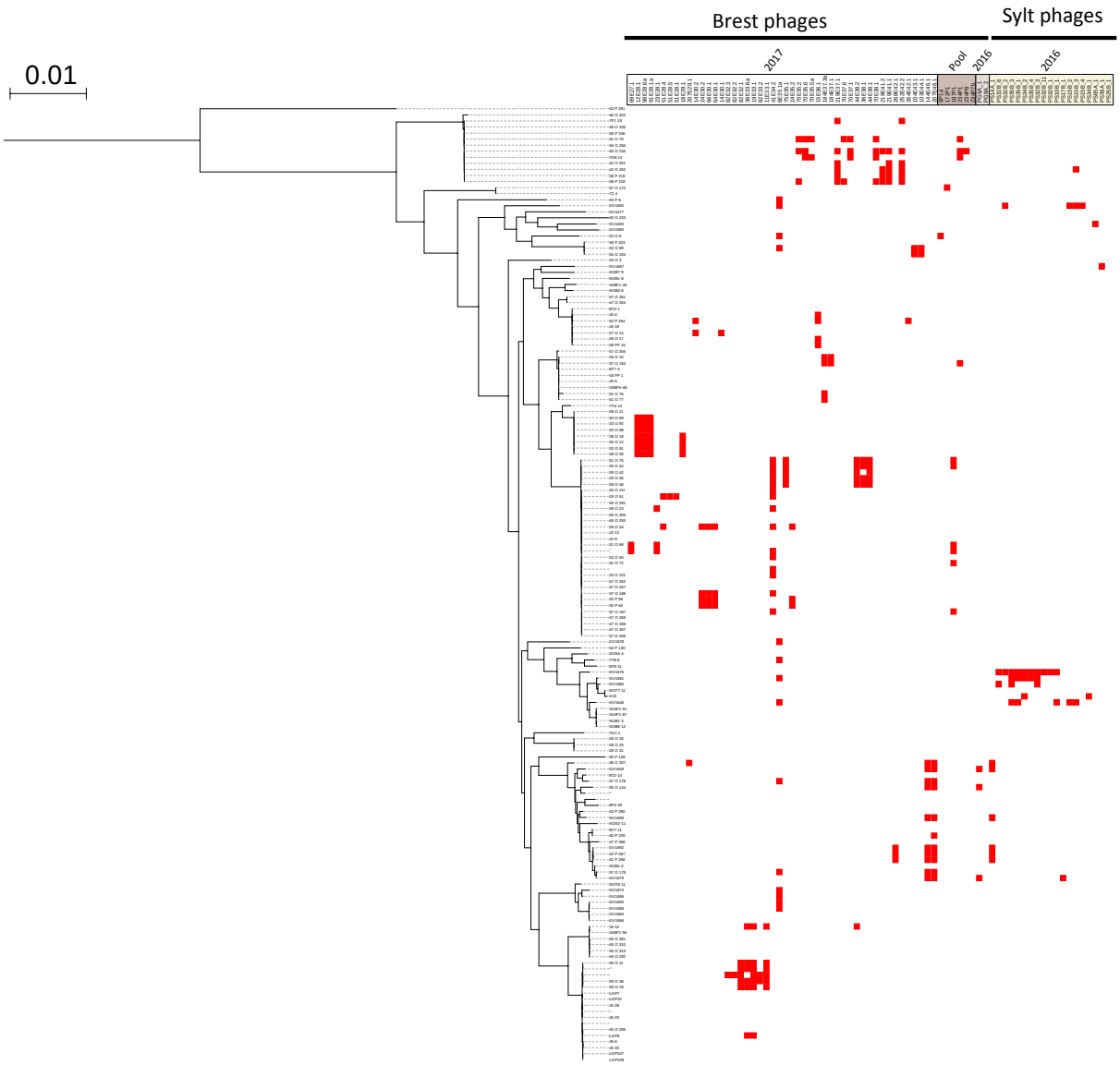


Figure 3 : Résultats des infections croisées des 158 souches de *V. crassostreae* par les 75 phages. Les souches (gauche) et les phages (haut) sont respectivement ordonnés suivant la phylogénie du génome core (2498 gènes) et la date et lieu d'isolement des phages. Chaque carré rouge représente une interaction lytique.

Un total de 47/158 souches de vibrios n'est pas sensible aux phages disponibles. Les souches de *V. crassostreae* sensibles peuvent être infectées par 1 à 12 phages (Chapitre 2, figure 3). 13/75 (18%) phages sont capables d'infecter seulement une souche, 58/75 (76%) infectent de 2 à 10 souches et 4/75 (6%) infectent plus de 10 souches de *V. crassostreae.*

7/75 phages sont capables d'infecter des souches de populations autres que *V. crassostreae* (Chapitre 2, figure 4). Seul le phage 6E35.1a est capable d'infecter des souches appartenant à plusieurs populations de vibrios. Les phages ayant la capacité d'infecter des souches d'autres populations n'ont pas toujours la capacité d'infecter plus de souches de *V. crassostreae* (Chapitre 2, figure 4).

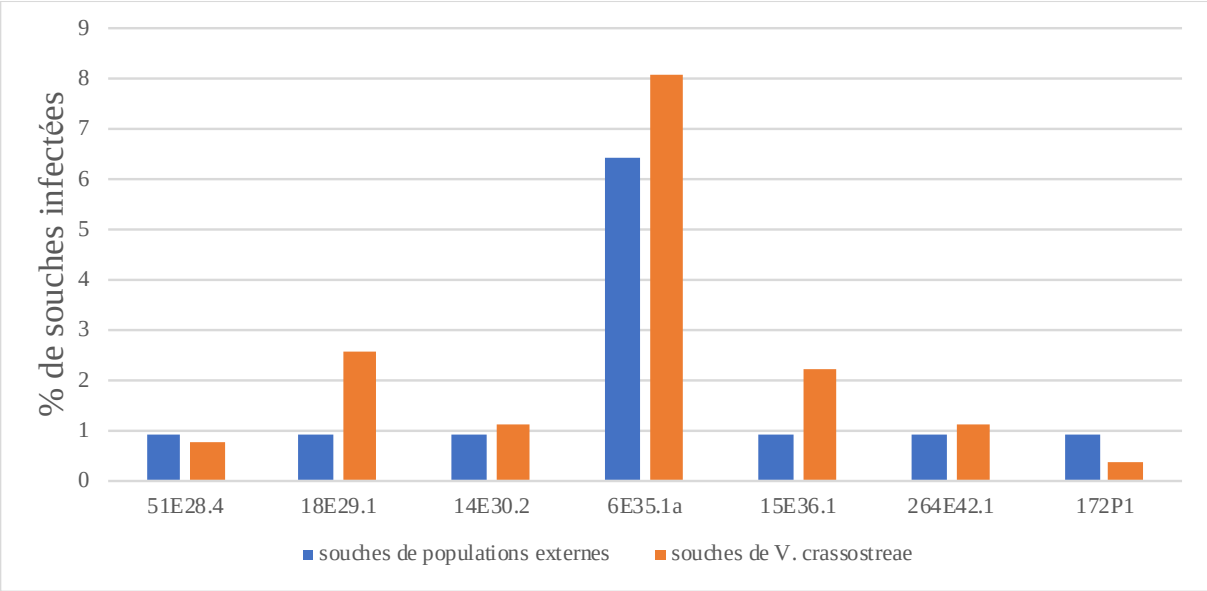


Figure 4 : Bilan des phages infectant des souches appartenant à des populations de vibrios autres que *V. crassostreae*. Le graphique représente le pourcentage de souches appartenant à des populations externes de vibrios (orange) ou à *V. crassostreae* (bleu).

En considérant l'ensemble des souches de *V. crassostreae* (Brest et Sylt), un total de 21 phages est suffisant pour infecter 111/158 (70%) souches, parmi eux 8 phages infectent de 10 à 22 souches. Le nombre de phages nécessaires pour infecter uniquement les souches de Brest (potentiellement pathogènes) est de 18 et permet d'infecter 83/125 (66%) souches (Chapitre 2, figure 5, tableau 2).

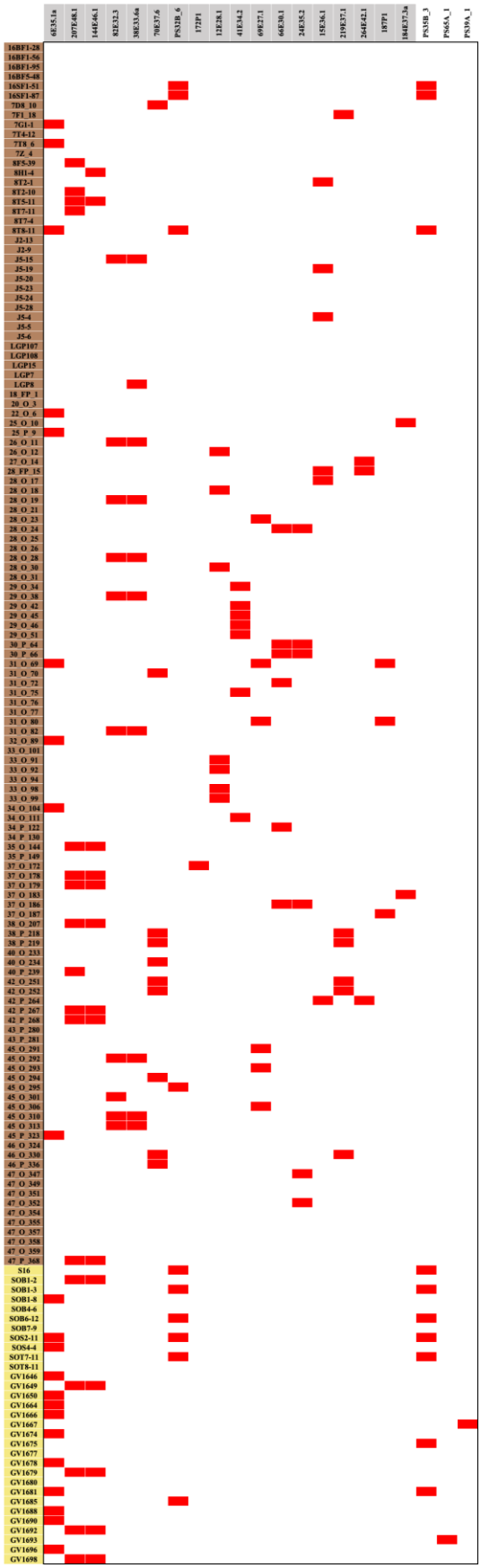


Figure 5 : Matrice d'infection avec le nombre minimal de phages. Les cellules marrons, jaunes et grises représentent respectivement les souches *V. crassostreae* isolées à Brest et à Sylt, et les 18 phages nécessaires pour 83/125 (66%) souches de Brest.

phage	morphologie	cluster	nombre de souches sensibles	clade de *V. crassostreae* sensible
6E35.1a	Myovirus	P23	22	clade 5-6-7
207E48.1	Myovirus	P28	17	clade 7
144E46.1	Myovirus	P27	14	clade 7
82E32.3	Siphovirus	P4	10	clade 8
38E33.6a	Siphovirus	P4	10	clade 8
70E37.6	Siphovirus	P3	10	clade 1
PS32B_6	Podovirus	P5	10	clade 6
PS35B_3	Podovirus	P5	10	clade 6
12E28.1	Myovirus	P6	7	clade 4
41E34.2	Podovirus	P8	7	clade 5
69E27.1	Podovirus	P9	6	clone 5
66E30.1	Podovirus	P8	6	clade 5
24E35.2	Podovirus	P8	6	clade 5
15E36.1	Podovirus	P29	6	clone 2
219E37.1	Podovirus	ND	6	clade 1
264E42.1	Siphovirus	P13	3	clade 2
187P1	Podovirus	P31	3	clone 5
184E37.3a	Myovirus	P10	2	clade 3
172P1	Podovirus	P30	1	/
PS65A_1	Siphovirus	P26	1	/
PS39A_1	Podovirus	ND	1	/

Tableau 2 : Bilan du nombre de phages minimal pour infecter la majorité des souches de *V. crassostreae*. Les cellules grises indiquent les phages nécessaires à infecter uniquement les souches de Brest.

4. Adaptation locale des phages infectant *V. crassostreae.*

Nous avons comparé les interactions phage-vibrio en combinaisons sympatriques (phage de Brest contre vibrio de Brest ; phage de Sylt contre vibrio de Sylt) et allopatriques (phage de Brest contre vibrio de Sylt ; phage de Sylt contre vibrio de Brest). Nous avons observé une forte tendance en faveur des combinaisons sympatriques (Chapitre 2, figure 6).

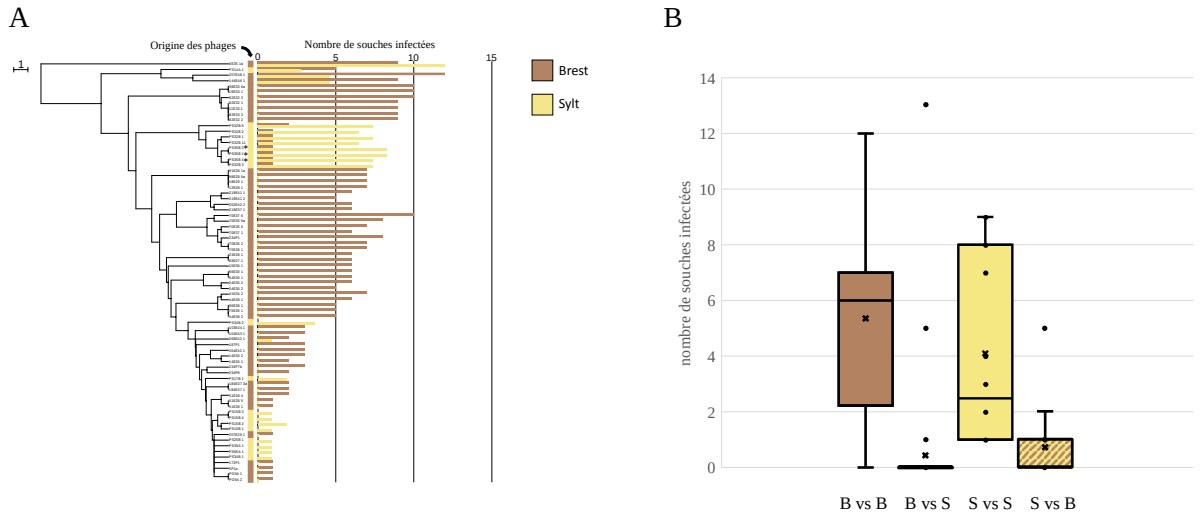


Figure 6 : A. Dendrogramme basé sur le profil d'infection des phages. Pour chaque phage de Brest (marron) et de Sylt (jaune), le nombre de souches infectées de *V. crassostreae* isolées à Brest (barres marrons) et à Sylt (barres jaunes) est indiqué. Les phages de Sylt isolés à partir d'une souche de Brest sont identifiés par un astérisque. **B.** Boites à moustache représentant le nombre de souches : de Brest infectées par les phages de Brest (B vs B), de Brest infectées par les phages de Sylt (B vs S), de Sylt infectées par les phages de Sylt (S vs S) et de Sylt infectées par les phages de Brest (S vs B).

Nous avons étudié l'impact temporel sur les interactions phage-vibrio (Chapitre 2, figures 7 et 8). Pour cela, nous avons comparé la capacité d'infection de 53 phages isolés à Brest en 2017 contre des souches de *V. crassostreae* « contemporaines » isolées en 2017 (n=91) ou « du passé » isolées en 2014 (n=101) (Chapitre 2, figure 7).

Nous observons une forte tendance des phages à infecter davantage les souches contemporaines comparativement aux souches du passé (Chapitre 2, figure 8). Uniquement quatre phages (207E48.1, 144E46.1, 6E35.1a et 15E36.1) ne semblent pas impactés par la variable temporelle (Chapitre 2, figure 7 et 8). Trois d'entre eux (et en particulier le phage 15E36.1) présentent le plus grand spectre d'hôtes.

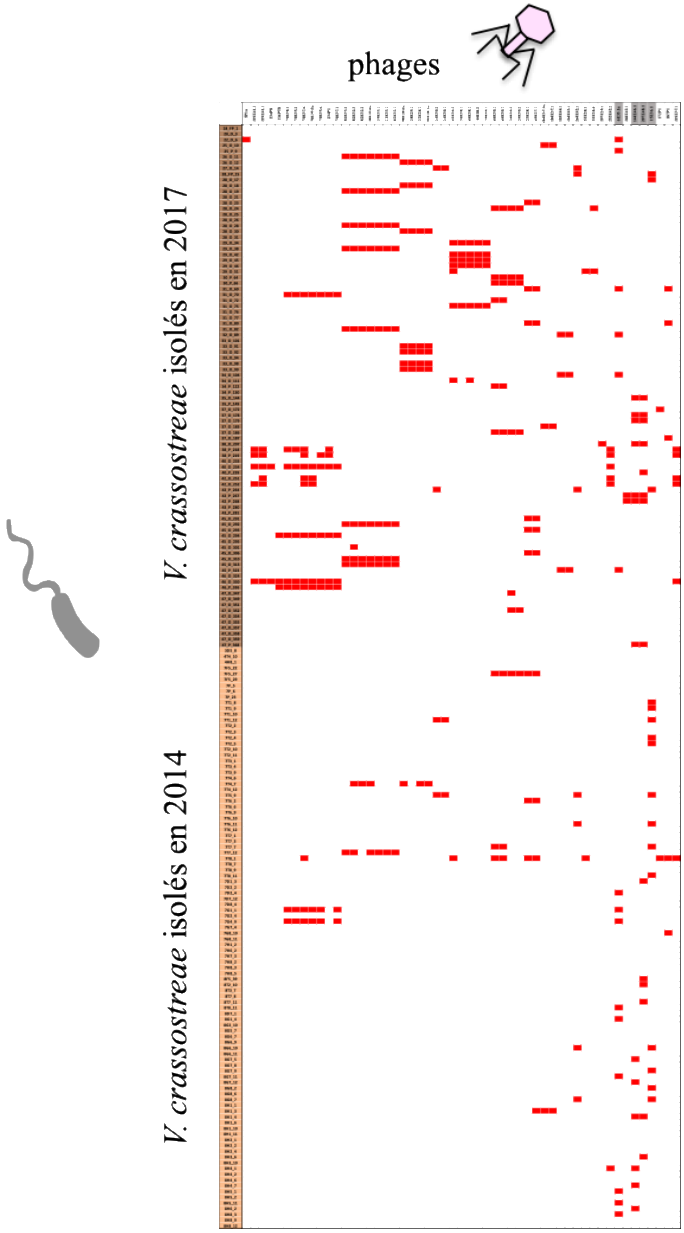


Figure 7 : Matrice d'infection pour l'étude de l'impact temporel des combinaisons vibrio-phage. 53 phages de Brest ont été utilisé pour infecter des souches de *V. crassostreae* isolées en 2014 (n=101 ; marron clair) et en 2017 (n=91 ; marron foncé). Les interactions lytiques sont représentées par un carré rouge. Les cellules grisées indiquent les phages nécessaires pour couvrir 36% des souches isolées en 2014.

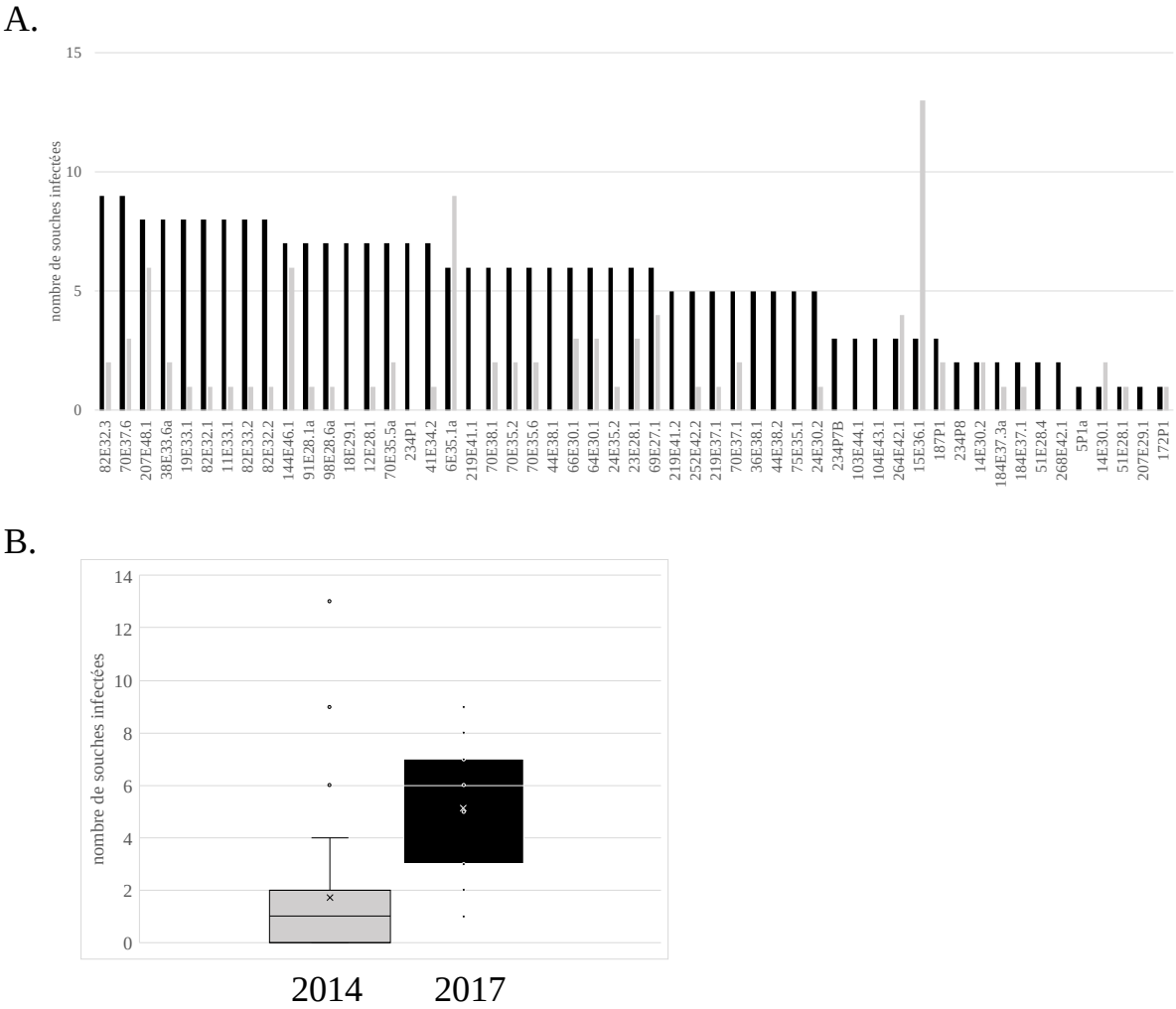


Figure 8 : A. Le graphique représente le nombre de souches de *V. crassostreae* isolées en 2014 (barres grises) et en 2017 (barres noires) infectées par des phages isolés en 2017. **B.** Boite à moustache représentant le nombre de souches de *V. crassostreae* isolées en 2014 et 2017 infectées par les phages isolés en 2017.

L'observation que les interactions dépendent du temps et de l'espace suggère fortement une coévolution phage-vibrio. Il serait intéressant d'évaluer l'adaptation locale sur des distances plus réduites entre sites d'échantillonnage, au sein d'une même ferme ou entre fermes ostréicoles. Les transferts de coquillages infectés pourraient « diluer » ce phénomène.

5. Diversité génomique au sein de *V. crassostreae*.

Le génome de 158 souches de *V. crassostreae* a été séquencé. Le nombre de gènes varie de 4500 à 6368 en fonction des souches et 2498 gènes sont partagés par toutes les souches (génome core). Le pan-génome (ensemble des gènes présents dans tous les génomes) des souches tend à atteindre une asymptote (Chapitre 2, figure 9), ce qui suggère que nous avons échantillonné de manière exhaustive l'ensemble des gènes de cette espèce. L'analyse du

polymorphisme nucléotidique (SNP) indique cependant une grande diversité allélique chez *V. crassostreae* (Chapitre 2, figure 9).

La phylogénie basée sur le génome core permet de regrouper la plupart des souches en 8 clades (Chapitre 2, figure 13, table 3). Ces clades regroupent des souches génétiquement proches, comme en témoigne l'identité nucléotidique forte (ANI) généralement supérieure à 99%. Les souches regroupées dans ces clades peuvent contenir jusqu'à 1699 gènes spécifiques (Chapitre 2, table 3).

Chaque clade de *V. crassostreae* a été détecté à différentes dates de notre échantillonnage et les huîtres peuvent être infectées par différents clades démontrant la nature polyclonale de l'infection par *V. crassostreae* (Chapitre 2, figure 1).

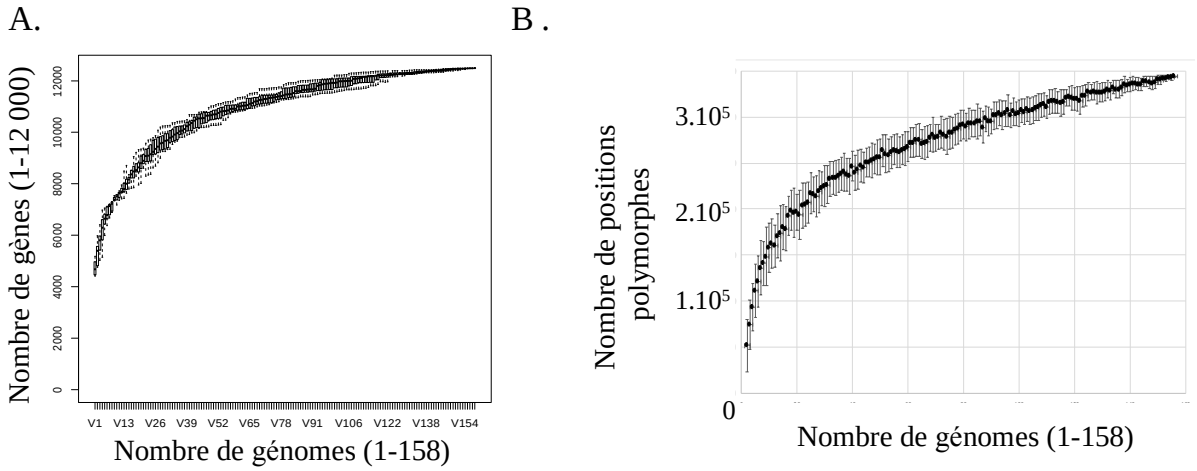


Figure 9 : A. Analyse du pan-génome des 158 souches de *V. crassostreae*. **B.** Analyse du polymorphisme.

clade	souches	ANI	nombre de gènes spécifiques de souche au sein du clade
clade 1	46_O_324	99,9 - 100	25
	7F1_18		17
	46_O_330		6
	46_P_336		16
	31_O_70		7
	45_O_294		8
	40_O_234		5
	7D8_10		54
	42_O_251		6
	42_O_252		3
	38_P_219		6
	38_P_218		6
clade 2	8T2-1	99,8 - 100	102
	J5-4		90
	42_P_264		99
	J5-19		55
	27_O_14		56
	28_O_17		16
	28_FP_15		18
clade 3	47_O_355	98,9 – 99,9	1207
	25_O_10		14
	37_O_183		236
	8T7-4		114
	18_FP_1		35
	J5-5		209
	16BF5-48		16
	31_O_76		378
	31_O_77		18
clade 4	28_O_21	99,9 – 100	60
	33_O_99		4
	33_O_92		38
	33_O_98		5
	28_O_18		5
	26_O_12		6
	33_O_91		5
	28_O_30		10
clade 5	31_O_75	99,8 – 100	2
	29_O_34		2
	29_O_42		2
	29_O_45		2
	29_O_46		2
	34_O_111		8
	29_O_51		47
	45_O_291		4
	28_O_23		5
	45_O_306		5
	45_O_293		3
	28_O_24		46
	J2-13		54
	J2-9		44
	31_O_69		2
	31_O_80		7
	33_O_94		4
	31_O_72		1
	34_P_122		52
	33_O_101		7
	47_O_352		4
	47_O_347		4
	37_O_186		8
	30_P_66		10
	30_P_64		1
	37_O_187		7
	47_O_359		4
	47_O_358		15
	47_O_357		2
	47_O_349		2

clade	souches	ANI	nombre de gènes spécifiques de souche au sein du clade
clade 6	SOS4-4	97,5 – 99,9	98
	7T8_6		161
	8T8-11		326
	GV1675		112
	GV1681		1699
	GV1685		49
	SOT7-11		35
	S16		309
	GV1646		137
	16SF1-51		2
	16SF1-87		2
	SOB1-3		
	SOB6-12		25
clade 7	38_O_207	99,0 – 99,9	92
	GV1649		49
	8T2-10		49
	37_O_178		212
	35_O_144		234
	8H1-4		45
	8T5-11		134
	8F5-39		107
	43_P_280		64
	GV1698		141
	SOS2-11		118
	8T7-11		38
	40_P_239		6
	47_P_368		89
	GV1692		35
	42_P_267		
	42_P_268		29
	SOB1-2		
	37_O_179		26
	GV1679		53
clade 8	J5-15	98,7 – 100	76
	16BF1-56		54
	45_O_301		4
	45_O_310		7
	45_O_313		2
	45_O_292		3
	26_O_11		12
	28_O_28		4
	31_O_82		3
	29_O_38		6
	28_O_19		5
	LGP7		11
	LGP15		288
	J5-28		10
	J5-24		16
	J5-23		17
	16BF1-95		463
	45_O_295		38
	LGP8		222
	J5-6		45
	J5-20		21
	LGP107		13
	LGP108		107

Tableau 3 : Récapitulatif de la composition des 8 clades de *V. crassostreae*. Pour chaque clade, la gamme d'ANI (en %) est indiquée ainsi que le nombre de gènes spécifiques de souche.

6. Diversité des phages infectant *V. crassostreae.*

6.1 Analyses morphologiques des phages et premières classifications.

L'observation en microcopie électronique (MET) des 75 phages sélectionnés a permis de les classer dans l'ordre des Caudovirales (bactériophages à queue dont le génome est constitué d'ADN-db), et aux familles des *Siphoviridae* (n=27), *Podoviridae* (n=34) et *Myoviridae* (n=14) (Chapitre 2, figure 10A, table 4).

La taille des capsides des *Podoviridae* est stable (environ 50 nm) alors que les tailles des capsides des *Siphoviridae* et des *Myoviridae* sont plus variables (Chapitre 2, figure 11A). Ceci

pourrait suggérer des variations de la taille des génomes encapsidés. Le phages à large spectre 6E35.1a est un *Myoviridae* ayant une morphologie similaire au phage géant T4 (Matsuzaki et al. 1992; Miller, Heidelberg, et al. 2003). Ce phage possède une capside d'une hauteur de 124 nm et d'une largeur de 64 nm (Chapitre 2, figure 10B, table 4).

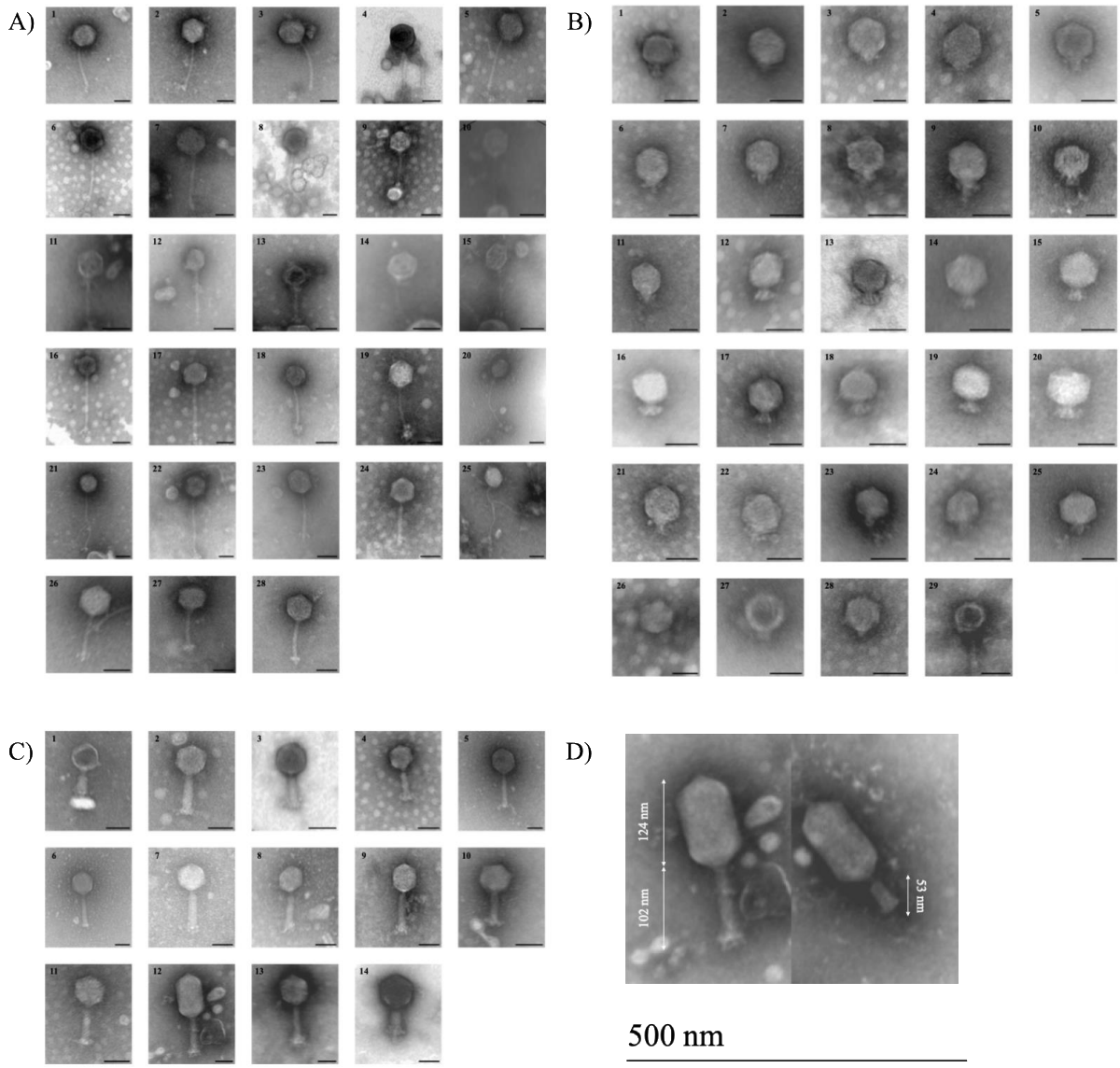


Figure 10 : Observation en microscopie électronique des phages sélectionnés **A.** Planche des phages de la famille des *Siphoviridae*. **B.** Planche des phages de la famille des *Podoviridae*. **C.** Planche des phages de la famille des *Myoviridae*. **D.** Observation morphologique du phage 6E35.1a. La barre d'échelle noire des planches A, B et C correspond à 50 nm.

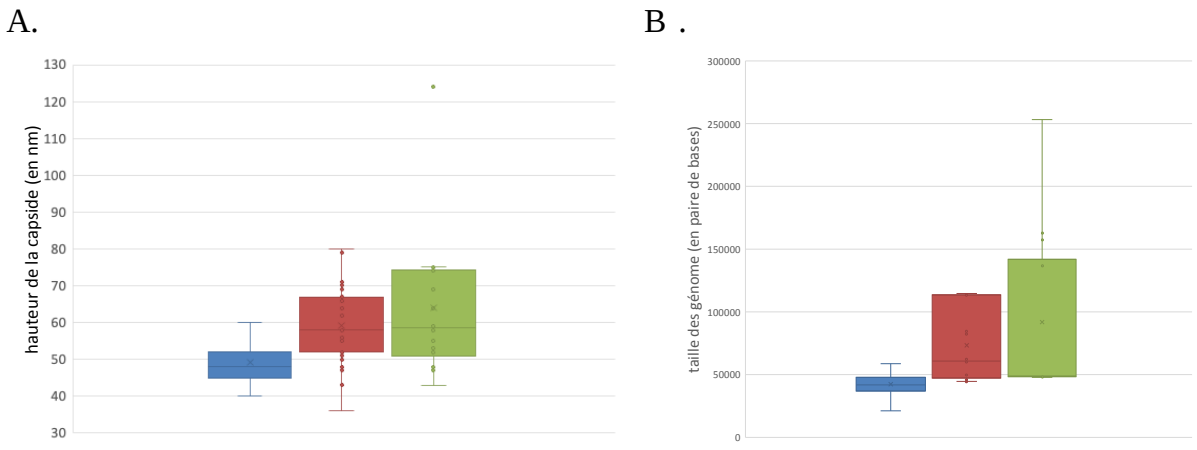


Figure 11 : A. Taille des capsides des Podoviridae (bleu), Siphoviridae (rouge) et Myoviridae (vert). **B.** Variation de la taille des génomes des Podoviridae (bleu), Siphoviridae (rouge) et Myoviridae (vert).

6.2 Séquençage et analyse des génomes de phages.

Les génomes de 71/75 phages ont été séquencés avec succès (Chapitre 2, table 4). La taille des génomes varie en fonction des familles de phages. En effet, les *Podoviridae* possèdent en règle générale des génomes plus petits compris entre 21 kb et 59 kb (Chapitre 2, figure 11, table 4). Les phages appartenant au *Siphoviridae* possèdent un génome d'une taille variant entre 44 kb et 114 kb. Enfin, la taille des génomes des *Myoviridae* varie de 48 kb à 253 kb (Chapitre 2, table 4). Ces observations sont concordantes avec de précédents résultats (Hatfull 2008). Les génomes de plus grosses tailles sont généralement associés à une capside plus grande. L'exemple le plus flagrant concerne le phage 6E35.1a dont la taille du génome est de 253 kb (Chapitre 2, figures 10 et 11 ; table 4).

L'analyse du génome de ces phages révèle une extrême diversité en contenu de gènes. Aucune famille de gènes n'est partagée par l'ensemble de ces phages, limitant la classification phylogénétique. Comme alternative nous avons construit un réseau de familles de gènes regroupant des gènes codant des protéines ayant une identité d'acides aminés minimale de 30% sur 80% de la séquence (Rost 1999) (Chapitre 2, figure 12).

Le partage de familles de gènes a permis de regrouper 56 phages en 14 clusters (Chapitre 2, figure 13, table 4). Au sein de ces clusters, la valeur d'ANI est en général supérieure à 99% sur l'ensemble du génome (Chapitre 2, table 4). Ce réseau de gènes ne rapproche pas les *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Myoviridae* en 3 groupes distincts (chapitre 2, figure 12). Ceci démontre la non pertinence de la classification morphologique des phages et questionne sur la convergence de morphotypes associés à des déterminants génétiques très différents.

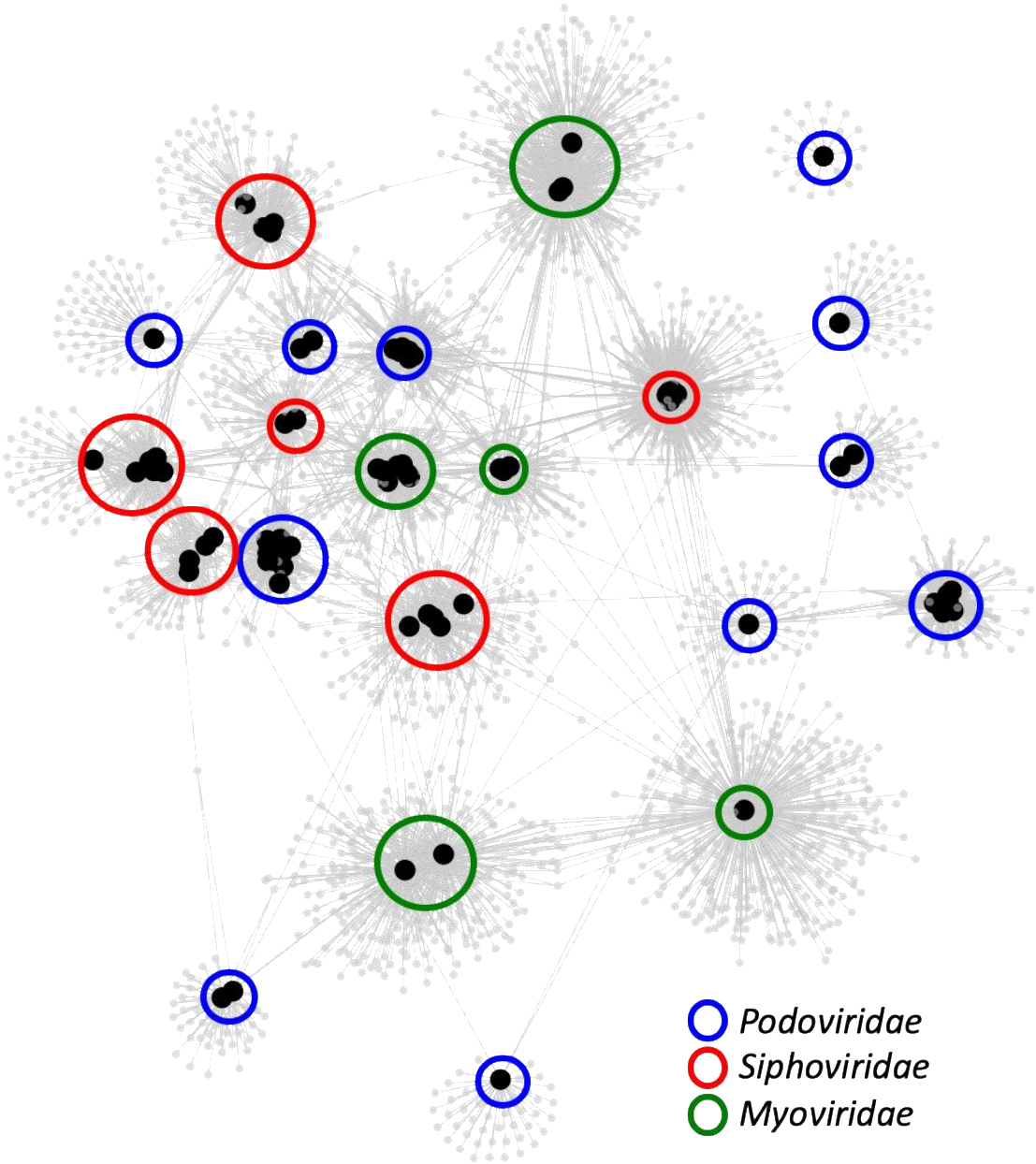


Figure 12 : Le réseau de familles de gènes (% identité AA> 30% ; Lrap> 80%). Chaque point noir représente un phage. Les points gris représentent les familles de gènes. Les familles de gènes partagées entre plusieurs phages sont reliées par un trait gris. Les cercles de couleur mettent en valeur les podoviridae (bleu), siphoviridae (rouge) et myoviridae (vert).

groupe de phage	nom du phage	Classification	dimensions phage (nm)		nombre de souches sensibles	nombre de contigues	taille du génome (kb)	nombre de CDS	%ANI	nombre de tRNA different
			capside (h x l)	queue (h x l)						
P1	5P1a	Podovirus	41 x 43	16 x 14	1	1	37984	53		
P2	219E41.2	Podovirus	58 x 56	10 x 11	5	1	52283	92	96,6 - 99,9	
	219E41.1	Podovirus	58 x 53	10 x 10	6	1	52283	89		
	234P8	Podovirus	60 x 58	6 x 10	2	1	52297	89		
P3	234P7B	Siphovirus	71 x 63	125 x 8	3	1	114079	186	99,6 - 100	16
	70E38.1	Siphovirus	70 x 69	136 x 8	2	9	114898	192		15
	70E35.2	Siphovirus	66 x 76	144 x 8	7	1	114053	188		16
	70E37.6	Siphovirus	66 x 66	163 x 8	10	1	113569	180		16
	70E35.5a	Siphovirus	80 x 74	154 x 8	8	1	114081	184		16
	70E35.6	Siphovirus	66 x 60	148 x 8	6	1	113569	184		16
	234P1	Siphovirus	67 x 63	151 x 8	8	1	113569	180		16
	70E37.1	Siphovirus	79 x 67	174 x 10	2	1	113189	181		16
P4	82E33.2	Siphovirus	52 x 50	89 x 9	9	1	47279	64	99,7 - 99,9	
	82E32.3	Siphovirus	51 x 47	54 x 10	10	1	47214	62		
	82E32.2	Siphovirus	43 x 45	66 x 6	10	1	47278	61		
	38E33.6a	Siphovirus	50 x 45	120 x 10	10	1	47278	61		
	19E33.1	Siphovirus	47 x 47	88 x 10	10	1	47257	62		
	11E33.1	Siphovirus	52 x 47	95 x 7	9	18	49835	71		
	82E32.1	Siphovirus	55 x 40	106 x 7	9	38	47648	66		
P5	PS32B_11	Podovirus	50 x 53	15 x 15	8	1	48140	62	99,9	
	PS32B_2	Podovirus	55 x 53	15 x 11	8	4	45734	57		
	PS32B_6	Podovirus	55 x 54	17 x 17	10	1	48144	62		
	PS32B_1	Podovirus	47 x 47	23 x 19	5	1	48078	62		
	PS35B_3	Podovirus	47 x 49	13 x 13	10	3	47422	63		
	PS32B_3	Podovirus	51 x 61	15 x 21	5	3	47379	62		
	PS35B_1	Podovirus	45 x 47	16 x 14	10	5	44895	56		
P6	98E28.6a	Myovirus	47 x 53	57 x 23	7	1	48607	78	99,9	4
	18E29.1	Myovirus	53 x 54	71 x 11	7	1	48607	78		4
	12E28.1	Myovirus	59 x 52	71 x 15	7	1	48607	79		4
	91E28.1a	Myovirus	43 x 49	66 x 15	7	1	48607	79		4
P7	14E30.2	Siphovirus	52 x 52	157 x 10	3	1	44377	84	99,3	
	14E30.1	Siphovirus	64 x 68	158 x 10	2	1	46078	93		
P8	41E34.2	Podovirus	43 x 43	17 x 18	7	1	36879	37	99,1 - 99,9	
	36E38.1	Podovirus	50 x 47	19 x 32	5	1	36879	39		
	44E38.1	Podovirus	45 x 45	20 x 17	6	1	36879	38		
	44E38.2	Podovirus	45 x 47	16 x 14	5	1	36879	37		
	75E35.1	Podovirus	49 x 51	14 x 16	5	1	36879	37		
	66E30.1	Podovirus	43 x 40	13 x 37	6	1	37128	39		
	64E30.1	Podovirus	44 x 44	15 x 12	6	1	37128	39		
	24E35.2	Podovirus	48 x 55	15 x 25	6	1	37128	38		
	24E30.2	Podovirus	51 x 55	17 x 35	5	1	41981	48		
P9	23E28.1	Podovirus	47 x 54	13 x 16	6	1	40729	45	99,9	
	69E27.1	Podovirus	52 x 47	15 x 21	6	1	40715	46		
P10	184E37.3a	Myovirus	74 x 71	94 x 20	2	1	136417	250	99,9	2
	184E37.1	Myovirus	75 x 80	100 x 20	2	1	136415	254		2
P12	103E44.1	Siphovirus	48 x 46	99 x 12	3	1	44377	55	99,7	
	104E43.1	Siphovirus	52 x 53	104 x 8	3	1	44340	57		
P13	264E42.1	Siphovirus	58 x 50	173 x 10	3	1	82450	92	94,6 - 99,9	
	51E28.1	Siphovirus	36 x 39	91 x 8	1	1	83109	98		
	51E28.4	Siphovirus	69 x 65	200 x 8	2	1	83109	100		
P14	PS10B_1	Siphovirus	55 x 55	126 x 10	1	1	60587	86	94,6	1
	PS34B_1	Siphovirus	62 x 60	85 x 12	1	1	59928	94		1
P15	PG9A_1	Podovirus	40 x 41	10 x 8	1	1	32070	42	99,9	
	PG9A_2	Podovirus	48 x 46	10 x 17	1	1	32070	43		
P16	PS15B_4	Myovirus	55 x 55	84 x 19	1	1	49407	75	97,9 - 99,9	
	PS15B_2	Myovirus	52 x 52	87 x 15	2	1	49478	74		
	PS15B_3	Myovirus	64 x 55	95 x 16	1	1	48480	72		
P17	PS25B_1	Podovirus	45 x 50	15 x 24	1	1	44450	48		
P18	207E29.1	Myovirus	48 x 58	59 x 16	1	1	48367	77		3
P19	PS34B_2	Myovirus	58 x 56	71 x 18	4	1	48100	80		3
P21	PS14A_1	Siphovirus	56 x 62	169 x 8	8	1	84620	98		
P22	252E42.2	Podovirus	58 x 53	10 x 10	6	1	58955	72		
P23	6E35.1a	Myovirus	124 x 62	102 x 14	22	1	253432	407		18
P24	PS17B_1	Siphovirus	58 x 55	86 x 7	2	1	61131	90		4
P25	268E42.1	Siphovirus	64 x 64	101 x 10	3	1	60078	92		
P26	PS65A_1	Siphovirus	67 x 61	100 x 13	1	1	62006	97		1
P27	144E46.1	Myovirus	75 x 63	60 x 29	14	1	157567	211		3
P28	207E48.1	Myovirus	69 x 43	55 x 16	17	1	162787	223		4
P29	15E36.1	Podovirus	52 x 52	10 x 14	6	3	45285	49		
P30	172P1	Podovirus	52 x 47	13 x 12	1	5	48561	71		3
P31	187P1	Podovirus	47 x 46	16 x 11	3	5	21473	23		
ND	PS35B_4	Podovirus	45 x 47	16 x 14	9	ND	ND	ND	ND	ND
ND	219E37.1	Podovirus	67 x 57	10 x 10	6	ND	ND	ND	ND	ND
ND	51E28.5	Podovirus	45 x 47	16 x 14	1	ND	ND	ND	ND	ND
ND	PS39A_1	Podovirus	45 x 47	16 x 14	1	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 4 : Caractéristiques phages séquencés lors de cette étude. Les cellules grisées indiquent les phages infectant le plus de souches.

6.2 Recherche de phages tempérés.

Afin de contrôler que les phages séquencés ne sont pas des phages tempérés nous avons premièrement recherché leur présence dans les génomes de *V. crassostreae* de notre collection. Cette technique ne nous a pas permis d'identifier de phage tempéré. Nous avons ensuite recherché la présence d'intégrases dans les génomes des phages séquencés. Seuls deux phages (PG9A_1 et PG9A_2) appartenant au cluster (P15) possèdent un gène codant une intégrase putative (Chapitre 2, table 5). Ces phages ne sont pas retrouvés dans les génomes de *V. crassostreae* dont nous disposons. La nature tempérée de ces phages doit être explorée génétiquement.

Phage	cluster	Gène	Description
PG9A_1	P15	PODOV009_v1_p0030	Prophage integrase IntA, putative
PG9A_2		PODOV080_v1_p0033	Prophage integrase IntA, putative

Tableau 5 : Identification de la présence d'intégrases.

6.3 Présence d'ARN de transfert.

Les phages utilisent la machinerie cellulaire de réplication et d'expression qu'ils peuvent compléter avec leur propre information génétique pour atteindre une meilleure fitness (Bailly-Bechet et al. 2007). Les phages virulents semblent coder plus fréquemment des ARNts que les phages tempérés (Bailly-Bechet et al. 2007). Il a été proposé que les ARNt permettraient d'infecter un plus large spectre d'hôtes (biais de codon) (Bailly-Bechet et al. 2007; Miller, Heidelberg, et al. 2003).

Vingt-quatre phages de notre collection possèdent des ARNts (Chapitre 2, table 6). Le nombre d'ARNt différents varie de 1 (ex : PS65A_1, P26) à 18 (ex : 6E35.1a, P23). Les ARNt les plus fréquemment retrouvés sont : $ARNt_{-Gln}$ (14/24), $ARNt_{-Asn}$ (13/24), $ARNt_{-Gly}$ (13/24), $ARNt_{-Leu}$ (13/24), $ARNt_{-Pro}$ (13/24) et $ARNt_{-Met}$ (12/24). Certains ARNt peuvent être présents en deux ou trois copies dans le génome tel que $ARNt_{-Arg}$, $ARNt_{-Asp}$, $ARNt_{-Leu}$, $ARNt_{-Met}$ et $ARNt_{-Ser}$. Le phage 6E35.1a, ayant le plus d'ARNt différents (n=18), a le plus large spectre. Cependant d'autres phages possèdent 15 ARNt mais ne sont capables d'infecter que deux souches. Il est donc difficile sur la base de ces données d'établir un lien entre le nombre d'ARNt et le spectre d'hôte des phages.

phages	clusters de phage	nombre de souches sensibles	nombre d'ARNt différent (logitiel tRNAscan-SE 2.0)	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Thr	Trp	Val	Tyr	Gln	Pro
6E35.1a	P23	22	18	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1	1		
70E37.6	P3	10	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
70E35.5a	P3	8	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
234P1	P3	8	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
70E35.2	P3	7	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
70E35.6	P3	6	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
234P7B	P3	3	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
70E37.1	P3	2	16			1	2	1	1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
70E38.1	P3	2	15			1	1		1		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1		1	1
207E48.1	P28	17	4		1	1				1					1								
98E28.6a	P6	7	4							1			1									1	1
18E29.1	P6	7	4							1			1									1	1
12E28.1	P6	7	4							1			1									1	1
91E28.1a	P6	7	4							1			1									1	1
PS17B_1	P24	2	4							1					1		1				1		
144E46.1	P27	14	3		1					1					1								
PS34B_2	P19	4	3			1				1												1	
172P1	P30	1	3							1												1	1
207E29.1	P18	1	3		1					1							2						
184E37.3a	P10	2	2			1				1													
184E37.1	P10	2	2			1				1													
PS10B_1	P14	1	1																		1		
PS34B_1	P14	1	1																		1		
PS65A_1	P26	1	1																1				

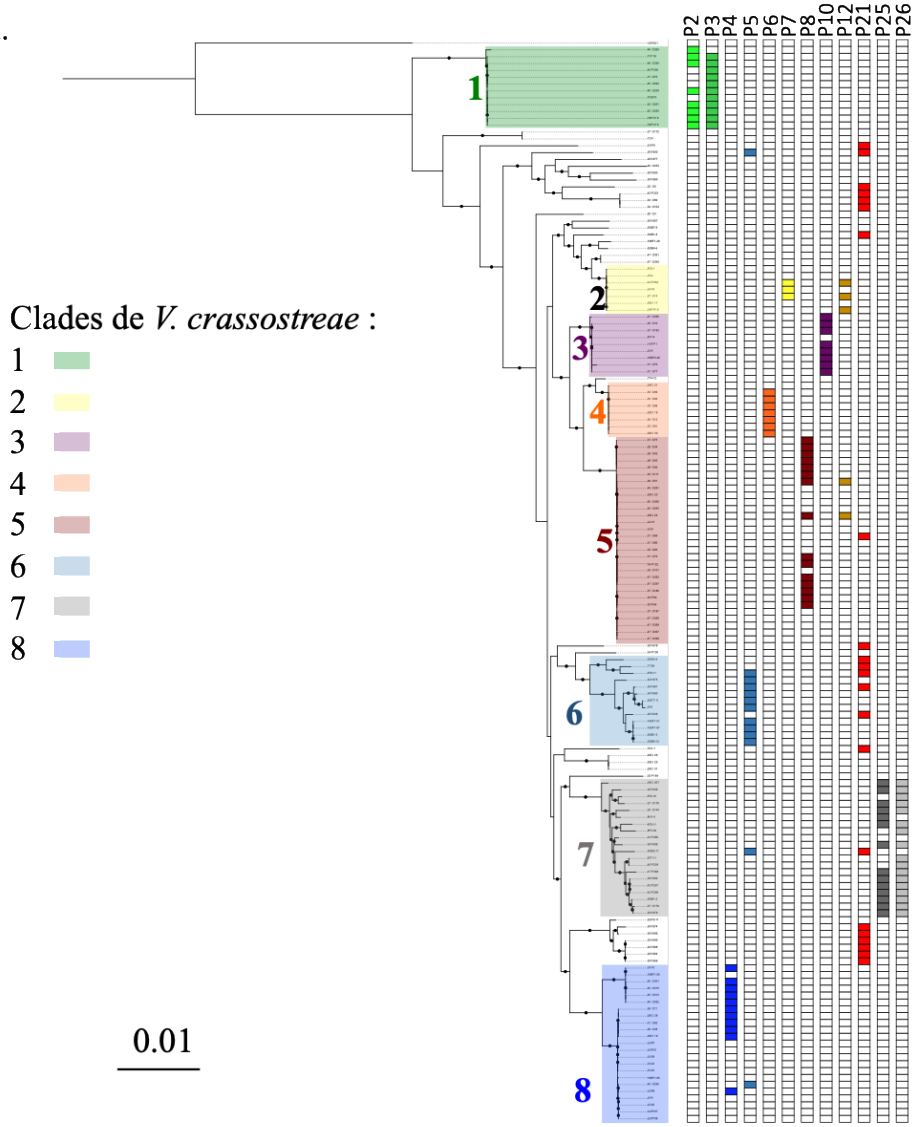
Tableau 6 : Identification des ARNs de transfert.

7. Détermination de l'unité de prédation des phages.

L'analyse globale des interactions phage-bactéries indique une forte spécificité des interactions (Chapitre 2, figure 13). Dans la plupart des cas, des clusters de phages infectent les souches appartenant à un clade spécifique de *V. crassostreae*. Par exemple, les phages appartenant aux clusters P2 et P3 infectent exclusivement des souches de vibrios appartenant au clade 1, alors que les phages appartenant au cluster P8 infectent exclusivement des souches de vibrios du clade 5. Seuls les clusters de phages P2, P4, P5, P13 et P23 sont capables d'infecter des souches appartenant à différents clades de *V. crassostreae*.

L'ensemble de ces résultats nous amène à proposer le clade de vibrios et le cluster de phages comme unité de prédation.

A.


P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P10
P12
P21
P25
P26
1
2
3
4
5
6
7
8
Clades de *V. crassostreae* :
1
2
3
4
5
6
7
8
0.01

B.

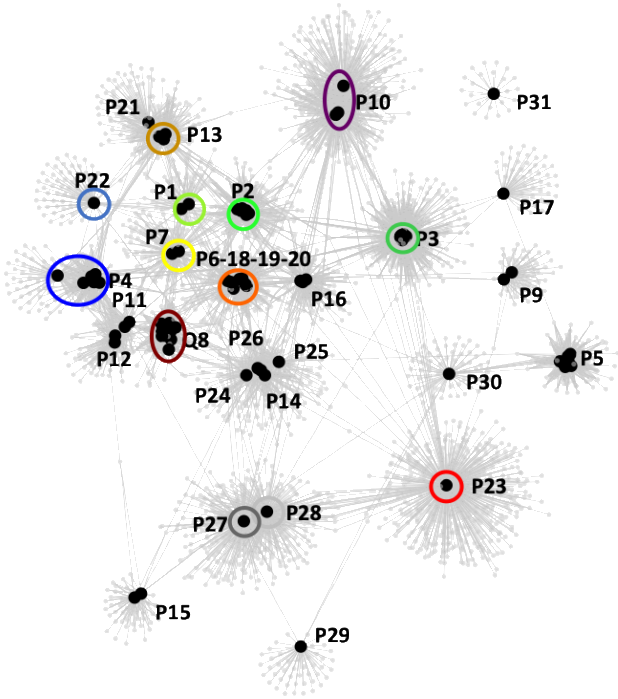

P10
P31
P21
P13
P22
P1
P2
P17
P7
P3
P6-18-19-20
P4
P11
P16
P9
P8
P26
P12
P25
P5
P30
P24
P14
P23
P27
P28
P15
P29

Figure 13 : Le clade de vibrio correspond à l'unité de prédation par les phages. **A.** L'arbre phylogénétique (maximum de vraisemblance) du core génome des 158 souches de *V. crassostreae* permet de regrouper les souches en 8 clades surlignés par un code couleur. Les carrés représentent les interactions lytiques des différents clusters de phages. L'ensemble des clusters de phages n'est pas représenté sur cette figure. **B.** Le réseau de familles de gènes met en valeur les différentes populations de phages. Les populations encerclées sont celles indiquées en A).

Nous avons étudié le réseau d'interaction phage-vibrio à l'échelle de l'unité de prédation pour le cluster de phage P3-clade 1 de vibrio et le cluster de phage P8-clade 15 de vibrio car ils sont les plus représentés.

Le cluster P3 contient 9 phages dont le profil d'infection présente une hiérarchie de résistance des vibrios et de virulence des phages caractéristique d'un profil de type imbriqué (Chapitre 2, figure 14A). En effet, les souches 46_O_324 et 46_O_330 sont respectivement résistantes et sensibles à tous les phages. De plus, le phage 294E48_1 est capable d'infecter la majorité des souches du clade 1 alors que le phage 234P7B n'est capable d'infecter que 3/12 souches.

Les phages du cluster P8 se répartissent en deux sous-groupes infectant spécifiquement un sous-groupe de souches au sein du clade 5 de *V. crassostreae*, ou modules (Chapitre 2, figure 14B).

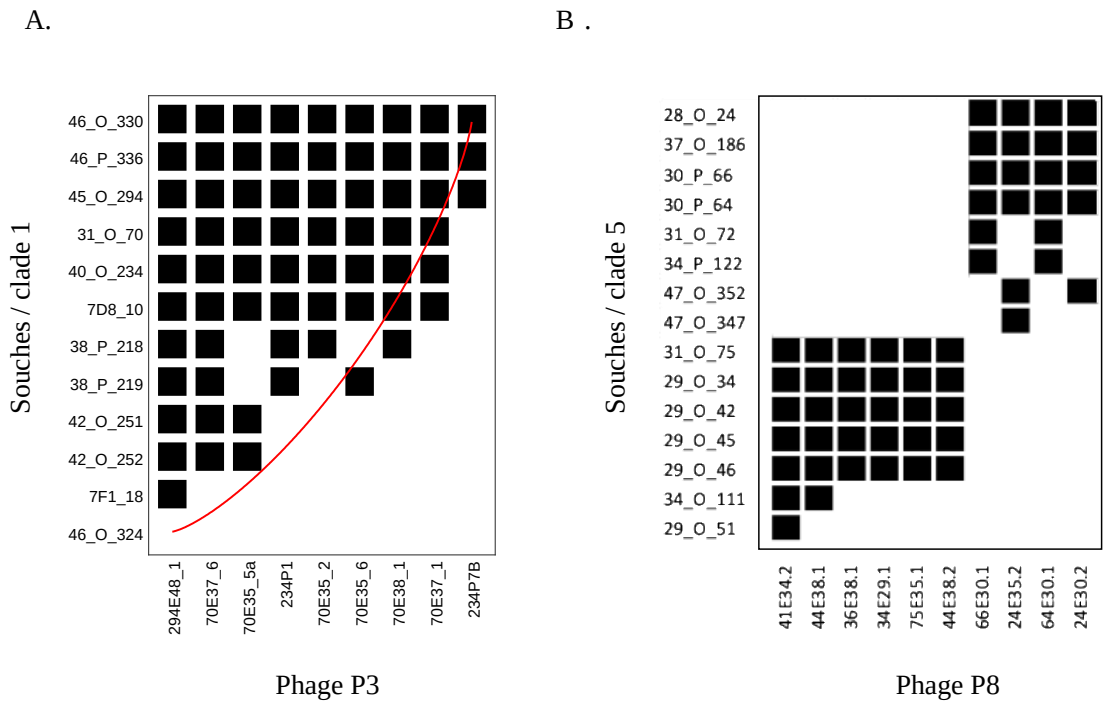


Figure 14 : Détermination des profils entre clusters de phages et clade de souches de *V. crassostreae*. Les carrés représentent les interactions lytiques entre phages (abscisse) et bactéries (ordonnée). La ligne rouge représente la tendance d'infection des phages. **A.** profil imbriqué entre les phages P3 et le clade 1 (Valeur d'imbrication = 0,7646, Z-score = 1,4902). **B.** profil modulaire entre les phages P8 et le clade 5 (Qb = 0.4841, Qr = 1).

Ces différents types de profils nous permettent d'émettre des hypothèses quant au scénario coévolutif des interactions phage-vibrio (Weitz et al. 2013; Gandon et al. 2008). En effet, les matrices de type imbriqué pourraient indiquer une dynamique de type de course aux armements. Dans ce mode de coévolution antagoniste, l'hôte (ici le vibrio) et le parasite (le phage) développent successivement des mécanismes de résistance et de contre-résistance qui persistent dans le temps. Comme ce type d'évolution peut avoir un coût pour le phage et les bactéries, il pourrait ne pas être stable dans les environnements naturels. La modularité indique une interaction phage-hôte très spécifique. Lorsque l'hôte développe une résistance, le phage évolue pour infecter l'hôte résistant, mais perd la capacité d'infecter l'hôte ancestral, ce qui entraîne une sélection fluctuante entre les génotypes de l'hôte et du phage. Ces hypothèses doivent être validées par la mise en évidence de mécanismes génétiques à l'origine de ces interactions.

8. Premières explorations des mécanismes d'interaction vibrios-phages.

8.1 Génomique comparative des souches de *V. crassostreae.*

Cette partie contient des résultats préliminaires de recherche de gènes impliqués dans la résistance chez les vibrios et de virulence chez les phages. Pour cela nous nous sommes focalisés sur deux unités de prédation, vibrio clade 1-phage P3 et vibrio clade 5-phage P8, en raison d'une bonne représentation en nombre des phages et de souches bactériennes.

Vibrio clade 1-phage P3 :

En utilisant la plateforme Mage (Matériel et méthodes), nous avons recherché les gènes présents uniquement chez toutes les souches résistantes (maxLrap 80%, >60% identités) et absents de toutes les souches de vibrios sensibles pour chacun des phages. Nous avons pu identifier des déterminants potentiels de résistance uniquement chez les souches 7F1_18 et 46_O_324 résistantes aux phages 294E48_1 et 70E37_6 alors que les 10 autres souches de vibrios sont sensibles à ces phages (Chapitre 2, figure 15A,a).

Les 19 gènes spécifiques des souches résistantes se localisent dans un unique îlot génomique. La présence de gènes codant une hélicase, une relaxase et une recombinase montre que ce locus provient d'un HGT (Chapitre 2, figure 15A). Un système de restriction/modification de type III pourrait être impliqué dans la résistance contre les phages, et va faire l'objet d'approches de mutagénèse (Chapitre 2, figure 15A).

Les systèmes de restriction-modification sont constitués de deux enzymes, une méthyltransférase (MTase) et une endonucléase de restriction (REase). La REase digère l'ADN au niveau de sites spécifiques. La longueur de ces sites étant réduite (quelques acides nucléiques), ces sites sont également présents sur le chromosome bactérien. Pour éviter la dégradation de l'ADN de l'hôte, une méthyltransférase (MTase) permet la méthylation de l'ADN au niveau de ces mêmes sites spécifiques. Ce système permet donc la dégradation d'ADN étranger non méthylé tel que celui des phages (Stern and Sorek 2011).

Vibrio clade 5-phage P8 :

Il est possible d'identifier deux groupes de phages et de vibrios sur la base des profils d'infection. Chez le premier groupe de vibrios (Chapitre 2, figure 15B, b) un unique îlot génomique partagé par toutes les souches résistantes et absent de toutes les souches sensibles contient 12 gènes, 9 codant des protéines de fonctions inconnues, les 3 autres codent une putative ATPase impliquée dans la réparation de l'ADN, une recombinase et une résolvase (Chapitre 2, figure 15B).

Chez le second groupe de vibrios (Chapitre 2, figure 15B, c), quatre îlots génomiques sont présents chez toutes les souches résistantes et absents de toutes les souches sensibles (Chapitre 2, table 7). Parmi eux, un îlot comprend 22 gènes, dont 6 codent un système de modification/restriction phosphorothioation-dépendant. Ce système permet également la dégradation de l'ADN étranger. Il ne repose pas sur la méthylation de l'ADN bactérien au niveau des bases nucléiques mais sur la modification du phosphorothioate se produisant sur le squelette sucre-phosphate de l'ADN. Le remplacement de l'oxygène par le soufre confère une résistance aux nucléases (Lianrong Wang et al. 2007; Xiong et al. 2019). La présence d'une intégrase à l'extrémité de cet îlot suggère qu'il provient de l'intégration d'un phage tempéré dans le génome.

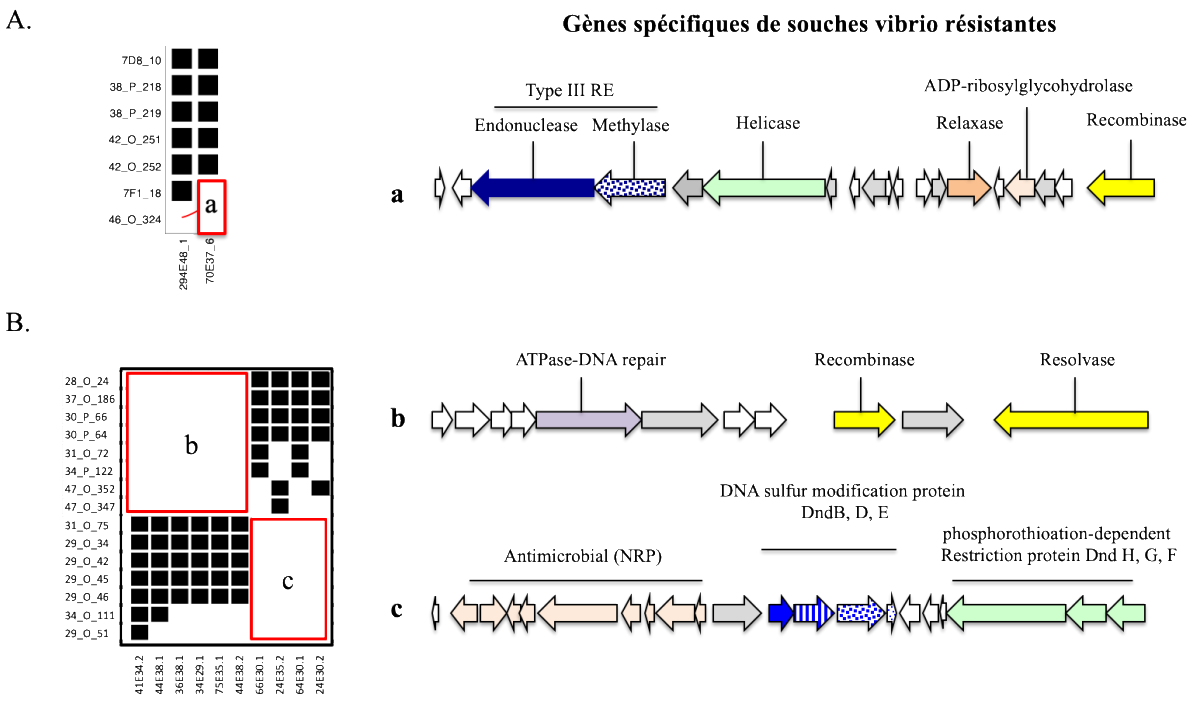


Figure 15 : Génomique comparative des souches de *V. crassostreae*. **A.** Génomique des souches 46_O_324 et 7F1_18, résistantes aux phages P3. **B.** Génomique comparative des souches *V. crassostreae* sensibles aux phages du cluster P8. Les lettres a, b et c indiquent les souches possédant un locus spécifique potentiellement impliqué dans la résistance.

Label	Product	commentaire
REV034_v1_340019	protein of unknown function	
REV034_v1_340020	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340021	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340022	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340023	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340024	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340025	Aminobenzoate oxygenase	
REV034_v1_340026	Cupin	
REV034_v1_340027	2-isopropylmalate synthase	
REV034_v1_340028	protein of unknown function	
REV034_v1_340029	**Putative methytransferase dndA?**	
REV034_v1_340030	**DNA sulfur modification protein DndB**	
REV034_v1_340031	**Putative Phosphoadenosine phosphosulphate reductase DndC**	
REV034_v1_340032	**DNA sulfur modification protein DndD**	
REV034_v1_340033	**DNA sulfur modification protein DndE**	
REV034_v1_340034	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_340035	conserved membrane protein of unknown function	
REV034_v1_340036	protein of unknown function	
REV034_v1_340037	**DNA phosphorothioation-dependent restriction protein DptH**	
REV034_v1_340038	**DNA phosphorothioation-dependent restriction protein DptG**	
REV034_v1_340039	**DNA phosphorothioation-dependent restriction protein DptF**	
REV034_v1_340040	protein of unknown function	puis integrase
REV034_v1_390030	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390032	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390033	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390042	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390043	protein of unknown function	
REV034_v1_390056	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390057	Chromosome partitioning protein ParA	
REV034_v1_390059	**Plasmid maintenance system antidote protein HigA**	
REV034_v1_390060	**Plasmid maintenance system toxin protein HigB**	
REV034_v1_390062	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_390064	protein of unknown function	
REV034_v1_390065	conserved protein of unknown function	fn de contigue 3 gènes après
REV034_v1_560001	conserved protein of unknown function	début de contigue
REV034_v1_560002	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560003	WYL domain-containing protein	
REV034_v1_560004	conserved exported protein of unknown function	
REV034_v1_560006	protein of unknown function	
REV034_v1_560007	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560008	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560009	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560010	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560011	ATP-binding protein	
REV034_v1_560012	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560013	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_560014	Transcriptional regulator	fin de contigue
REV034_v1_650001	conserved protein of unknown function	début de contigue
REV034_v1_650002	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_650003	Integrase	
REV034_v1_650004	conserved protein of unknown function	
REV034_v1_650005	Reverse transcriptase family protein	fin de contigue

Tableau 7 : Génomique comparative des souches *V. crassostreae* résistantes à P8 (figure 15B c). Les cellules grisées indiquent les différents clusters de gènes.

8.2 Génomique comparative des phages.

Nous avons comparé les génomes des phages en fonction de leur spectre d'hôte. Nous avons pu identifier des potentiels déterminants génétiques de l'infection uniquement pour les phages du cluster P8 qui se partage en deux groupes (Chapitre 2, figure 16).

Trois gènes sont spécifiques des phages P8-1. Ceux-ci codent une protéine conservée de fonction inconnue possédant un domaine « phage_Lambda_P », une méthylase et une protéine de fonction inconnue (Chapitre 2, figure 16).

Deux gènes sont spécifiques des phages P8-2 (Chapitre 2, figure 16). Le premier code une protéine conservée de fonction inconnue et le second code une PAPS réductase/N-6-adénine

méthyltransférase possédant un domaine conservé avec un gène (N-6-adénine méthyltransférase) du cluster P8-1 (Chapitre 2, figure 16).

Il est connu que les phages peuvent coder des méthylases pour protéger leur génome en réponse aux systèmes restriction/modification des bactéries (Stern and Sorek 2011). Le rôle de ce locus dans le spectre d'hôte devra être validé génétiquement.

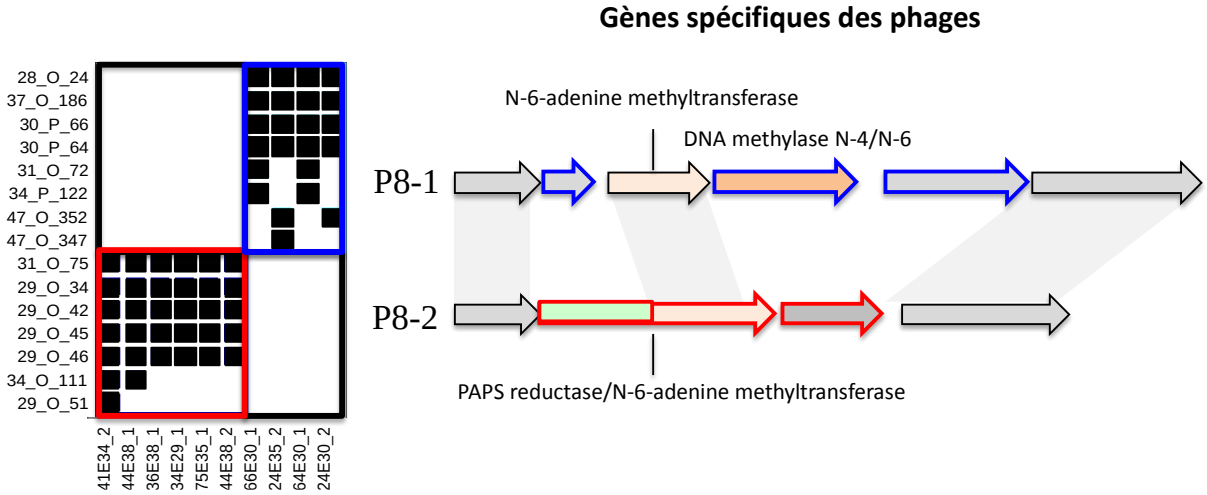


Figure 16 : Génomique comparative du cluster de phages P8. Les gènes de couleur bleue et rouge sont respectivement spécifiques des phages infectant les clusters bleu et rouge de la matrice d'infection. Les gènes gris sont des gènes partagés entre les deux groupes de phages.

En conclusion, nous avons pu identifier quelques gènes candidats de la résistance des vibrios et de la virulence des phages. Nos critères sont probablement trop stricts, les souches de vibrios trop diverses pour retracer l'histoire évolutive de ces interactions. Il sera nécessaire dans l'avenir d'utiliser une plus large collection de vibrios et de phages ainsi que d'autres approches bio-informatiques pour évaluer les scénarios co-évolutifs.

9. La résistance au phage aurait un coût dans l'hémolymphe.

La théorie prédit que l'évolution de la résistance aux phages virulents est limitée par un coût pour la fitness de la bactérie (trade-off) (Bull & Lauring, 2014 ; Sumrall et al., 2019). La fitness des bactéries dépend de l'environnement. La mise en évidence de trade-off peut donc requérir un milieu spécifique, pauvre en nutriments et/ou plus proche des conditions biotiques (cellules immunitaire, compétiteurs).

Nous avons analysé la dynamique d'infection de la souche 35_O_144 (clade 7) par le phage 144E46.1 (P27) dans 3 conditions de culture : milieu de culture Zobell, plasma (hémolymphe centrifugée pour éliminer les hémocytes et filtrée sur 0.2 µm) et hémolymphe d'huîtres (Chapitre 2, figure 17).

Deux heures après infection par le phage, une diminution faible de la densité bactérienne est observée de façon similaire dans les trois milieux testés (Chapitre 2, figure 17). Pendant cette période, la cinétique du phage est marquée par un temps de latence où la quantité de phages reste stable dans les trois milieux.

Après 6 heures d'infection, aucune bactérie n'est détectée dans le milieu zobell et le plasma contrairement à l'hémolymphe où 10^4 CFU/mL sont détectés (Chapitre 2, figure 17). Pendant cette période, la quantité de phages augmente d'un facteur 10 (plasma et hémolymphe) à 100 (zobell), correspondant à la taille du burst et témoignant d'une production de phages concomitante au déclin bactérien (Chapitre 2, figure 17).

Après 24 heures d'infection, la densité bactérienne dans le milieu de culture et le plasma redevient similaire à la condition témoin (sans phages) indiquant l'émergence de clones résistants au phage. Cependant, ce phénomène n'est pas observé dans l'hémolymphe où aucune bactérie cultivable n'est détectée (Chapitre 2, figure 17).

Les phages exercent une forte pression de sélection sur la population hôte, ce qui peut favoriser l'émergence de variants résistants aux phages. Les bactéries peuvent développer de multiples mécanismes de défense contre les infections par les phages tels que des mutations provoquant des codons d'arrêt prématurés, des décalages de cadres de lecture et des modifications d'acides aminés de protéines nécessaires au cycle du phage. Une analyse des mécanismes de résistance mis en place par la bactérie reste donc à réaliser.

Des études ont montré que certains variants bactériens résistants à un phage pouvaient retrouver leur sensibilité à l'infection par le phage après une nouvelle mise en culture en l'absence de pression de sélection par le phage (Heierson et al. 1986; Castillo et al. 2019). Ceci suggère un recours à d'autres mécanismes de protection, tels que la formation de biofilm, la répression de certains récepteurs et l'inactivation des phages par des protéases. Des expérimentations complémentaires devront être effectuées sur des cultures de ce(s) variant(s) afin de vérifier le maintien ou non de la résistance au phage.

Lorsque le récepteur joue un rôle dans la virulence ou la fitness de la bactérie (trade-off), la résistance au phage peut être associée à une diminution de la pathogénicité. Ainsi, chez *V. cholerae*, la modification de l'expression ou la mutation de l'antigène O du LPS permettant la résistance au phage, diminue l'infectiosité de la bactérie chez la souris (Seed et al. 2012; Zahid et al. 2008). Au cours de cette expérimentation, nous observons également un phénomène de trade-off. Il semblerait que la multiple résistance aux phages, microbiote et/ou

hémocyte (cellules immuno-compétentes) a un coût trop important pour la bactérie, limitant l'apparition de résistance. Il reste à déterminer qui du microbiote et/ou des cellules immunitaires restreint l'apparition de résistant. Ce phénomène est particulièrement intéressant dans le cas d'une phage thérapie par exemple.

D'autres expériences sont à mener pour connaître si ce phénomène est généralisable à l'ensemble des phages/bactéries de notre collection. L'observation de trade-off entrainant une réduction de la pathogénicité pourrait permettre d'identifier de nouveaux mécanismes de virulence bactériens.

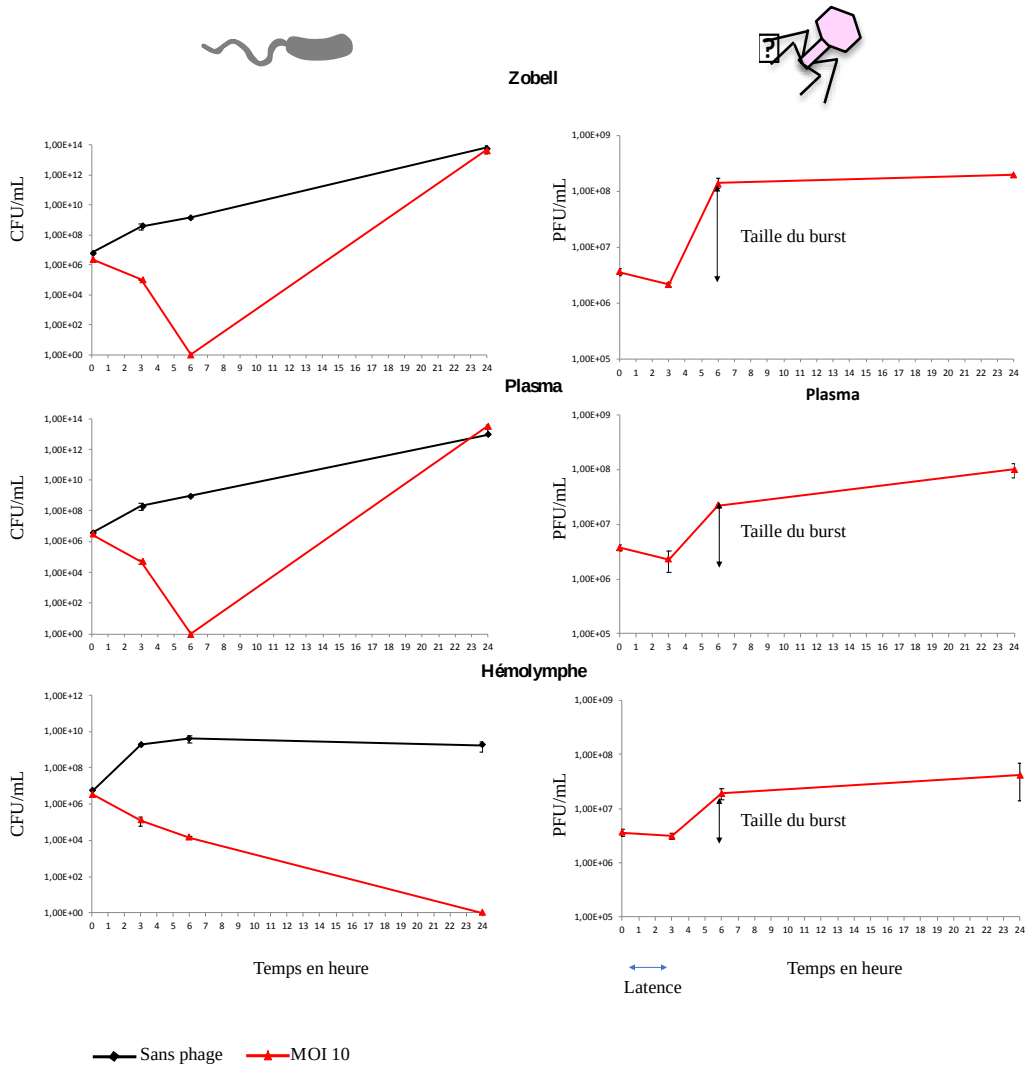


Figure 17 : Dynamique d'infection de la souche 35_O_144 (clade 7) par le phage 144E46.1 (Q27) à une MOI de 10 dans trois conditions : milieu de culture Zobell, plasma et hémolymphe d'huîtres. Les graphiques de gauche représentent la concentration (en CFU/mL) de la souche 35_O_144 dans les trois conditions de culture. Les graphiques de droite représentent la concentration (en PFU/mL) du phage 144E46.1. Les flèches bleue et noire représentent respectivement le temps de latence et la taille du burst.

10. La famille des T4 giant phages.

Le phage ayant le plus large spectre d'hôte (6E35.1a) a retenu notre attention en raison de sa morphologie singulière (Chapitre 2, figure 10), la taille de son génome et la présence de familles de gènes présentant de fortes similitudes avec un autre phage infectant les vibrios, KVP40. KVP40 initialement décrit comme un phage capable d'infecter au moins 8 espèces de vibrios (Matsuzaki et al. 1992) a été utilisé dans des essais de phage thérapie pour contrôler les infections de poissons par *V. anguillarum* (Rørbo et al. 2018; Castillo et al. 2019; Tan, Dahl, and Middelboe 2015; Tan, Svenningsen, and Middelboe 2015). Le récepteur de ce phage a été identifié, il s'agit de la protéine de la membrane externe K (OmpK). Le génome de KVP40 a été séquencé par Miller et coll et constitue une référence pour caractériser les phages de cette famille nommés T4 giant phages (Miller, Heidelberg, et al. 2003).

10.1 Généralités sur le phage 6E35.1a.

L'assemblage du génome du phage 6E35.1a a permis l'obtention d'un contig unique de 253 432 pb avec un pourcentage moyen en GC de 43,78%. L'assembleur utilisé pour reconstruire le génome est basé sur la méthode dite des « graphs de-Bruijn » (Bankevich et al. 2012) qui offre la possibilité d'explorer la manière dont le contig de 6E35.1a a été généré et d'en déduire la topologie du chromosome du phage. Il semble ici très clair que le chromosome de 6E35.1a peut se circulariser puisque chacun des nœuds d'assemblage sont reliés à un autre sans présence de cassures (Chapitre 2, figure 18). Ces résultats corrèlent avec la description précédente du génome des phages KVP40 (Miller, Heidelberg, et al. 2003) et T4 (Miller, Kutter, et al. 2003). La topologie circulaire résulte de répétitions aux extrémités qui sont générées lors de l'empaquetage du chromosome à la fin du cycle lytique et qui permettent la réplication du phage par « cercle roulant » au moment de l'infection (Miller, Kutter, et al. 2003). On peut donc conclure à un même mode de réplication et d'encapsidation pour le phage 6E35.1a.

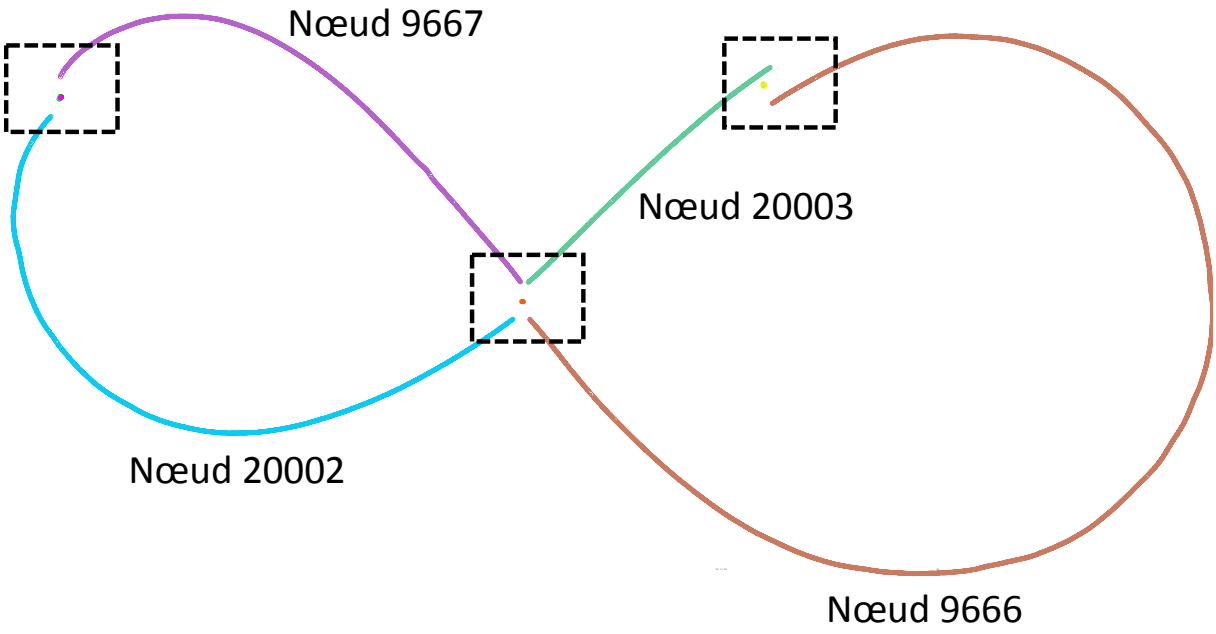


Figure 18 : Graphique d'assemblage du contig unique de 6E35.1a. Lors de l'assemblage, les « reads » sont assemblés en « nœuds » qui sont interrompus par des répétitions (représentées au sein des carrés hachurés). L'utilisation de lectures dites « paired-end » va par la suite permettre de résoudre ces répétitions et aboutir à un contig unique (Maxime Bruto, pers. com).

L'annotation syntaxique du phage 6E35.1a par Mage (http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) a permis de prédire 403 gènes et 23 ARNt fonctionnels. L'annotation manuelle de ces gènes a permis d'assigner une fonction putative à 102 gènes répartis en 6 grands groupes fonctionnels (Chapitre 2, figure 19).

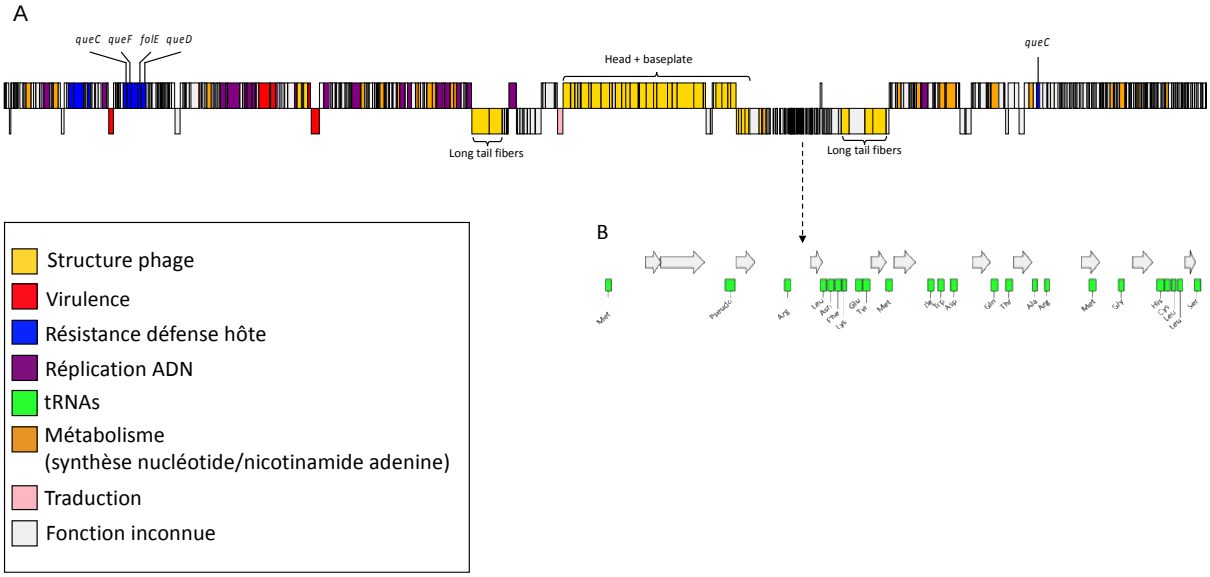


Figure 19 : Organisation du génome du phage 6E35.1a. **A.** L'annotation manuelle de ces gènes a permis d'assigner une fonction putative à 102 gènes répartis en 6 grands groupes fonctionnels représentés par le code couleur. **B.** organisation des ARNs de transfert.

10.2 Gènes de structure du phage.

Les gènes de structure du phage sont codés au sein de 3 loci différents avec une grande région génomique contenant les gènes de synthèse de la capside, de la queue et de la plaque basale. La comparaison de cette région avec les phages T4 et KVP40 montre globalement une bonne conservation de cette région au sein des trois phages (Chapitre 2, figure 20). Les protéines de synthèse de la queue et de la tête sont notamment très bien conservées avec des identités de séquences en acides-aminés supérieures à 40%. Les protéines de la plaque basale semblent être moins conservées, notamment par rapport au phage T4. Neuf gènes codant des protéines impliquées dans la formation de la baseplate sont spécifiques à KVP40/6E35.1a suggérant une fonction spécifique aux T4 giant phages. La disponibilité d'une dizaine de génomes de cette famille (données K. Kaufman, MIT) permettra de valider cette hypothèse.

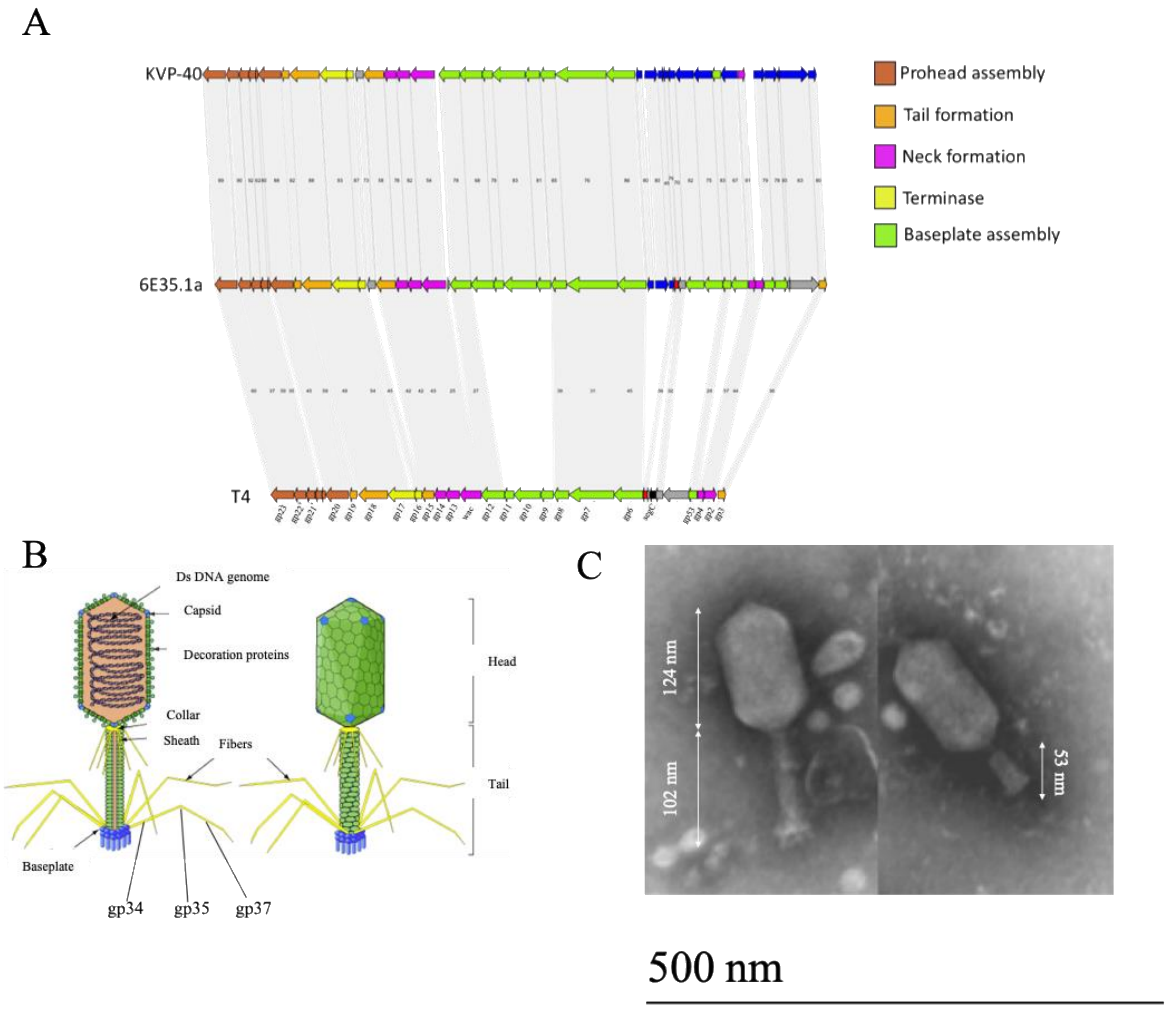


Figure 20 : A. Comparaison du locus de gènes de structure du phage avec KVP40 et T4. **B.** Représentation schématique du phage KVP40 (modifié de https://viralzone.expasy.org/2820?outline=all_by_species). **C.** Observation microscopique du phage 6E35.1a

Les deux autres loci contiennent les gènes codant les protéines de fibres caudales. Dans le premier locus, le gène MYOV011_v1_p0172 présente une identité de séquence de 32% (sur ~80% des protéines) avec la protéine gp34 du phage T4 qui permet l'ancrage des fibres caudales au niveau de la plaque basale du phage. Parmi les protéines annotées comme participant à la formation des fibres caudales MYOV011_v1_p0172 est la seule protéine qui montre une identité de séquence significative sur toute sa longueur avec le phage T4, renforçant l'importance de cette protéine dans l'ancrage du phage.

La protéine MYOV011_v1_p0173 montre une identité de séquence significative avec une protéine annotée comme gp35 chez le phage KVP-40. L'analyse bioinformatique de la protéine gp35 (protéine dite « rotule ») du phage T4 a montré qu'elle possède 2 domaines d'adhésion aux carbohydrates (Hyman and van Raaij 2018). La protéine MYOV011_v1_p0173 possède elle 3 domaines d'adhésion aux carbohydrates, comprenant notamment les deux domaines retrouvés dans la protéine gp35 ce qui suggère qu'elle possède la même fonction.

Dans le second locus, le gène MYOV011_v1_p0264 présente des identités de séquences de l'ordre de 30% avec des protéines gp36 de différents phages d'Entérobactéries (dont le T4) bien que la longueur de l'alignement soit faible (10 à 20% selon les protéines).

Enfin, les protéines MYOV011_v1_p0266 et MYOV011_v1_p0267 possèdent aussi une identité de séquence de l'ordre de 30% avec des protéines gp37 de différents phages d'Entérobactéries mais pas le T4. Ceci suggère que chez 6E35.1a, la partie distale de la fibre caudale est codée par deux gènes, comme pour KVP40 (Miller, Heidelberg, et al. 2003).

10.3 Réplication de l'ADN.

Le phage 6E35.1a possède un ensemble de protéines impliquées dans la réplication de l'ADN. On y retrouve des protéines fondamentales pour la formation du réplisome telles que l'ADN polymérase (MYOV011_v1_p0091) la protéine chargeuse de clamp (MYOV011_v1_p0094), l'ADN primase (MYOV011_v1_p0150) ou la ribonucléase H (MYOV011_v1_p0171). On retrouve de plus un ensemble d'hélicases et une topoisomerase (MYOV011_v1_p0284) qui permettent la séparation des double-brins d'ADN. La présence des protéines du réplisome permet au phage de se répliquer de manière indépendante de l'hôte.

10.4 Contre résistance à l'hôte.

Le phage 6E35.1a possède un seul gène codant une méthylase MYOV011_v1_p0035 qui pourrait intervenir dans la contre-attaque d'un mécanisme de type RE. De manière tout à fait intéressante, ce phage possède un ensemble de gènes permettant la synthèse de dérivés de 7-déazaguanine (Chapitre 2, figure 21). Chez le phage 9g (Siphoviridae), une voie similaire (deux gènes supplémentaires) conduit à la formation de 2'-deoxy-archeosine (Thiaville et al. 2016) et a été liée à la capacité de l'ADN du phage à résister à de nombreuses enzymes de restriction (Kulikov et al. 2014). Il a par la suite été montré que le 2'-deoxy-archeosine peut se substituer aux bases Guanines dans l'ADN (Thiaville et al. 2016). La voie de biosynthèse des dérivés de 7-déazaguanine chez 6E35.1a pourrait être impliquée dans le large spectre d'hôte de ce phage.

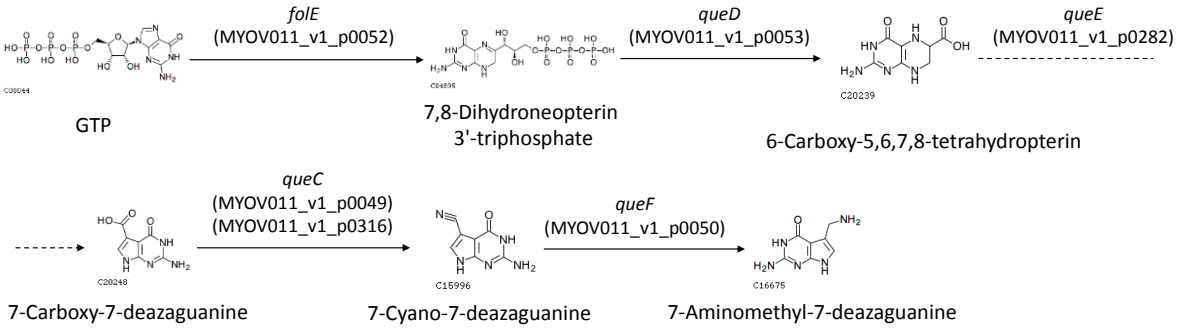


Figure 21 : Voie de biosynthèse des dérivés de 7-déazaguanine du phage 6E35.1a.

10.5 Altération de l'ADN et de la transcription de l'hôte.

Le phage 6E35.1a possède un gène codant une endonucléase (MYOV011_v1_p0042) ainsi que trois gènes codant des exonucléases (MYOV011_v1_p0078, MYOV011_v1_p0099, MYOV011_v1_p0101) qui pourraient cibler l'ADN de l'hôte. Par contre l'absence d'homologues des endonucléases T4 II (*denA*) et IV (*denB*) suggère que 6E35.1a, comme KVP40 (Miller, Heidelberg, et al. 2003), est déficient pour la dégradation complète de l'ADN de l'hôte, questionnant sur une capacité de transduction généralisée.

De plus, ce phage possède les gènes *alc* et *alt* décrits chez le phage T4. La protéine Alc (MYOV011_v1_p0112) interfère avec la transcription de l'hôte en interrompant l'élongation des transcrits dont la matrice contient des bases Cytosine (Miller, Kutter, et al. 2003). La protéine Alt (MYOV011_v1_p0113) code une ADP-ribosyltransferase, une enzyme retrouvée chez le phage T4 qui est capable de modifier l'ARN polymérase de l'hôte (Koch et al. 1995) au niveau de l'Arginine 265 de la sous-unité alpha. Cette modification conduit à rediriger

l'ARN polymérase de l'hôte vers les promoteurs précoces du phages T4 et entraine ainsi une prise de contrôle de la machinerie de transcription.

10.6 Métabolisme du phage.

Le phage 6E35.1a possède différentes fonctions de métabolisme qui pourraient conférer une plus grande autonomie vis-à-vis de l'hôte. Il possède notamment les gènes *nrdAB* (MYOV011_v1_p0292**,** MYOV011_v1_p0290) codant une ribonucleotide reductase de classe I (Dwivedi et al. 2013). Des gènes *nrdDG* codant une ribonucleotide reductase de classe III ont aussi pu être identifiés bien que l'enzyme *nrdD* soit pseudogénisée. Les ribonucléotides réductases sont impliquées dans la synthèse des désoxyribonucléotides à partir de ribonucléotides. Le phage possède aussi le gène *dut* codant une protéine permettant la synthèse de dUTP. Ces résultats suggèrent que le phage est capable de synthétiser des nucléotides. Enfin 6E35.1a possède des gènes codant une voie complète du nicotinamide décrit comme un important cofacteur d'enzymes chez KVP40 (Lee, Li, and Miller 2017).

10.7 Perspectives.

Nous prévoyons dans l'avenir d'effectuer une analyse transcriptomique de la dynamique d'infection du phage afin de préciser la nature des gènes exprimés aux temps précoces, intermédiaires et tardifs, d'identifier les gènes impliqués dans la transcription de l'hôte et du phage, la dégradation de l'ADN de l'hôte, la réplication de l'ADN du phage et la libération des particules infectieuses. Ce travail nous permettra de compléter l'annotation syntaxique réalisée par Mage, de découvrir éventuellement de nouveaux cadres de lecture et des ARN régulateurs. Il permettra enfin d'explorer le rôle des ARNt dans l'infection. Nous étudierons les biais de codon dans des ensembles spécifiques de gènes (expression précoce, moyenne, tardive ou faible par rapport à l'abondance élevée) avec l'abondance et la composition de l'ARNt. Ceci pourrait révéler des processus de régulation spécialisés, à savoir des codons / acides aminés enrichis dans certains gènes correspondant aux protéines les plus exprimées par le phage.

Nous effectuerons des analyses de phylogénie pour explorer le génome ancestral des T4 giant phages. Nous allons classer les familles de protéines conservées par tous les phages T4 et générer un arbre phylogénétique de protéines concaténées de référence. Nous évaluerons quels gènes sont sujets au HGT en recherchant des incohérences entre les arbres basés sur un seul gène et l'arbre du core génome. Nous rechercherons des ruptures de synténie dans les

régions où ces gènes sont localisés. Sur la base du pan génome du phage, nous reconstruirons les gains et les pertes de gènes afin de modéliser le génome ancestral des T4 giant phages. Ces analyses identifieront également : (i) les gènes du core (ii) des gènes flexibles acquis par certains phages. Le contenu de gènes spécifiques ou le regroupement de séquences peut révéler des mécanismes de spécialisation impliqués dans les interactions phage-hôte et permettre d'appréhender le spectre d'hôte potentiel.

Nous effectuerons enfin des approches de génétique pour i) comprendre les gènes de l'hôte et du phage impliqués dans l'infection, récepteur (e.g. ompK ou autre) mais pas uniquement. ii) tester le pouvoir transducteur de 6E35.1a. Un préalable sera de déterminer les paramètres d'infection : temps de latence, taux d'adsorption, « burst » (quantité de virus infectieux produits). Cette analyse sera effectuée dans différents hôtes afin d'explorer l'unicité ou la particularité en fonction des génotypes de vibrios.

Matériel et méthodes

L'échantillonnage en série.

La zone échantillonnée se trouve à la pointe du château en rade de Brest (48° 20'06.319'' N, 4° 19' 06.37'' W). Les échantillonnages ont été réalisés tous les deux jours sur une période de cinq mois (de mai à septembre 2017, soit 62 dates). Des huîtres SPF ont été produites selon la procédure décrite dans Petton et. al 2015. Brièvement, 50 huîtres adultes sauvages de Brest, Texel et Sylt ont été transférées vers les installations expérimentales de l'Ifremer situées à Argenton (Bretagne, France) puis traitées au chloramphénicol (8 mg/L) pendant 6 jours avant conditionnement pour la maturation (3 bains de 48H), en février, comme décrit précédemment (Petton et al. 2013). Les naissains obtenus ont été élevés dans des conditions contrôlées pendant une période allant jusqu'à 5 mois ou jusqu'à atteindre une masse humide individuelle moyenne comprise entre 0,5 et 3,0 g. Aucune mortalité n'a été observée durant cette production standardisée. La quantification du virus de l'herpès a été effectuée par qPCR aux différentes étapes de la production. Les huîtres SPF sont dépourvues d'herpes virus et ont une faible charge en vibrios (Le Roux, Wegner, and Polz 2016).

Afin de suivre l'évènement de mortalité dans sa totalité, sept lots d'huîtres juvéniles SPF (n=100) ont été disposés sur tables ostréicoles à différentes dates (du 3 mai au 11 septembre) dès que le lot précédant subissait des mortalités. Les premières mortalités d'huîtres ont été détectées le 29 mai (sept jours après le franchissement du seuil de 16°C) (Chapitre 2, figure 22) et ont été observées de manière continue jusqu'au 3 octobre (Bruno Petton, communication personnelle).

Les données de suivi de la température de l'eau de mer ainsi que de la salinité en rade de Brest ont été collectées au cours de l'année par le réseau Velyger (https://wwz.ifremer.fr/velyger/Acces-aux-Donnees/Rade-de-Brest/Temperature) et également grâce à une sonde multiparamètre Hydrolab DS-5X. La température de l'eau de mer a atteint le seuil de 16°C le 22 mai et est restée supérieure à cette température jusqu'en octobre, avec un maximum en aout (19°C). La salinité sur cette période était stable (entre 32 et 34 psu) (Chapitre 2, figure 22).

Tous les deux jours sur une période de cinq mois (de mai à septembre 2017), 10 litres d'eau de mer et 5 huîtres juvéniles SPF vivantes ont été collectés puis ramenés au laboratoire pour être traités. Chaque prélèvement a été réalisé à marée basse afin d'accéder aux poches ostréicoles contenant les animaux.

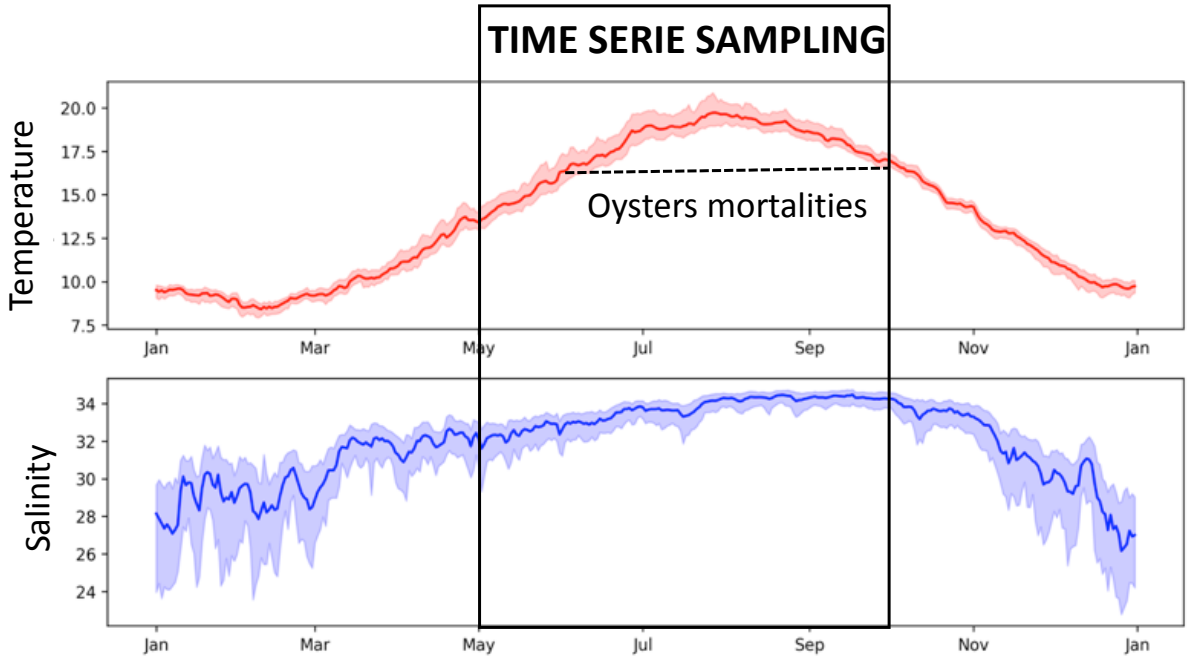


Figure 22 : Suivi des paramètres de température et salinité à la pointe du château, lors de l'échantillonnage en série. Les lignes pleines rouge (température) et bleue (salinité) représente les paramètres de l'année 2017. Les zones rouge et bleue entourant les lignes pleines, représente la moyenne sur 15 ans de ces paramètres. La zone encadrée représente la période de l'échantillonnage. L'apparition des mortalités d'huîtres est également représentée sur le graphique. Ces données ont été collecté par le réseau Velyger.

Le traitement des échantillons.

Une fois les échantillons prélevés sur le terrain, les 10L d'eau de mer sont filtrés sur 60 µm, au laboratoire. Les particules supérieures à 60 µm sont ensuite collectées dans 0,5 mL d'eau de mer (fraction zooplancton). Ensuite, 2 L de l'eau de mer filtré sur 60 µm sont filtrés de façon successive sur des filtres de différents diamètres (5 µm, 1 µm et 0,2 µm). Les filtres 5µm, 1µm et 0,2 µm sont découpés, puis ¼ des filtres est mis dans un tube Ependorff stérile puis stocké à -20°C. Ces tubes seront ensuite utilisés pour réaliser des extractions d'ADN totaux des différentes fractions. Un quart des filtres est mis dans un cryotube contenant 1 mL de milieu de culture Zobell (4g/L bactopeptone + 1 g/L d'extrait de levure dans de l'eau de Lewis, pH 7.6) supplémenté avec du glycérol (25% final) et stocké à -80°C. Ces tubes permettront de ré-isoler des bactéries ultérieurement si nécessaire.

Concernant les cinq huîtres, celles-ci sont décoquillées puis les chairs sont mélangées et broyées dans du milieu Zobell (qsp 1mL). 500µL du broyat d'huîtres est ensuite supplémenté par 500µL de milieu Zobell + 50% glycérol et stocké à -80°C, permettant l'isolement ultérieur de bactéries. Les 500µL restant sont centrifugé (10 minutes à 10 000 rpm), puis le culot est conservé à -20°C pour réaliser des extractions d'ADN. Le surnageant est filtré sur 0,2 µm puis conservé à 4°C pour la partie phage.

Isolement et caractérisation taxonomique des souches.

Lors de cette étude, seules les fractions planctoniques (isolées sur le filtre de 0,2 µm) et les broyats d'huîtres ont été utilisés pour l'isolement des *Vibrionaceae*. Un volume de 10 et 100 µL de suspension du filtre ou de broyat d'huîtres est étalé sur milieu sélectif TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose + agar, Difco), puis les boites sont incubées 24 heures à température ambiante. Pour chaque condition (fraction planctonique ou huître) 48 colonies isolées sont ensuite sélectionnées aléatoirement et ré-isolées sur TCBS.

Une première PCR ciblant le gène *r5.2* a été effectuée sur les colonies. Cette PCR permet la détection de deux populations (*V. crassostreae* et *V. chagasii*). Chaque colonie déterminée comme « *r5.2* positive » par PCR est alors ré-isolée puis mise en culture 24 heures en milieu Zobell. Un aliquot de la culture bactérienne est conservé à -80°C en présence de DMSO (10% concentration finale), un autre aliquot est utilisé pour réaliser une extraction d'ADN génomique à l'aide d'un kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, France), selon les recommandations du fournisseur.

L'ADN extrait est utilisé comme matrice de PCR afin de discriminer les deux populations à l'aide d'amorces spécifiques de la population *V. crassostreae*. Pour les souches déterminées comme appartenant à cette population, une recherche de la présence du plasmide pGV1512 est effectuée à l'aide d'amorces spécifiques du gène *repB*. L'assignation taxonomique des souches est ensuite confirmée par séquençage du gène *gyrB*. Les PCR ont été réalisées en utilisant l'enzyme GoTaq DNA polymerase (Promega, France) selon le programme : 95°C 5min, 30x (95°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec), 72°C 5min en utilisant les amorces indiquées dans le tableau ci-dessous :

amorces	Séquence (5'->3')
r5-2 F	ACACCAAGTACTGGCGACTG
r5-2 R	CGCTTGGCTTCCATGTTTGG
Spécifique de *V. crassostreae* F	AGGTCGCCACTTACTTGCTC
Spécifique de *V. crassostreae* R	TGCCTTCAGTGAGTTGGGTC
gyrB F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYRA
gyrB R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGYCAT
repB F	CCTCTCTCGACTACACGAAG
repB R	CATGCAACTTCATTCCAGGC

Isolement de phages dirigés contre *V. crassostreae*.

La méthode utilisée pour l'isolement des phages est basée sur la précipitation des virus à l'aide de chlorure de fer ($FeCl_3$) (John et al. 2011). A chaque date d'échantillonnage, un

volume de 2 litres d'eau de mer est filtré à 0,2 µm puis une solution de $FeCl_3$ est ajoutée à une concentration finale de $1mg.L^{-1}$. Après agitation et incubation à température ambiante pendant 1 h, l'échantillon traité est à nouveau filtré sur un filtre de 0,2 µm. Le floculat contenu sur le filtre est resuspendu dans 2 mL de tampon (Tris base 1,51%, Na_2-EDTA 3,72% pH8, $MgCl_2$ 4,07 % pH4,5, NaOH 5N 3 mL pH8,3, acide oxalique 2,52 %, H_2O qsp 100mL pH 6-6,5 final) afin de récupérer le floculat (concentré 1000x), qui est ensuite stocké à 4°C.
L'isolement de phage est réalisé en mélangeant 10 µL de floculat ou de broyats d'huître avec 100 µL d'une culture bactérienne pure selon la méthode de double couche d'agar. Après 24 heures d'infection, un maximum de 6 plages de lyse (ou plaque forming unit, pfu) par interaction est sélectionné. Les plages de lyses sont alors carottées puis remises en suspension dans du milieu de culture Marine Broth à 4°C pendant 24 h. Les virus contenus dans ce stock sont ensuite réisolés trois fois sur milieu de culture solide (Marine agar) afin d'obtenir une culture clonale du virus isolé.

Production de stock viral concentré.

Chaque stock de phage a été produit en utilisant la souche ayant permis l'isolement du phage (selon le protocole développé par Kathryn Kauffman, (Kauffman 2014)). Brièvement, différentes dilutions de la suspension virale sont déposées sur un tapis bactérien. Il faut alors identifier la dernière dilution permettant d'obtenir une lyse confluente, puis calculer le volume nécessaire de suspension virale pour obtenir une lyse bactérienne sur la totalité d'une boite (de diamètre 140 mm). Après avoir infecté la bactérie pendant 24 heures, 15 mL de Marine Broth sont ajoutés sur la boite placée sur la nuit à 4°C, permettant aux phages de se propager dans le milieu liquide. Le lendemain, le milieu de culture liquide est récupéré puis centrifugé (10 minutes, 4500 rpm). Le surnageant est alors filtré sur un filtre de 0,2 µm. Le stock peut ensuite être conservé à 4°C. Ce nouveau stock est ensuite titré avant de réaliser les expériences d'infections croisées puis normalisé à la concentration souhaitée par dilutions dans du milieu de culture (Marine Broth).

Bactéries et phages.

Les souches et phages utilisés proviennent de différentes campagnes d'échantillonnage à Brest (France) et à Sylt (Allemagne), selon les méthodes décrites dans le chapitre I-B et II-A. Pour s'assurer de la spécificité des phages contre l'espèce *V. crassostreae*, 23 autres populations isolées à Brest (Bruto et al. 2017) ont également été infectées par les phages.

Test d'infections croisées.

Les tests d'infections croisées ont été réalisés en utilisant un robot Tecan en collaboration avec la start-up EligoBioscience. Chaque souche testée est mise en culture dans du milieu Marine Broth sur agitation pendant 24 heures. 100 µL de suspension bactérienne sont ensuite utilisés pour former un tapis bactérien en utilisant de l'agar mou, sur une boite (onewell, 127,8 / 85,5 mm, stérile, ref 670180) contenant un milieu Marine broth + agar. Après avoir laissé sécher ces boites pendant environ 20 minutes, 4 µL x 8 (32 µL) d'une suspension virale à 2,5. 10^5 pfu/mL sont prélevés, puis 4µL de la suspension sont déposés successivement sur huit boites contenant un tapis bactérien. Chacun des 96 dépôts/boite contient donc 1000 particules virales. Les boites sont ensuite incubées sur la nuit à température ambiante. La lyse est ensuite observée à 24 heures et 48 heures. Ces infections ont été réalisées en duplicat et les interactions positives ont été confirmées lors d'une troisième expérience.

Il est important de noter que certaines interactions sont difficiles à interpréter en raison de lyses « partielles ». Ce type de lyse peut également apporter de la variabilité entre les duplicats lorsqu'elles sont plus ou moins visibles.

Test in vitro.

Les tests d'infections *in vitro* ont été réalisés en Zobell (4g/L bactopeptone + 1 g/L d'extrait de levure dans de l'eau de Lewis, pH 7.6), hémolymphe et plasma. L'hémolymphe a été ponctionnée dans le muscle adducteur d'huîtres adultes triploïdes pour s'assurer de l'absence de contamination par des gamètes. Un aliquot est centrifugé 10 minutes à 1000g et filtré à 0,2 µm, pour récupérer le plasma (dépourvue d'hémocytes et de bactéries). Les bactéries utilisées pour ce test contiennent un plasmide portant un gène de résistance au chloramphénicol pMRB-GFP-CmR (Le Roux et al. 2011) permettant leur dénombrement sur milieu sélectif.

Ces trois milieux sont ensemencés avec des pré-cultures bactériennes au 1/100 avec ou sans phages ajoutés à 3 MOI différentes (1, 10 et 20). Les cinétiques de croissance bactérienne et virale sont ensuite suivies pendant 24 heures (t= 0 h, 3 h, 6 h et 24 h). Pour déterminer la concentration bactérienne 5 µL de dilution bactérienne (de 10^2 à 10^6) sont déposés sur milieu Zobell supplémenté de 5 µg/mL de chloramphénicol. Pour déterminer le titre viral, 100 µL des cultures sont centrifugés 5 minutes à 4500 rpm, puis le surnageant contenant les phages est dilué (de 10^1 à 10^8) et un volume de 5 µL de chaque dilution est déposé sur un tapis bactérien réalisé avec de l'agar mou. Les boites sont incubées 24 heures à température ambiante avant le dénombrement.

Microscopie.

74 phages de la collection ayant des profils d'infection distincts ont été concentrés en utilisant des tubes 30 kD centrifugal filtration (Millipore, amicon Ultra centrifugal filter, Ultracel 30K, UFC903024) puis observés en microscopie électronique par coloration négative. Pour ce faire, 20 µL d'une suspension virale concentrée entre 10^9 et 10^{11} pfu/mL ont été déposés sur du parafilm. Une grille en cuivre (FF-300 Cu formvar square mesh Cu, delta microscopie) est ensuite déposée sur la goute pendant 10 minutes. La grille est transférée dans 3 bains successifs d'acétate d'uranyle (2%) avec une incubation finale de 2 minutes dans le dernier bain. L'excédent d'acétate d'uranyle est retiré à l'aide d'un filtre Whatman. L'observation est ensuite réalisée avec un microscope électronique Jeol 1400 muni d'une caméra Orious (Gatan).

Extraction d'ADN.

Les extractions d'ADN des souches ont été réalisées en utilisant le kit wizard genomic DNA purification (Promega, France) selon les recommandations du fabricant.

Les extractions d'ADN des phages ont été réalisées à l'aide du kit MasterPureTM Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre), selon les recommandations du fabricant, à partir d'une suspension virale entre 10^7 et 10^{11} pfu/mL selon les phages.

Une autre technique a également été utilisé pour les extractions n'ayant pas fonctionnées avec le kit. Le milieu de culture Marine Broth étant un milieu concentré en sel, il est nécessaire de faire un rinçage de la suspension virale en utilisant un Amicon (30 kDa Millipore Ultra Centrifugal Filter, Ultracel UFC903024) (Kauffman et al. 2018). Puis, 1 µl de DNaseI à 10 000 unités et 2,5 µl de RNase à 3,5 mg / ml sont ajoutés à 100-200 µl de suspension virale et incuber pendant 30 mn à 37 ° C. Ensuite, 8 µl d'EDTA 0,5 M pH 8,0 (20 mM final) sont ajouté dans les 200 µl traités, et mélangé à l'aide d'une pipette. Puis, 5 µl de protéinase K 20 mg / ml (0,5 mg / ml final) et 5 µl de SDS 20% (0,5% final) sont ajoutés au mélange. La solution est alors mélangée en inversant doucement le tube plusieurs fois, puis incubée 30 min à 55°C. 200 µl de phénol / chloroforme / alcool isoamylique sont ajoutés et mélangés en inversant doucement le tube plusieurs fois jusqu'à la formation d'une émulsion complète. Les tubes sont centrifugés 5 min à 3000g (5000 rpm). La phase aqueuse est alors récupérée puis 200 µl de chloroforme sont ajoutés sur le surnageant. Les tubes sont centrifugé 5 min à 3000g (5000 rpm) puis la phase aqueuse est récupérée. Pour la précipitation de l'ADN, 20 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 500 µl d'éthanol à 100% sont ajouté dans les tubes. Les tubes sont ensuite mélangés doucement, incubés dans de la glace pendant 15 min puis

centrifugés 20 min à 15000g à 4 ° C. Le culot est rincé avec 500 µl d'éthanol à 70%, centrifugé puis resuspendu avec du tampon TE. Pour chaque extraction, une migration de l'ADN a été réalisé sur gel d'agarose 0,7%, 40V sur la nuit à 4°C.

Séquençage des génomes.

Les souches ont été séquencées par le JGI (Joint Genome Institut) et le MIT (Massachusetts Institute of Technology) en utilisant la technologie illumina HiSeq2000 et une librairie de 300 pb. Les contigs ont été assemblés *de novo* à l'aide de Spades (Bankevich et al., 2012). La prédiction informatique des séquences codantes ainsi que les assignations fonctionnelles ont été effectuées à l'aide du pipeline d'annotations automatisé implémenté dans la plate-forme MicroScope (Vallenet et al., 2013).

Discussion

Les maladies associées aux vibrios chez l'Homme et les organismes marins sont en constante augmentation en lien probable avec les changements globaux et plus particulièrement le réchauffement climatique (Baker-Austin et al. 2018). Un problème majeur est le manque de connaissances sur l'écologie, l'évolution et la virulence des souches de vibrios environnementales comparativement aux souches dites « cliniques », responsables de pathologies chez l'Homme. Dans l'environnement, la dynamique éco-évolutive des vibrios est intimement liée à leurs interactions avec les autres organismes. Contrairement au virus, ces bactéries ne peuvent être considérés comme des parasites obligatoires. Par exemple, la plupart des espèces appartenant au clade Splendidus a un comportement généraliste, c'est à dire la capacité de proliférer dans diverses niches. Seule *V. crassostreae* semble montrer une préférence pour l'huître. L'huître constitue un réservoir de ce vibrio en hiver et un hôte affecté par la vibriose en été, probablement en lien avec une immunodépression causée par le virus herpes dans le cas du POMS. La forte dynamique de ce pathogène opportuniste chez l'huître et dans la colonne d'eau nous a amenés à rechercher le rôle joué par des prédateurs naturels, les phages, dans la dynamique éco-évolutive de cette espèce bactérienne.

Ainsi au cours de mon projet de thèse, en utilisant le modèle *Vibrio crassostreae,* je me suis intéressé à deux types d'interactions « hôte-parasite ». Dans le premier type d'interactions, le vibrio constitue le parasite (ou pathogène) et l'huître l'hôte (ou le réservoir). Dans le second type d'interactions, le vibrio constitue l'hôte et le phage le parasite. J'ai recherché à mettre en évidence des déterminants moléculaires d'une coévolution entre les partenaires et de comprendre le type d'interaction sélectionné : mutualiste ou pathogène.

Sélection d'interactions mutualistes en zone non impactée par la maladie des huîtres juvéniles.

Des travaux antérieurs menés avec des huîtres prélevées en zone peu ou pas impactée par la maladie des juvéniles (Texel, Sylt) ont montré l'existence d'une adaptation locale des vibrios avec les huîtres (Wendling and Wegner 2014). Les souches de vibrio utilisées dans ce travail appartiennent toutes au clade Splendidus. Les populations d'huîtres représentent deux événements d'invasion distincts et sont génétiquement différenciées (Moehler et al. 2011). Les taux de mortalité de larves d'huîtres sont plus faibles lors d'infections par des vibrios sympatriques comparativement aux vibrios allopatriques (Wendling and Wegner 2014). Ce

résultat suggère que les huîtres sont capables de s'adapter rapidement à la sélection exercée par les vibrios, et que les interactions huître-vibrio évoluent vers le mutualisme.

Nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de cette adaptation locale chez les vibrios. Nos travaux ont permis d'identifier deux familles de gènes (OG1907 et OG3159) impliquées dans des interactions de type génotype par génotype (G x G), c'est à dire qu'elles induisent des profils de virulence opposés sur des hôtes génétiquement différents (Wegner et al. 2019). La première famille de gènes (OG3159) est impliquée dans le transport de composants contenant du soufre. La localisation de la protéine dans la membrane cytoplasmique interne n'explique pas son implication dans la virulence spécifique de l'hôte. Intuitivement on pourrait s'attendre à une protéine exposée à la surface externe de la bactérie interagissant avec une protéine spécifique à la population d'huîtres. Par contre, dans le cas de OG1907, une localisation externe de la protéine est prédite. Le gène codant une fonction inconnue, est situé directement en amont d'un locus *cusABC* (pompe d'efflux de cuivre). CusABC a été impliqué dans l'homéostasie du cuivre et la résistance de diverses bactéries à Gram négatif, y compris les vibrios (Hernández-Montes, Argüello, and Valderrama 2012). La résistance au cuivre joue un rôle important dans la colonisation, la survie intracellulaire et la virulence dans une souche de vibrio (LGP32) (Vanhove et al. 2016).Nos résultats soulignent l'intérêt d'une approche prenant en compte l'adaptation locale pour mettre en évidence de nouveaux mécanismes de virulence (Wegner et al. 2019).

L'adaptation locale des vibrios pourrait résulter d'une pression de sélection environnementale différente entre les sites Texel/Sylt, sélectionnant les allèles de gènes procurant une meilleure fitness à la bactérie localement mais ayant pour conséquence une diminution de la virulence (Trade off). Par exemple, la concentration de cuivre dans les mollusques de Sylt a été multipliée par deux entre 1997 et 2004, tandis que les concentrations à Texel sont restées constantes (Essink et al. 2005). La pression imposée par le cuivre à Sylt pourrait avoir enrichi un allèle associé à une plus forte résistance. Il conviendra de valider cette hypothèse par des tests de résistance au cuivre.

D'autre part, les huîtres pourraient avoir développé une résistance contre les vibrios localement. Le phénotype « résistant » obtenu chez les larves issues de croisements F1 entre les huîtres des deux sites, montre que la résistance est un caractère dominant qui repose sur un nombre restreint de gènes (Wendling et Wegner, 2015). Dans le futur l'identification de gènes

de résistance chez l'huître et la démonstration de leur interaction avec OG1907 et OG3159 chez vibrio, permettra de comprendre les fondements mécanistiques des interactions de type génotype par génotype (G x G).

Sélection d'interactions pathogènes en zone impactée par la maladie des huîtres juvéniles.

En étudiant une zone ostréicole de la côte atlantique française fortement impactée par le POMS (rade de Brest), notre équipe a montré que l'apparition de la maladie est associée à un remplacement progressif de divers colonisateurs bénins par les membres d'une population virulente assignée à l'espèce *Vibrio crassostreae* (Lemire et al. 2014). Cette population est retrouvée de façon abondante dans les huîtres malades et est rarement isolée de la colonne d'eau au cours des mortalités (Bruto et al. 2017; Chapitre 2). Cette population est génétiquement diverse et la majorité de ses membres est virulente. La virulence chez *V. crassostreae* dépend de la présence d'un plasmide mobilisable de grande taille, pGV1512 (Bruto et al. 2017).

Au cours de cette thèse nous avons montré que ce plasmide est détecté dans les isolats échantillonnés d'huîtres malades à Brest et est absent d'isolats non virulents échantillonnés dans une zone considérée comme indemne de POMS (Sylt) (Piel et al. 2019). Ces résultats suggèrent un rôle majeur du plasmide dans l'émergence de souches virulentes de *V. crassostreae* à Brest. A Brest, les huîtres subissent des épisodes de mortalité récurrents depuis de nombreuses années. La pression de sélection exercée par les pathogènes (viraux et bactériens) pourrait conduire à une sélection de génotypes d'huîtres plus résistants. Il a en effet été démontré que des huîtres issues de géniteurs ayant connu un niveau élevé de sélection due au POMS ont une meilleure résistance lors d'infection (de Lorgeril et al. 2018). *V. crassostreae* est préférentiellement associé aux huîtres, suggérant une spécialisation de ce vibrio et une plus forte dépendance à son hôte. L'acquisition et/ou le maintien du plasmide de virulence à forte fréquence par les souches de *V. crassostreae* pourrait être une réponse évolutive de la bactérie afin de proliférer dans les huîtres résistante au POMS (course aux armements).

Le plasmide pGV1512 est conjugatif (présence d'un système de sécrétion de type 4, relaxase) (Bruto et al. 2017) et il est possible de le transférer au laboratoire d'une souche donneuse (J2-

9) à une souche receveuse de *V. crassostreae* préalablement curée du plasmide (Bruto et al. 2017). L'analyse du transcriptome de J2-9 au cours d'une infection d'huîtres, a mis en évidence une forte expression des gènes codant ce système de sécrétion de type 4 qui suggère que le transfert de plasmide est activé *in vivo* (Rubio et al. 2019). L'huître pourrait représenter une niche favorisant le transfert et/ou à la sélection de ce plasmide de virulence. Si *V. crassostreae* est présent en abondance dans les huîtres malades, d'autres populations de vibrios sont aussi toujours détectées (Bruto et al. 2017). Les souches de ces populations pourraient théoriquement elles aussi acquérir le plasmide. Cependant la recherche du plasmide pGV1512 dans des souches de vibrios isolées à Brest et appartenant à 23 autres populations a révélé que seules les souches de la population #24, assignées à *Vibrio splendidus* portent ce plasmide (Thèse Adèle James ; 2018). La population #24 est elle aussi positivement associée aux huîtres malades, 100% des souches portent le plasmide (forte fréquence) et sont virulentes. Le curage du plasmide dans ces souches conduit à une virulence atténuée. Le plasmide pGV1512 est donc associé à l'émergence de souches plus virulentes dans deux populations distinctes. Il conviendra dans l'avenir de comprendre les mécanismes à l'origine de l'invasion de ces populations par le plasmide pGV1512.

Convergence des mécanismes de virulence vers une même fin, la mortalité des hémocytes.

Nous avons montré que l'assignation en populations écologiques est corrélée avec un potentiel de virulence pour les huîtres (Bruto et al. 2018; Annexe 1). Certaines populations (e.g. *V. splendidus* et *V. cyclitrophicus*) contiennent une forte proportion de souches virulentes (populations « à risque ») alors que d'autres ne contiennent que des souches non virulentes (Bruto et al. 2018). L'hypothèse selon laquelle l'ancêtre du clade Splendidus était virulent a été validée génétiquement par l'identification d'un locus (R5.7/8) nécessaire à la virulence, qui est maintenu et transmis verticalement au cours de la différenciation des populations à risque. Ce locus est présent dans la grande majorité des souches, suggérant une pression de sélection forte et un rôle important dans la niche. Toutefois, malgré la présence de ce locus, certaines souches montrent une virulence atténuée, démontrant que R5.7/8 est nécessaire mais non suffisant à la virulence. Un locus codant une MARTX toxine est trouvé uniquement chez *V. splendidus* et a été démontré nécessaire à la virulence. Le plasmide pGV1512 est détecté uniquement chez *V. crassostreae* et une population de *V. splendidus* (#24). Ces résultats indiquent qu'au cours de la différenciation écologique (voire de la spéciation) des gènes

spécifiques aux populations ont été acquis et jouent un rôle dans la virulence. La virulence est un processus complexe impliquant divers déterminants génétiques, acquis de manière verticale (R5.7/8) et horizontale (MARTX, pGV1512), communs ou spécifiques aux populations.

De manière tout à fait intéressante alors que les souches isolées de mortalité d'huître et assignées à l'espèce *Vibrio tasmaniensis* ou *V. aestuarianus* possèdent un phénotype virulent, elles ne possèdent pas le gène *r5.7*. Ces résultats suggèrent d'autres scénarios évolutifs aboutissant à des espèces ou populations à risques pour l'huître. Comme chez *V. crassostreae*, la virulence de *V. tasmaniensis* et *V. aestuarianus* repose au moins en partie sur leur capacité à tuer les hémocytes. La cytotoxicité induite par *V. tasmaniensis* nécessite cependant son internalisation dans l'hémocyte et est suivie d'une lyse cellulaire. Un système de sécrétion de type 6 (T6SS) codé par le chromosome a été impliqué dans la mortalité hémocytaire médié par *V. tasmaniensis* (Rubio et al. 2019). Ce T6SS se distingue cependant du T6SS porté par le plasmide pGV1512 et fait intervenir probablement des facteurs spécifiques pour le moment inconnus.

La cytotoxicité de *V. crassostreae* dépend d'un contact externe de la bactérie avec l'hémocyte et fait intervenir la protéine R5.7 et le T6SS porté par le plasmide. Un T6SS proche phylogénétiquement a aussi été identifié chez *V. aestuarianus*. Or la cytotoxicité médiée par *V. aestuarianus* semble elle aussi indépendante de l'internalisation du vibrio (Labreuche et al. 2006). Alors que le T6SS est souvent associé chez les vibrios à la compétition bactérienne, chez les pathogènes de mollusques il semble avoir été sélectionné pour une fonction cytotoxique contre les cellules immunitaires. Le T6SS (et ses effecteurs) semblent de plus s'être spécialisés en fonction du mode de vie des pathogènes, incluant ou non une étape intracellulaire.

Enfin, les huîtres peuvent être colonisées par diverses populations virulentes ce qui nous conduit à émettre l'hypothèse que l'assemblage de diverses populations dans l'huître est un facteur majeur de la sévérité de la vibriose (Gay, Berthe, and Le Roux 2004; Lemire et al. 2014; Rubio-Portillo et al. 2014).

L'huître adulte, un réservoir de pathogènes.

V. crassostreae est retrouvé de façon récurrente pendant les épisodes de mortalité d'huîtres, et n'est détecté qu'en été. Ceci pose la question de son réservoir pendant les périodes froides. Nous avons mis en évidence que les huîtres adultes, résidant dans les zones ostréicoles, hébergent asymptomatiquement *V. crassostreae* et servent donc potentiellement de réservoir naturel à ce pathogène pendant les périodes froides (Piel et al. 2019). Pendant cette période, les huîtres représentent également un réservoir pour *V. aestuarianus*, responsable de mortalités chez les animaux adultes (Parizadeh et al. 2018; Goudenège et al. 2015; Piel et al. 2019). Pour ces deux espèces, une augmentation de la température pourrait entraîner une multiplication active des vibrios, augmentant la charge bactérienne dans l'huître et /ou une virulence accrue, permettant à l'agent pathogène de coloniser et d'infecter les huîtres juvéniles.

L'augmentation de température est une condition nécessaire à la maturation des géniteurs en écloseries et constitue, comme nous venons de le voir, un facteur déclencheur des mortalités induites par les vibrios et ce, en absence de virus herpes. Pour limiter les risques d'infections bactériennes de nombreuses écloseries ont recours à l'utilisation d'antibiotiques de manière préventive ou prophylactique (Dubert, Barja, and Romalde 2017). Ces pratiques favorisent la sélection et l'expansion de gènes de résistance par HGT. Il est donc urgent de trouver des alternatives plus respectueuses de l'environnement.

Dynamique de *V. crassostreae* et des phages virulents.

A Brest, la dynamique de *V. crassostreae* est marquée par une succession de proliférations et déclins, nous amenant à poser l'hypothèse que cette dynamique pourrait être influencée par la présence de phages.

Dans la majorité des cas, les proliférations impliquent des souches appartenant à différents génotypes de *V. crassostreae* regroupés en clades au sein de la population. Ces clades sont détectés à différentes dates d'échantillonnage. La colonisation de l'huître par différents génotypes de *V. crassostreae* confirme la nature polyclonale de l'infection par *V. crassostreae* (Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2014). L'assemblage de ces génotypes pourrait être stochastique, résulter d'une collaboration entre différents génotypes ou de la prédation par les

phages. Les phages virulents pourraient agir sur la densité du pathogène et/ou par coévolution sur la sélection de vibrios résistants.

En raison de l'extrême diversité des phages et des souches de *V. crassostreae,* notre échantillonnage et notre approche ne permettent cependant pas de réaliser une mesure quantitative de leur dynamique pour démontrer que le déclin des vibrios coïncide avec des blooms de phages. L'identification de marqueurs spécifiques des clades de *V. crassostreae* et de clusters de phages pourrait permettre dans des études futures de suivre leur dynamique et leur abondance dans l'environnement de façon plus précise, par PCR quantitative. Une alternative plus coûteuse mais donnant une image plus globale serait l'étude du virome au cours du temps.

Le cluster de phages comme unité de prédation et de sélection de *V. crassostreae.*

Dans notre étude, le réseau d'interaction phages-bactéries se révèle modulaire. Cependant à l'échelle de l'unité de prédation, les réseaux peuvent avoir une organisation de type imbriqué ou modulaire. Ce type de résultats a également été observé dans des interactions entre 286 bactéries appartenant à différentes espèces et 215 phages (Moebus 1980; Flores, Valverde, and Weitz 2013). Cependant, ce résultat est pour la première fois mis en évidence à l'échelle d'une espèce.

L'unité de prédation des phages apparaît être le clade de souches de *V. crassostreae*. Le spectre d'hôte est lié à la présence et à l'accessibilité du récepteur ainsi qu'à la capacité du phage à contourner les défenses bactériennes et à s'adapter aux caractéristiques moléculaires de l'hôte. Les modèles mathématiques fournissent une approche complémentaire à l'étude des interactions phages-bactéries et permettent d'émettre des hypothèses quant aux scénarii coévolutifs des interactions bactéries-phages (imbriquées/ course aux armements et modularité/dynamique d'état fluctuant (Weitz et al. 2013)). Cependant, face à une telle diversité des vibrios, il apparaît difficile d'analyser les phénomènes de coévolution phage-vibrio. Une alternative est de tester la capacité d'adaptation en fonction du temps (ou « Time shift ») ou bien d'étudier les phénomènes d'adaptation locale, c'est à dire de comparer l'infectiosité du parasite avec l'hôte isolé au même endroit (sympatrie) ou dans des zones plus éloignées (allopatrie) (Gandon et al. 2008).

Plusieurs travaux ont suggéré que les phages sont plus susceptibles d'infecter des hôtes du même site comparés aux hôtes isolés sur différents sites (Vos et al. 2009; Gomez and Buckling 2011; Flores, Valverde, and Weitz 2013). Nos résultats sont en accord avec ces études. Ce phénomène a été étudié en utilisant des souches et des phages de zones géographiquement très éloignées et dans des contextes épidémiologiques très différents (Brest et Sylt). D'autres échantillonnages seront nécessaires pour étudier le phénomène d'adaptation locale à une échelle géographique plus réduite. Cet effet spatial pourrait être moins marqué en raison de l'importance des transferts d'animaux (apportant leur microbiote) dans les différents parcs ostréicoles.

Nous avons également observé que l'effet temporel a également un impact sur les interactions bactéries-phages. En effet, nous avons observé une infection plus élevée des phages sur les vibrios contemporains par rapport à des vibrios échantillonnés dans le passé. Uniquement quatre phages ne sont pas impactés par le temps, trois d'entre eux montrent de manière remarquable le plus grand spectre d'hôte.

Données préliminaires des mécanismes de résistance.

L'une des avancées scientifiques les plus importantes de ces dernières décennies a été la découverte du système immunitaire bactérien CRISPR-Cas. Ce système est présent dans environ 50% des bactéries séquencées et 90% des archées séquencées et confère entre autres une résistance aux phages (Makarova et al. 2011). Cependant, ce système est absent des souches de *V. crassostreae*, comme de la plupart des vibrios séquencés à ce jour. La résistance bactérienne peut impliquer de nombreux mécanismes du cycle infectieux (Seed 2015). Elle peut résulter de mutations ponctuelles ou délétions ainsi que de HGT. Une autre forme de résistance implique des modifications de l'expression de gènes bactériens dont ceux intervenant dans la synthèse du récepteur. On distingue donc une résistance réversible et irréversible.

Nous avons réalisé des analyses préliminaires de génomique comparative pour élucider les éléments génétiques à l'origine du phénotype de sensibilité/résistance. Nous nous sommes focalisés sur deux unités de prédation, contenant un nombre suffisant de souches génétiquement proches et ayant une organisation de type modulaire et imbriqué. Nous avons identifié quelques locus, portés par des éléments génétiques mobiles, codant des gènes

impliqués dans des systèmes de restriction/modification. Le rôle des systèmes de restriction/modification reste à valider par des approches de mutagénèse/complémentation.

Il semblerait donc les transferts horizontaux de gènes, participent à véhiculer des systèmes de restriction-modifications et jouent un rôle majeur dans la résistance des souches de *V. crassostreae*, à défaut de posséder un système adaptatif CRISPR-Cas.

Pour échapper aux systèmes bactériens de restriction-modifications, les phages peuvent développer différentes stratégies (Stern and Sorek 2011) dont le masquage des sites de restriction par des protéines phagiques, la stimulation de l'activité des méthylases bactériennes induisant une protection concomitante de l'ADN phagique ou encore la synthèse de protéines (comme les méthylases) protégeant leur génome (Stern and Sorek 2011).
Nous avons identifié chez des phages appartenant à deux sous-clusters génétiquement très proches des systèmes de méthylation différents pouvant expliquer la différence de profils d'infection. Le rôle de ces systèmes de méthylation reste à valider par des approches de mutagénèse. Il s'agira d'intervertir ces systèmes dans des phages provenant de ces deux sous-clusters. La découverte de ces systèmes de défense de phages met en valeur les phénomènes de coévolution vibrio-phages.

Une thérapie par les phages envisageable ?

Contrairement aux antibiotiques qui possèdent un large spectre d'action, les phages sont spécifiques de leur bactérie-cible et représentent donc un intérêt majeur pour le développement d'approches thérapeutiques en évitant les phénomènes de dysbiose qui peuvent être observés après traitements antibiotiques. Leur capacité d'auto-amplification chez l'hôte bactérien et d'auto-élimination lorsque celui-ci est tué constitue également un avantage indéniable en faveur de leur utilisation.

Toutefois cette spécificité des phages peut également représenter un inconvénient à la mise au point d'approches thérapeutiques car les pathogènes bactériens doivent être identifiés au préalable. Dans le cas de *V. crassostreae*, les infections sont polyclonales et font intervenir des souches extrêmement diversifiées, à la différence de pathogènes clonaux, tels que certaines souches pathogènes d'*E. coli* (Green et al. 2017; Pouillot et al. 2012; Galtier et al. 2017) ou bien de *V. cholerae* (Yen, Cairns, and Camilli 2017; Bhandare et al. 2019) par

exemple. L'utilisation d'un cocktail de phages et/ou de phages généralistes ciblant l'ensemble des génotypes virulents est donc nécessaire au contrôle de ce pathogène. Le nombre de phages nécessaires pour infecter uniquement les souches *V. crassostreae* de Brest (potentiellement pathogènes) est de 18 et permet d'infecter 83/125 (66%) souches. Ce nombre peut sembler important pour la faisabilité/coût d'un cocktail de phage.

Une question importante est de déterminer quel pourcentage de couverture des génotypes virulents de *V. crassostreae* par un cocktail de phages est nécessaire et suffisant pour améliorer la survie des huîtres en écloserie ? Pour cela d'autres expériences sont à réaliser. L'infection de larves d'huîtres avec différentes combinaisons de souches de *V. crassostreae*, représentatives de la diversité génétique, permettrait d'évaluer l'efficacité du cocktail de phage. Son efficacité pourrait également être testée dans des expériences simulant la maturation de géniteurs.

De plus, les phages sont-ils plus efficaces en combinaison (effet synergique) pour lutter contre les bactéries ? Lorsque des phages sont utilisés pour traiter des infections bactériennes, plusieurs phages sont généralement appliqués sous forme de cocktail. Lorsque deux ou plusieurs phages du cocktail attaquent la même bactérie, la combinaison peut produire un effet supérieur à celui induit par un phage unique (synergie). Un exemple est la meilleure adsorption d'un phage T7 en présence d'un phage apparenté à φKMV produisant une dépolymérase (Schmerer, Molineux, and Bull 2014). L'utilisation de phages en combinaison peut également se révéler moins efficace (interférence) (Schmerer, Molineux, and Bull 2014). Enfin, la présence de prédateurs multiples peut limiter la capacité des bactéries à résister à l'infection en raison d'un coût trop élevé sur la fitness (Koskella et al. 2012). La recherche d'effets synergiques et de coopérations entre phage devra donc être prise en compte pour permettre de développer un cocktail de phages capable d'infecter la majorité, sinon la totalité, des souches virulentes de *V. crassostreae*.

Les phages à larges spectres pourraient-ils représenter une alternative pour la thérapie phagique ? La capacité à infecter un large spectre d'hôtes peut entraîner un coût la fitness du phage. L'exemple le plus marquant est le cas du phage à large spectre *Autolykiviridae*, nécessitant plus de deux semaines pour former des plages de lyse (Kauffman et al. 2018). Le phage ayant le plus large spectre de notre collection (6E35.1a) appartient à la famille des T4 géants. S'il nécessite un temps plus court (24 heures) pour former des plages de lyses, celles-

ci sont plus ou moins nettes en fonction de l'hôte testé. Par ailleurs, l'analyse de son génome suggère une capacité réduite de dégradation de l'ADN de l'hôte et un potentiel de transduction de grands fragments d'ADN. Or, la transduction généralisée peut conduire à la dissémination des gènes de l'hôte dont des gènes de virulence (Waddell et al. 2009). Une détermination du potentiel de transduction généralisée de ce phage est donc à évaluer en premier lieu.

La théorie prédit que la résistance au phage se traduit par un coût sur la fitness et dans certains cas sur la capacité de virulence (Seed et al. 2012; Zahid et al. 2008; Castillo et al. 2019). (Oechslin et al. 2017). Nos premières expériences en laboratoire montrent que la résistance aux phages est contrainte dans l'hémolymphe. Dans l'avenir nous devrons évaluer si ce phénomène se généralise à tous les phages de notre collection et s'il résulte de l'activité hémocytaire (immuno-synergie) ou de compétition avec le microbiote. Ce résultat permet cependant d'être optimiste quant à l'utilisation des phages pour le contrôle de *V. crassostreae* dans l'huître.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons étudié l'évolution de la virulence d'une espèce de *Vibrio* avec l'huître en tant qu'hôte et les phages comme prédateurs. Nous avons mis en évidence que l'émergence de *V. crassostreae*, dans une zone impactée par des mortalité de juvéniles, est liée à l'acquisition d'un plasmide de virulence codant un système de sécrétion de type 6 responsable de la cytotoxicité hémocytaire. La forte dynamique de *V. crassostreae* dans l'environnement et dans l'huître semble suggérer que les phages influencent l'abondance des pathogènes par prédation et leur diversité par sélection. Les phages pour la plupart apparaissent extrêmement spécifiques de clades ou sous populations au sein de *V. crassostreae*. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes, notamment sur l'exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires du système de sécrétion de type 6 et l'étude de la coévolution bactéries-phages.

Annexe 1 : Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations

The ISME Journal (2018) 12:2954–2966
https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3

ARTICLE

Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations

Maxime Bruto[1,2] · Yannick Labreuche[1,2] · Adèle James[1,2] · Damien Piel[1,2] · Sabine Chenivesse[2] · Bruno Petton[1,3] · Martin F. Polz[4] · Frédérique Le Roux[1,2]

Received: 4 March 2018 / Revised: 30 June 2018 / Accepted: 6 July 2018 / Published online: 2 August 2018
© The Author(s) 2018. This article is published with open access

Abstract

Diseases of marine animals caused by bacteria of the genus *Vibrio* are on the rise worldwide. Understanding the eco-evolutionary dynamics of these infectious agents is important for predicting and managing these diseases. Yet, compared to *Vibrio* infecting humans, knowledge of their role as animal pathogens is scarce. Here we ask how widespread is virulence among ecologically differentiated *Vibrio* populations, and what is the nature and frequency of virulence genes within these populations? We use a combination of population genomics and molecular genetics to assay hundreds of *Vibrio* strains for their virulence in the oyster *Crassostrea gigas*, a unique animal model that allows high-throughput infection assays. We show that within the diverse Splendidus clade, virulence represents an ancestral trait but has been lost from several populations. Two loci are necessary for virulence, the first being widely distributed across the Splendidus clade and consisting of an exported conserved protein (R5.7). The second is a MARTX toxin cluster, which only occurs within *V. splendidus* and is for the first time associated with virulence in marine invertebrates. Varying frequencies of both loci among populations indicate different selective pressures and alternative ecological roles, based on which we suggest strategies for epidemiological surveys.

Introduction

Global change due to rising temperature and ocean acidification but also more directly due to anthropogenic influences, such as widespread use of aquaculture, is predicted to lead to a worldwide increase in *Vibrio*-associated illness of marine organisms [1–3]. This development is illustrated by recent outbreaks of disease in *Crassostrea gigas* (oyster) farms in France [4, 5], in which strains related to the Splendidus clade have been implicated [6–10]. The Splendidus clade is a large group of closely related species (e.g., *V. splendidus*, *V. crassostreae, V. tasmaniensis,* and *V. cyclitrophicus*) containing several facultatively pathogenic members that affect diverse marine organisms [11, 12]. Elevated host density due to farming is a likely factor involved in *Vibrio*-associated disease. However, it is less well understood whether the bacteria are drawn from environmental reservoirs of potential pathogens or have arisen by recent acquisition of virulence traits in response to increased host availability due to aquaculture. The latter appears to be the case in *V. crassostreae*, which we recently demonstrated to have emerged as an oyster pathogen at least partially as a result of the population-specific spread of a

These authors contributed equally: Maxime Bruto, Yannick Labreuche

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Martin F. Polz
mpolz@mit.edu

✉ Frédérique Le Roux
frederique.le-roux@sb-roscoff.fr

[1] Ifremer, Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, F-29280 Plouzané, France

[2] Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688 Roscoff Cedex, France

[3] Ifremer, LEMAR UMR 6539, 11 presqu'île du Vivier, 29840 Argenton-en-Landunvez, France

[4] Parsons Laboratory for Environmental Science and Engineering, MIT, Cambridge, MA 02139, USA

virulence plasmid [6]. However, collections of environmental pathogens are typically biased toward isolates from diseased animals [13, 14]. It is thus difficult to assess how broadly distributed virulence potential is among *Vibrio* spp., i.e., whether virulence is limited to few strains within populations or is a trait of the entire species. We therefore reasoned that assessment of virulence properties within populations of *Vibrio* spp. in natural environments where oysters are not farmed, could be used to determine what level of taxonomic resolution has the greatest predictive power for disease risk assessment in oyster-farming areas.

Here we determine the virulence potential of a large collection of *Vibrio* strains using specific pathogen-free (SPF) oysters as a model. The bacterial strain collection derives from a single location without intense oyster farming, on the Atlantic coast of the United States (Massachusetts, Plum Island). Extensive genetic and microhabitat characterization of these isolates has been previously reported and identified genetically defined groups that correspond to ecologically distinct habitats. This is indicative of different lifestyles (free-living or attached to different types of particulate organic matter and zoo- or phytoplankton) between these groups [15–18]. Subsequent work has found multiple lines of evidence these *Vibrio* groups represent biologically distinct populations with respect to gene flow [19, 20] and interaction with other organisms (social/behavioral networks) [21–23]. As such, these populations fit species concepts as typically used in plant and animal ecology; however, we note that they are at a finer evolutionary divergence than those traditionally used to separate species in bacterial taxonomy. To assess the virulence potential of these populations, we injected a large number of strains into juvenile SPF oysters and monitored their mortality. These animals are descendants of a pool of genitors that are produced in hatchery under highly controlled conditions to minimize the influence of genetic and environmental parameters that could affect the host sensitivity to the disease [10, 24, 25]. Moreover, these SPF oysters can be used for high-throughput experimental infections with hundreds of individual bacterial isolates [9, 10, 26]. Assaying the virulence of strains by injection has drawbacks, as it fails to capture the importance of initial infection events such as mobility and chemotaxis. However, *Vibrio* spp. related to Splendidus (both virulent and non-virulent) naturally colonize the oyster hemolymph [6] and injection in the adductor muscle allows the direct transfer of bacteria in the hemolymph. Here screening *Vibrio* strains by injection allows the identification of traits that cause death in the animals. It is thus possible to ask whether the functional units of pathogenesis for oysters are either clones that have emerged after recent acquisition of virulence factors by horizontal gene transfer (HGT) or populations of diverse genotypes with virulence as a core function [27].

We show that the ability to trigger oyster mortality is an ancestral trait of populations within the Splendidus clade and depends on at least two loci. While in some populations all members are potentially virulent, the trait occurs intermittently in other populations and some populations have lost it altogether. The ancestrally acquired gene R5.7 is necessary for full virulence and while it has co-diversified with populations, it was lost in the non-virulent populations. Across populations, additional genes may, however, play a role in virulence. This is illustrated by the occurrence of several different types of MARTX gene clusters in *V. splendidus* for which frequency-dependent selection is suggested. The widespread occurrence of virulence genes across environmental *Vibrio* populations suggests an important biological role but their different frequency also indicates that the role is population specific.

Materials and methods

Genome sequencing, assembly, and annotation

In the present study, a total of 37 strains (Table S1) were sequenced (Plateforme génomique, Institut Pasteur, Paris) using the Illumina HiSeq2000 technology with ~50-fold coverage as described previously [9]. Contigs were assembled de novo using Velvet [28]. Computational prediction of coding sequences together with functional assignments was performed using the automated annotation pipeline implemented in the MicroScope platform [29]. Some gene annotations were manually curated using InterPro, FigFam, PRIAM, COGs, PsortB, TMHMM, and synteny group computation.

Protein family identification

The proteome of each strain was first compared by performing a Blastp all-vs-all. The SiLiX software [30] was used to reconstruct protein families based on reciprocal alignment length (at least 80% of sequence length) and different thresholds of identity depending on the analysis. A threshold of 60% identity was used when comparing two populations, while a threshold of 80% was used to reconstruct families within a population.

Phylogenetic tree construction

Species trees were reconstructed based on core genes present in a single copy. Protein sequences of each family were first aligned with Muscle, filtered using Gblocks with relaxed parameters [31] and concatenated using a custom script (available at https://github.com/mbruto/OPOPOP). Phylogenetic reconstruction was done using RAxML [32]

on this concatemer using a LG model of evolution with a gamma model and default parameters. For single-marker gene trees, we aligned the sequences with Muscle and performed the phylogenetic reconstruction with RAxML using a GTR model of evolution with a gamma model and default parameters.

Phylogenetic logistic regression analysis

The correlation between gene family presence/absence and virulence (percentage of induced mortality) was computed using the phylogenetic logistic regression implemented in the R package "phylolm" [33]. Virulence was first standardized to have a mean equal to 0 and standard deviation equal to 1, as suggested in previous work [34]. The following command was used to infer a correlation coefficient: *phyloglm(Fam ~ Mort, phy = Tree, data = Corr_data, method = "logistic_MPLE")*. The variable *Corr_data* is a table containing the presence/absence of a single family in the first column (named *Fam*), while the second column contains virulence values that were standardized to have a mean of 0 and a standard deviation of 1 (named *Mort*). The *Tree* variable is the species tree of the strains considered. We used the logistic_MPLE model as it appears to be the most general one and can be applied on a wider range of data sets [33].

Ancestral character reconstruction

Ancestral character reconstructions were performed with the version 3.31 of Mesquite (http://mesquiteproject.org) using the maximum parsimony method. The presence or absence of the Splendidus specific locus R5.7/8 was coded as 1 or 0 in a character matrix. Together with the species tree, this matrix was used as an input to reconstruct the presence or absence of the cluster on each node using the unordered parsimony model, in which acquisitions and losses have an equal cost.

Molecular microbiology

The *Vibrio* collection used for the high-throughput infection assays (population F1–18), i.e., Plum Island collection, has been described previously [15]. The *Vibrio* strains isolated from a French oyster farming area have been described by Bruto et al. [6]. Strains and plasmids used or constructed in the present study are described in Table S2 and S3. *Vibrio* isolates were grown at 20 °C in Zobell broth or agar (4 g l^{-1} bactopeptone and 1 g l^{-1} yeast extract in artificial seawater, pH 7.6), Luria-Bertani (LB), or LB-agar (LBA) + 0.5 M NaCl. *Escherichia coli* strains were grown at 37 °C in LB or on LBA for conjugation experiments and in ZYP 5052 medium [35] for induction of protein expression in *E. coli*, strain BL21 (DE3). Chloramphenicol (Cm, 5 or 25 µg ml^{-1} for *Vibrio* and *E. coli*, respectively), carbenicillin (100 µg ml^{-1}), thymidine (0.3 mM), and diaminopimelate (0.3 mM) were added as supplements when necessary. Induction of the P_{bad} promoter was achieved by the addition of 0.2% L-arabinose to the growth media, and conversely, was repressed by the addition of 1% D-glucose. Deletion of selected regions or genes was performed by allelic exchange using the pSW7848T suicide plasmid [36, 37]. To this end, two 500-bp fragments flanking the target region or gene were amplified (see primer details in Table S4), cloned into pSW7848T as previously described [9], and transferred by conjugation from *E. coli* as a donor to *Vibrio* as a recipient. Subsequently, the first and second recombinations leading to pSW7848T integration and elimination were selected on Cm/glucose and arabinose-containing media, respectively. Gene inactivation was performed by cloning 500 bp of the target gene in pSW23T [38] and selecting on Cm the suicide plasmid integration obtained by a single recombination [8]. For complementation experiments, the R5.7 gene was cloned in Apa1/Xho1 sites of the pMRB plasmid known to be stable in *Vibrio* spp. [39], resulting in a constitutive expression from a P_{lac} promoter [9]. Conjugation between *E. coli* and *Vibrio* was performed at 30 °C as described previously [36]. The BL21(DE3) strains expressing the R5.7_GFP fusion proteins were constructed using the Gibson assembly method (New England Biolabs, NEB) as previously described [40]. Briefly, the fragment encoding the green fluorescent protein (GFP) was amplified from plasmid pMRB-GFP [6] (see primer details in Table S4). $R5.7_{F12}$ and $R5.7_{crass}$ genes, including a flexible linker were PCR-amplified from genomic DNA of strains B8 and J2-9, respectively. The pFO4 vector, that contains a His6-tag at the N terminus for affinity purification, was amplified by PCR inside-out. All constructs were confirmed by sequencing prior to electrocompetent BL21(DE3) transformation.

Purification of recombinant proteins

Recombinant $R5.7_{F12}$ and $R5.7_{crass}$ proteins were purified as previously described [40]. Briefly, after expression of the proteins in ZYP 5052 (20 °C, 72 h) and chemical cell lysis, the lysate was clarified at 13,865 × *g* for 45 min at 4 °C. The supernatant was loaded on a 5-ml GE HisTrap HP column, washed twice with 20 mM Na_3PO_4, pH 8.0, 290 mM NaCl, and 5 mM imidazole, and eluted using a gradient of 1–100% 20 mM Na_3PO_4, pH 8.0, 290 mM NaCl, and 1 M imidazole. Fractions containing the protein of interest were pooled, concentrated (molecular weight cutoff of 10 kDa), and loaded onto a Superdex S200 column in HEPES that contains 20 mM NaCl at 150 mM, pH 7.4. Fractions were again pooled and concentrated. The concentration was calculated from A_{280} and the extinction coefficient was

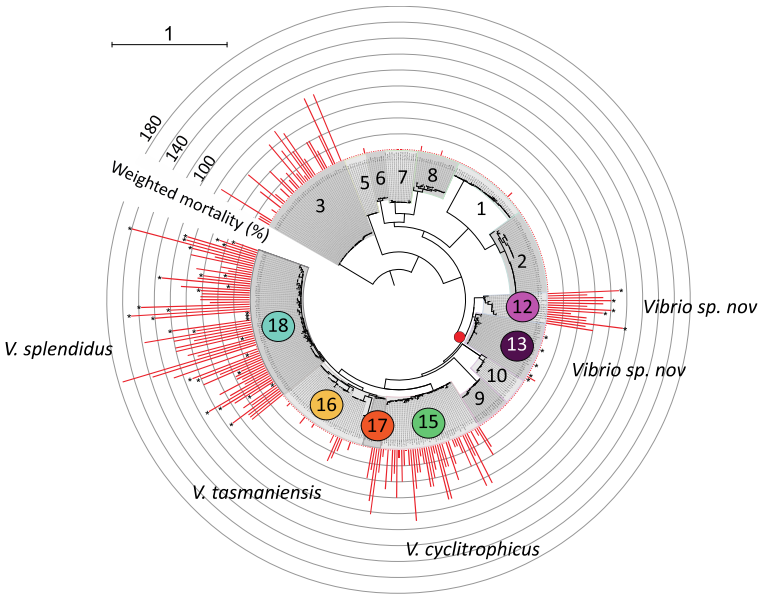


Fig. 1 Mortality induced in oysters by *Vibrio* populations. The virulence potential mapped onto the isolate phylogeny (*Vibrio* collection from Plum Island, MA, USA). The tree is based on the genetic marker *hsp60* and comprises different genotypic clusters previously found to have a cohesive ecology and hypothesized to represent samples from natural ecological populations [15]. The closest named species to populations are as follows: F1: *Enterovibrio calviensis*; F2: *Enterovibrio norvegicus*; F3: *V. ordalii*; F4: *V. rumoiensis*; F5: *V. alginolyticus*; F7 *Aliivibrio fischeri/logei*; F8: *A. fischeri*; F9: *V. superstes*; F15: *V. cyclitrophicus*; F16–17: *V. tasmaniensis*; F18: *V. splendidus*. Populations F6, 10, 12, and 13 were not assigned to a species and were thus named here as *Vibrio sp. nov*. The node leading to the Splendidus clade in this tree is indicated by a red dot and the six populations belonging to the Splendidus clade are each indicated by distinct colors (also used in subsequent figures). Note that the presence of populations F9 and F10 within this cluster on the *hsp60* tree is an artifact of a recombination event in that gene and they are not members of the Splendidus clade, as determined by a full genome analysis. Red bars indicate weighted mortality (using *V. crassostreae* J2-9 mortality rate as a reference to evaluate variability between experiments) induced by individual strains 24 h after injection in oysters ($n = 20$). The range of variability for J2-9 between experiments (50–90%, data not shown) was lower than the variability between populations. Stars indicate the available genome sequences

calculated using the ProtParam tool from ExPASy ($\varepsilon_{0.1\%}$ of 1.04).

Experimental determination of mortality

To determine the virulence of isolates, bacteria were grown under constant agitation at 20 °C for 24 h in Zobell media. One hundred microliters of the culture (10^8 colony-forming units, cfu) were injected intramuscularly into oysters. Co-injections of the ΔR5.7 mutant with the recombinant purified $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{crass}$ proteins were performed following the same procedure, except that the tested protein (30 µg/animal) or the corresponding volume of protein solubilization buffer (as a control) were added to the bacterial suspension 1 h before injection. The bacterial concentration was confirmed by conventional dilution plating on Zobell agar. After injection, the oysters were transferred to aquaria (20 oysters per 2.5 l of aquarium) containing 1 l of aerated 5-µm-filtered seawater at 20 °C, and kept under static conditions. Experiments were performed in duplicate at least twice, and mortality was assessed after 24 h.

Results

Virulence is an ancestral trait of several ecological populations

We first investigated the frequency of virulence among 405 strains representing 15 ecological populations sampled randomly from Plum Island (MA) [15, 17] by injecting them individually into SPF oysters. This showed that nine populations contained exclusively non-virulent strains, while six of them were potentially virulent with the majority (5/6) of these being in the Splendidus clade (Fig. 1, populations belonging to the Splendidus clade are each indicated by distinct colours). All the strains of population F12, which represents a new species closely related to *V. crassostreae* [41], induced high levels of oyster mortality, while populations F15 (taxonomically assigned to the species *V. cyclitrophicus)*, F17 (*V. tasmaniensis*), and F18 (*V. splendidus*) are predominantly virulent, and population F16 (*V. tasmaniensis*) mostly contains non-virulent strains. The only highly virulent population outside the Splendidus clade

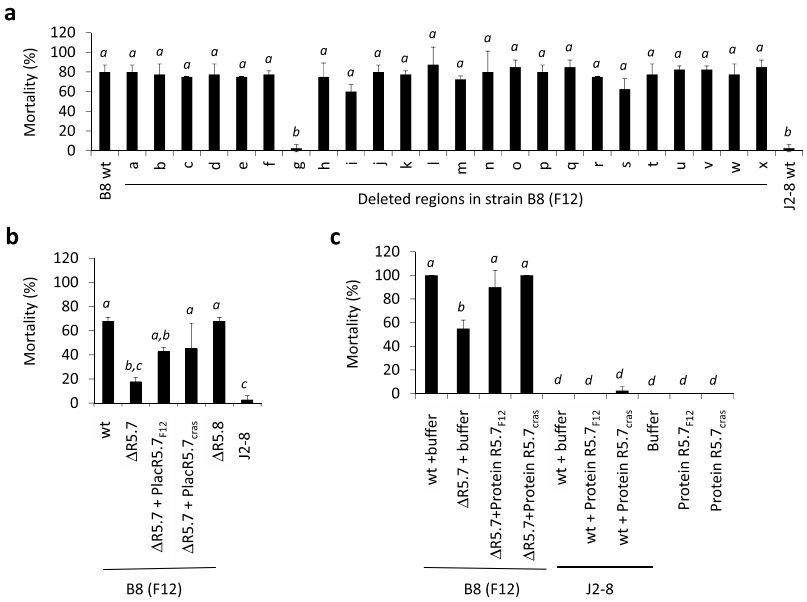


Fig. 2 Oyster mortality in response to experimental infection with *Vibrio* wild-type strains and derivatives. **a** Twenty four population-specific regions were deleted in *Vibrio sp. nov* F12 strain B8. Virulence of the wild-type B8 strain (wt), derivatives (deletion of regions a to x), and *Vibrio sp. nov* F13-like strain J2-8 as a negative control was compared after injection of strains (10^8 cfu/animal) into 20 oysters and counting the percent mortality at 24 h (*y* axis). **b** Comparison of mortality induced by B8 wild-type strain (wt), the mutants obtained by R5.7 or R5.8 single-gene deletion (ΔR5.7 or ΔR5.8), and the complementation assay in ΔR5.7 after the transfer of a plasmid that expressed $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{cras}$ constitutively from a Plac promoter ($P_{lac}R5.7_{F12}$ and $P_{lac}R5.7_{cras}$). **c** Complementation assays using recombinant purified protein R5.7, the wild-type strains (B8, J2-8) injected with buffer (wt + buffer), the mutant obtained by R5.7 single-gene deletion with buffer (ΔR5.7 + buffer), the mutant ΔR5.7 or J2-8 co-injected with the recombinant purified proteins $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{cras}$, the recombinant proteins, or buffer as control. All experiments were performed in duplicate and at least twice. Means with the same letter in italic are not significantly different from each other (ANOVA, $p < 0.05$ and Tukey HSD test)

is F3, which is taxonomically assigned to *V. ordalii*, a species that has been associated with fish disease [42]. The observed high prevalence of virulence among populations in the Splendidus clade led us to test the hypothesis that the ability to kill oysters might be an ancestral trait for the entire clade by (i) identifying putative virulence genes by comparative genomics and genetic knockout and (ii) reconstructing the acquisition and inheritance of the virulence genes among populations.

The same genes are necessary for full virulence across the Splendidus clade

To test the hypothesis of ancestral virulence in the Splendidus clade, we first sought to identify genes potentially responsible for virulence using comparative genomics of populations F12 (*Vibrio sp. nov*) and F13 (*Vibrio sp. nov*), since these are the most closely related populations that contain exclusively virulent and non-virulent strains, respectively (Fig. 1). Using genomes of five isolates from each population, we identified 120 genes to be specific to the virulent population F12, of which 87 genes were localized in 24 genomic regions, designated regions a through x (i.e., Ra through Rx) (Table S5). Annotation implicates many of these genes in regulation, detoxification, xenobiotic degradation, siderophore production, or acquisition, i.e., the ability to respond to transient selective pressure in the environment.

Using a genetic knockout approach, we next investigated the importance of these loci for the virulence of population F12 strain 10N.286.48.B8 (hereafter named B8). None of the 24 deletions impaired bacterial growth in culture media (data not shown) and only the deletion of region Rg resulted in a decrease in oyster mortalities after experimental infection (Fig. 2a). This region contains two genes VB12B8_v1_40197 and VB12B8_v1_40198, each encoding an exported protein of unknown function. Notably, these genes showed 91 and 90% identity to the R5.7 and R5.8 proteins of *V. crassostreae*, respectively [9]. For simplicity, these genes are subsequently referred to as $R5.7/8_{cras}$ or $R5.7/8_{F12}$ for *V. crassostreae* and population F12, respectively. A mutant lacking the $R5.7_{F12}$ gene ($\Delta R5.7_{F12}$) revealed that this gene contributes to B8 virulence (Fig. 2b), as previously shown for $R5.7_{cras}$. When constitutively expressed in trans from a plasmid, $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{cras}$ were

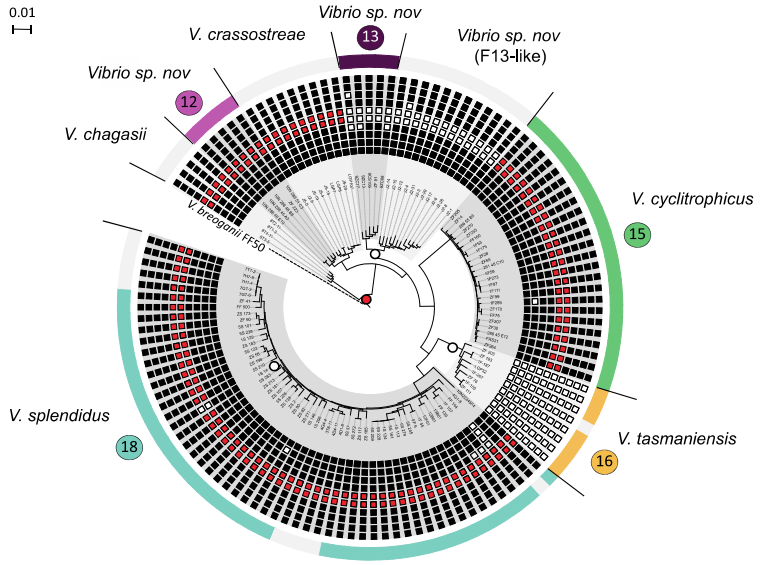


Fig. 3 Distribution of the R5.7 and R5.8 cluster and the surrounding genes in the Splendidus clade. The phylogenetic tree was reconstructed on an alignment of 707 concatenated core proteins and rooted with *V. breoganii* FF50. The length of the outgroup branch has been arbitrarily defined (dashed line) to increase the resolution of the tree. The eight species considered are highlighted in alternating grays. Strains isolated from Plum Island are indicated by the same color code as in Fig. 1 (outer-circle). Species assignment and correspondence to population assignment in Fig. 1 are also indicated. Strains isolated from oyster-farming areas in France, i.e., *V. chagasii, V. crassostreae*, and *Vibrio sp. nov* F13-like are indicated in gray (outer-circle). The absence and presence of the R5.7/8 cluster are represented by white and red squares, respectively. The presence of the surrounding genes is indicated by a black square if they belong to the same syntenic group of the R5.7/8 gene cluster (see also Figure S1). Note that in *V. splendidus*, only the strain 1S_14 lacks the R5-7/8, while strains FF_139, FF-144, and 1S-157 lack at least one flanking gene. Red and white circles on the tree indicate acquisition and loss of R5.7/8, respectively

sufficient to partially restore the virulence of the mutant $\Delta R5.7_{F12}$. Furthermore, a complete restoration of virulence was observed by co-injecting the $\Delta R5.7_{F12}$ with the recombinant purified $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{cras}$ proteins (Fig. 2c). On the other hand, these proteins did not induce mortality when injected alone or co-injected with the non-virulent strain J2-8, showing that R5.7 is not sufficient to induce mortality. Finally, the deletion of the R5.8 gene did not alter the virulence of the B8 strain, showing that only R5.7 is necessary for the contribution of Rg to virulence.

R5.7/8 appear highly specific to the Splendidus clade, as evidenced from the distribution in 872 available genomes from 30 different species of *Vibrio*. First, R5.7 is always colocalized with R5.8 (Fig. S1). Second, this gene cluster is restricted to the Splendidus clade encompassing the populations F12 *(Vi brio sp. nov*), F15 (*V. cyclitrophicus*), and F18 *(V. splendidus*) from the Plum Island collection, as well as populations of strains previously isolated from a French oyster farming area and assigned to *V. chagasii*, *V. splendidus,* and *V. crassostreae* [6, 9] (Fig. 3). We note that population F17 *(V. tasmaniensis)* shown in Fig. 1 from the Plum Island collection was not evaluated since there are currently no genomes available. We also confirmed the importance of the R5.7 homolog for virulence in *V. chagasii* and *V. splendidus* by inactivating this gene in strains representative of these species (Fig. S2). Finally, the genomic comparison showed that the R5.7/8 gene cluster is absent in three out of eight populations within the Splendidus clade (Fig. 3), populations F13 (*Vibrio sp. nov*) and F16 (*V. tasmaniensis*) from the Plum Island collection, and also in *Vibrio sp. nov* F13-like isolated in France. Moreover, a single non-virulent *V. splendidus* strain, 1S_14, was lacking the gene (confirmed by PCR, data not shown). Altogether, these results suggest that the R5.7 gene is necessary for full virulence across the entire Splendidus clade.

We next tested whether the R5.7/8 gene cluster distribution in the Splendidus clade is best explained by (i) ancestral acquisition followed by multiple losses or (ii) multiple independent acquisitions. Reconstruction of the most parsimonious ancestral character state of the R5.7/8 genes suggests an acquisition in the most recent common ancestor (MRCA) of the Splendidus clade followed by three distinct losses in the MRCAs of populations F13, F16, and F13-like (Fig. 3). The R5.7/8 gene tree is highly congruent with the species tree (Fig. 4), suggesting vertical inheritance and persistence of the gene cluster through speciation events that likely involved differential ecological specialization of

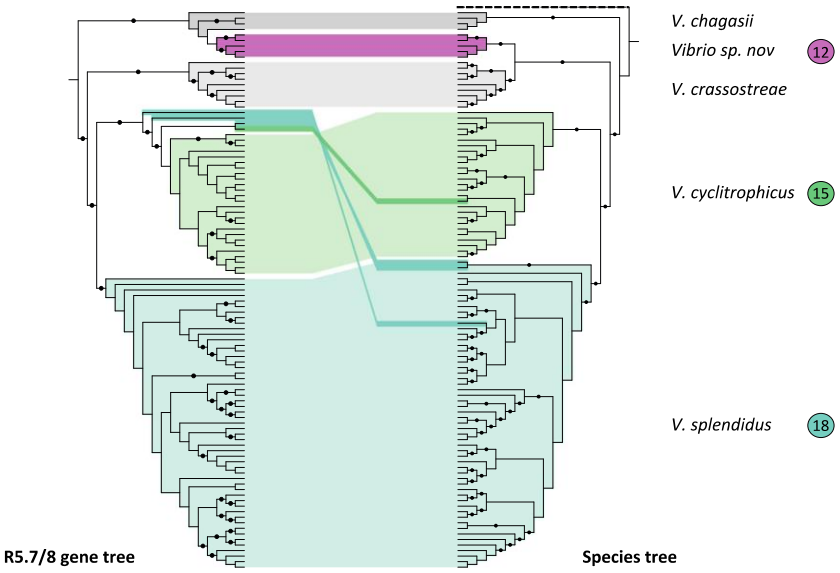


Fig. 4 Comparison of the R5.7 and R5.8 concatenated gene tree with the species tree for populations of the Splendidus clade. The species tree (right) was reconstructed based on an alignment of 707 concatenated core proteins and rooted with *V. breoganii* FF50. Both trees are represented without branch lengths and the outgroup is represented with a dashed line on the tree. Black points on branches indicate a support value above 80% based on the rapid bootstrap analysis implemented in RAxML. Species are linked with different colors in both trees, and population correspondence with Fig. 1 is also indicated. Supported incongruences between R5.7/8 gene cluster (left) and species trees were identified for *Vibrio sp. nov* F12 (pink), one *V. cyclitrophicus* (darker green), and three *V. splendidus* strains (darker turquoise)

the populations. The main exception to this vertical inheritance pattern is population F12, which is most closely related to *V. crassostreae* in the species tree but is sister to *V. chagasii* in the R5.7/8 tree indicating horizontal acquisition. Although the R5.7/8 gene tree clusters the vast majority of strains within their previously assigned populations, four strains are an exception: one *V. cyclitrophicus* (out of 27) and three *V. splendidus* (out of 56) appear to have acquired the R5.7/8 locus horizontally (Fig. 4). This more recent acquisition most likely involved homologous recombination since annotation of genes present within 20 kb upstream and downstream of the R5.7/8 locus did not identify any potential insertion sites for mobile genetic elements. However, such gene conversions appear to be the exception and our analysis predicts that R5.7/8 was ancestrally acquired and subsequently predominantly vertically inherited in the Splendidus clade.

Acquisition and loss of MARTX toxin modulates virulence

The above genomic analysis also showed that R5.7 was present in non-virulent strains belonging to populations F15 and F18 (Figs. 1 and 3), suggesting that the gene is necessary but not sufficient for virulence and that other genes may play a role that these strains might have lost or never acquired. To test this hypothesis of additional virulence genes, we first computed the correlation between gene family presence/absence and induced mortalities using phylogenetic logistic regression in population F18 (*V. splendidus*) (see Materials and methods).

Among 12,158 families, only six genes, which were all colocalized in a single locus, showed a high correlation factor ($c = 4.01$; $P = 0.005$) (Fig. 5a). This locus encodes a putative toxin (MARTX encoded by the gene *rtxA*), a putative acyltransferase (*rtxC*), an uncharacterized protein (*rtxH*), and a putative type-I secretion system (*rtxBDE*). Because this comparison strongly suggested *rtxACHBDE* as additional virulence genes, we genetically assessed the importance of this locus for *V. splendidus* virulence.

The deletion of the complete *rtxACHBDE* locus in three strains (ZS_173, ZS_185, and ZS_213) did not impair growth in culture media, but resulted in a considerable decrease in mortalities after injection of bacteria (Fig. 6), demonstrating a role of this locus in *V. splendidus* virulence. MARTX toxins have been defined as "multifactorial effector cargo translocation, processing and delivery machines" (reviewed by refs. [43, 44]). As in other bacteria, the MARTXs found in *V. splendidus* ($MARTX_{Vs}$) are extremely large (3646–5097 aa) and

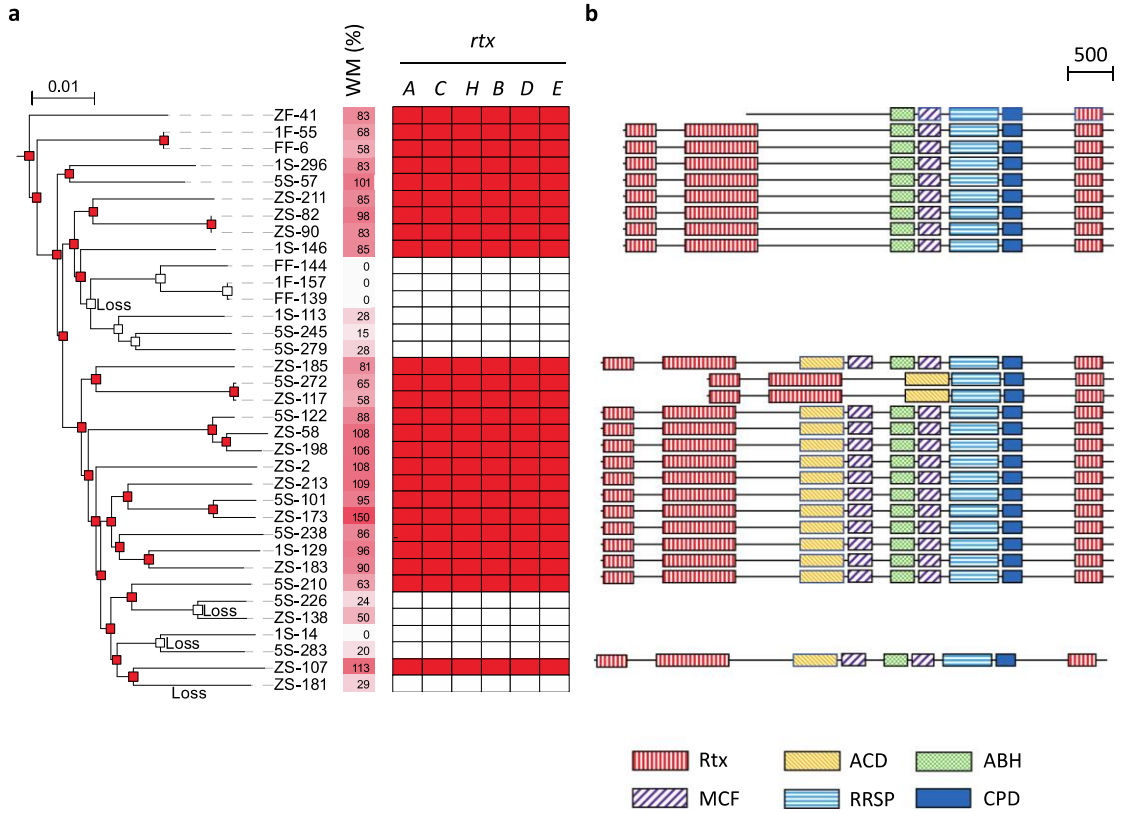


Fig. 5 Distribution, evolutionary history, and domain variation of the *rtxACHBDE* cluster in *V. splendidus* related to induced mortality in oysters. **a** The phylogenetic tree is based on an alignment of 2290 concatenated core genes. Weighted mortalities (WM, using *V. crassostreae* J2-9 mortality rate as a reference to evaluate variability between experiments) after injection in oysters ($n = 20$) are indicated by a color gradient from white (0%) to red (150%). The range of variability for J2-9 between experiments (50–90%, data not shown) was lower than the variability between populations. Gene presence and absence is represented by red and white squares, respectively. Losses are indicated when the *rtxACHBDE* cluster is predicted to be absent on a node (or leaf) while being present in the parent node. **b** Diversity of MARTX identified in *V. splendidus*. The domain abbreviations are Rtx repeats in toxin, ACD actin cross-linking domain, ABH alpha/beta hydrolase, MCF makes caterpillars floppy, RRSP Ras/Rap1-specific endopeptidase, CPD cysteine protease domain [44]. A scale bar indicating protein length in amino acids is present on the top right of the figure

contain several domains (Fig. 5b). $MARTX_{Vs}$ is predicted to contain the three domains found in all MARTXs, i.e., the core structure composed of two conserved regions at the amino- and carboxyl-termini and a cystein protease domain (CPD) [45]. Only one effector domain, a Ras/Rap1-specific endopeptidase (RRSP) [46, 47] is present in all $MARTX_{Vs}$. A homolog of the actin cross-linking domain (ACD) [48] allows distinguishing two main variants of $MARTX_{Vs}$ but the presence of ACD is not associated with heightened virulence among strains. The α/β hydrolase (ABH) and the cysteine protease (MCF) domains [49] are absent from only two *V. splendidus* strains (5S-272 and ZS-117) out of 24, that are still virulent. Finally, the Rho inactivation domain (RID) [50] found in *V. cholerae* and *V. vulnificus* and associated with a "cell rounding" effect is absent from *V. splendidus*. Hence, none of the domains ACD and RID previously demonstrated to affect polymerized actin in target eukaryotic cells, seem to be key domains of *V. splendidus* MARTX activity, while the RRSP may be hypothesized as an essential domain for its activity.

In the Splendidus clade, the *rtxACHBDE* cluster is found only in *V. splendidus* but is also present in several more distantly related *Vibrio* species (Fig. 7). Within *V. splendidus*, the locus is present in 24/35 members (Fig. 5a), is chromosomally encoded, and does not show any signs of recent acquisition by HGT involving non-homologous mechanisms. Across all 872 genomes of *Vibrionaceae* (Fig. 7), this cluster is identified in seven additional species that have all been associated with disease in humans or

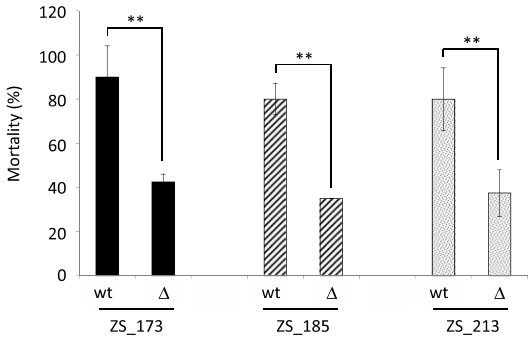


Fig. 6 Oyster mortality in response to experimental infection with *V. splendidus* wild-type strains and Δ*rtxACHBDE* derivatives. The *rtxACHBDE* locus was deleted in three *V. splendidus* strains (ZS_173, ZS_185, and ZS_213). Virulence of the wild type (wt) and derivative (**Δ**) was compared after injection of strains (10^8 cfu/animal) in 20 oysters and counting the percentage of mortalities at 24H (*y* axis). Experiments were performed in duplicate and repeated twice. Two stars indicate highly significant differences between treatments (Wilcoxon test, $p > 0.005$)

animals [43, 44]. The frequency of the locus (strains carrying the *rtxACHBDE* cluster/total) appears different between species. In *V. cholerae, V. vulnificus*, and *V. ordalii*, the cluster is present in the vast majority of the strains, suggesting strong selection for its maintenance, irrespective of their source of isolation. In *V. cholerae* and *V. vulnificus*, 153 of 167 and 15 of 16 clinical isolates, and 37 of 43 and 16 of 16 environmental isolates contained the *rtxACHBDE* cluster, respectively. Conversely, in the shrimp pathogen *V. nigripulchritudo*, the cluster is restricted to six strains that belong to the same pathogen-containing lineage and is carried by a plasmid [51, 52]. Similarly, in *V. harveyi* and *V. aestuarianus*, the locus is detected in only 3 of 23 and 1 of 12 strains, respectively, and annotation of flanking regions indicates a recent acquisition by HGT (plasmid genes, transposase, and syntenic rupture). Hence *rtxACHBDE*, although widespread among *Vibrio* spp., appears to be present at variable frequencies within species, indicating potentially different selective pressures on the gene cluster.

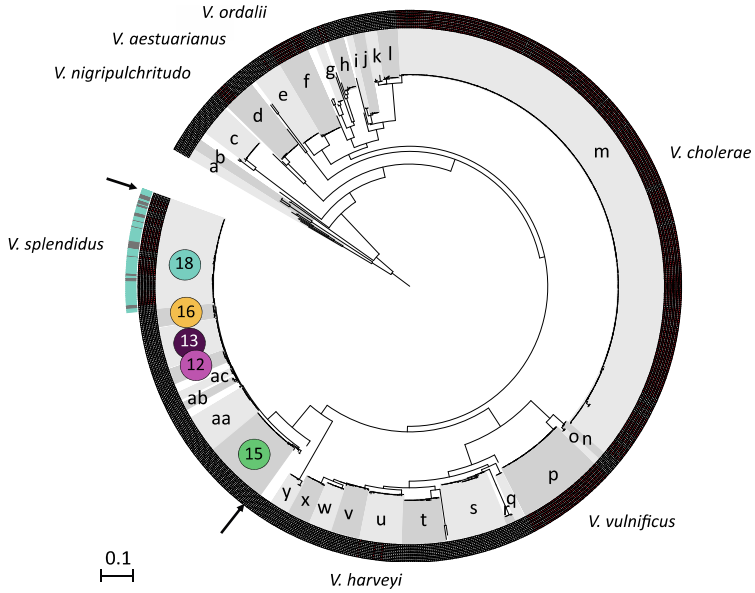


Fig. 7 Distribution of the *rtxACHBDE* cluster in the genomes of 30 *Vibrio* species. The phylogenetic tree was reconstructed using the RctB protein sequence. The inner circle indicates the presence (red square) or absence (white square) of the six genes in the *rtxACHBDE* cluster. The outer circle indicates the isolation site of the *V. splendidus* strains with a turquoise for Plum Island and gray for oyster-farming areas in France. The 30 different *Vibrio* species and two *Vibrionaceae* genus outgroups are represented using alternating grays with the following letters: (a) *Photobacterium* spp.; (b) *Enterovibrio* spp.; (c) *V. breoganii*; (d) *V. nigripulchritudo*; (e) *V. aestuarianus*; (f) *V. ordalii*; (g) *V. scophthalmi*; (h) *V. coralliilyticus*; (i) *V. furnissii*; (j) *V. fluvialis*; (k) *V. metoecus*; (l) *V. mimicus*; (m) *V. cholerae*; (n) *V. navarrensis*; (o) *V. cidicii*; (p) *V. vulnificus*; (q) *V. natriegens*; (r) *V. parahaemolyticus*; (s) *V. alginolyticus*; (t) *V. rotiferianus*; (u) *V. harveyi*; (v) *V. campbellii*; (w) *V. owensii*; (x) *V. jasicida*; (y) *V. mediterranei*; (F15) *V. cyclitrophicus*; (aa) *V. crassostreae*; (ab) *V. chagasii*; (ac) *Vibrio sp. nov* F13-like; (F12) *Vibrio sp. nov*; (F13) *Vibrio sp. nov*; (F16) *V. tasmaniensis;* (F18) *V. splendidus*. The tree was rooted with *Photobacterium* spp. and *Enterovibrio* spp. Populations of the Splendidus clade are grouped between the two arrows and population correspondence with Fig. 1 is indicated by the same color code

Discussion

Ecological and evolutionary dynamics of virulence genes have been poorly documented for *Vibrionaceae* in the wild, and most knowledge stems from a handful of human pathogens isolated from clinical cases where the focus has been on pathogen emergence by gene acquisition and expansion of virulent clones [53–56]. Here we show that virulence toward juvenile oysters appears to be an ancestral trait in the Splendidus clade triggered by the acquisition and subsequent vertical inheritance of the R5.7/8 gene cluster. Populations F12 (closely related to *V. crassostreae)*, F15 (*V. cyclitrophicus)*, and F18 (*V. splendidus*) have all previously been implicated in mortality of a wide range of animals [8, 57], and our results show that the ability to be virulent is characteristic of the entire populations, rather than recently emerged clones. Consequently, non-virulent populations and strains have evolved by gene loss and expansion. However, we also show that increased virulence likely involves additional gene acquisitions, as demonstrated for the *rtxACHBDE* gene cluster, which in our collection was specifically acquired by *V. splendidus*. Because our results indicate that the R5.7 gene is necessary but not sufficient for virulence, we hypothesize that the other virulent populations within the Splendidus clade (e.g., F15, *V. cyclitrophicus*) may contain additional yet-to-be-determined virulence genes.

The only virulent population outside the Splendidus clade in our collection is F3, *V. ordalii*, which has been associated with fish disease [42] and belongs to the Anguillarum clade that contains the fish pathogen *V. anguillarum* and the oyster pathogen *V. aestuarianus* [26]. This widespread distribution of pathogenicity among closely related species suggests that similar to the Splendidus clade, virulence traits might have been acquired by the MRCA of the Anguillarum clade. One candidate gene is a zinc metalloprotease, which has been demonstrated in *V. aestuarianus* to be sufficient to cause exotoxicity [58] and to be necessary for virulence in *V. anguillarum* [59]. Moreover, we also found this gene in all *V. ordalii* genomes (not shown). Hence, as is the case in the Splendidus clade, this zinc metalloprotease may be an ancestral virulence determinant gene that has been preserved through speciation events and that plays an important role in the biology of this clade.

Within the Splendidus clade, all virulent populations share the R5.7/8 gene cluster for which we show this to be ancestrally acquired. Only R5.7 seems necessary for full virulence and complementation assays using the purified $R5.7_{F12}$ or $R5.7_{cras}$ proteins strongly suggest that these conserved proteins interact with the external surface of *Vibrio* and/or its cellular target in oysters. The injection of the R5.7 protein alone or in the presence of non-virulent *Vibrio* strains did not affect oyster viability, showing that the protein alone does not have a lethal effect. Finally, a strong genetic linkage between R5.7/8 suggests functional interaction between these exported proteins of unknown function, in a mechanism that remains to be determined.

The R5.7/8 cluster can be present in non-virulent strains demonstrating that this cluster is necessary but not sufficient for virulence. Indeed, we show that an additional locus, the *rtxACHBDE* cluster, is necessary for full virulence towards oysters in *V. splendidus*. In other *Vibrio* species, the toxin MARTX has been demonstrated to work in concert with a cytolysin (in *V. vulnificus*) and a hemolysin (in *V. cholerae*), and it has been associated with the severity of infection by contributing to the evasion of innate immune defense [44]. An accessory role of MARTX in virulence might be expected in the shrimp pathogen *V. nigripulchritudo* [52] since it has been recently demonstrated that a lethal toxin, nigritoxin, is the major virulence factor of this pathogen [40, 51]. Among *V. splendidus* strains, MARTX contains diverse effector domains and only RRSP is shared by all strains. This domain encoding an endopeptidase has been implicated in other species in the cleavage of Ras and Rap1 proteins [46, 47]. Importantly these small GTPases play a role as regulatory nodes of intracellular signaling and membrane trafficking, including trafficking of Toll-like receptor 4 (TLR4) that is involved in innate immune response in both vertebrates and invertebrates [60]. Hence the presence and conservation of a RRSP domain suggest that in *V. splendidus*, MARTX might be involved in virulence by impairing the host innate immune responses.

The R5.7/8 and *rtxACHBDE* loci showed differential evolutionary dynamics that indicate distinct selective regimes. The high frequency within virulent populations and mostly vertical transmission of R5.7/8 suggest that it is maintained by positive selection. That three non-virulent populations within the Splendidus clade have lost the gene cluster further suggests that it is involved in niche differentiation at the species level. On the other hand, the *rtxACHBDE* cluster has been independently acquired by *V. splendidus* and distantly related other species, and this gene cluster varies in frequency across these species. Moreover, within *V. splendidus*, and similarly in *V. vulnificus* [61, 62], the composition of the effector domains appears heterogeneous, ranging from 4 to 6 effectors per toxin with only one, RRSP, found in all $MARTX_{vs}$. In *V. vulnificus*, such compositional variation has been shown to result from homologous recombination, shuffling effector domains such that different strains within the same species can express variants of the toxins that are likely to have distinct roles in the niche [44, 61–63]. Among the diverse $MARTX_{vs}$, 15 and 22 of 24 share an ACD and ABH domain, respectively. Moreover, 22 of 24 $MARTX_{vs}$ share at least one MCF domain with the MARTX type III of *V. vulnificus*. Although the functional consequences of this domain variation are not

fully understood, the MARTX type III of *V. vulnificus* appears to play a dual role in eel infection as well as in protection from predation by amoebae by causing the lysis of this grazer [64]. In both *V. splendidus* and *V. vulnificus*, the intermittent presence and domain diversity of the MARTX cluster are potential indicators of frequency-dependent selection [65]. Because MARTX is a very large secreted protein and hence costly to express, we hypothesize that public good dynamics may arise where producers are favored only when low in frequency within the population [66]. Additionally, variation in toxin types may arise as a result of the evolutionary arms race between bacteria and predators or host immune system and, hence, is similar to frequency-dependent selection imposed on O-antigen structure or outer membrane proteins [67–70].

Our analysis shows that a number of environmental *Vibrio* populations present a risk of virulence independent of intensive aquaculture settings. Because virulence represents a function encoded in the core genome of these populations, specific markers can be used for risk assessment rather than overall *Vibrio* abundance, as is frequently the practice. At a minimum, the R5.7/8 gene cluster may be used to indicate overall risk. However, population specific markers will facilitate a more detailed evaluation of the epidemiology of oysters. An important component of such surveys is the determination of population dynamics outside the oyster host to specifically recognize ecological conditions that may trigger population increases and hence risk of infection. Importantly, recent analysis of microbial dynamics in the coastal ocean has shown rapid, near weekly, turnover of communities that are characterized by short-lived blooms of different bacteria and eukaryotes [71]. Exploration to what extent such transient communities allow for specific blooms of different *Vibrio* populations may elucidate whether there are periods of increased risk from multiple co-occurring populations or whether risk is similar across extended periods due to sequential blooms of populations. In support of the former, we previously showed that several virulent populations of *Vibrio* can co-occur in diseased oysters, e.g., *V. crassostreae* with *V. splendidus* or *V. chagasii* [6]. We identified a plasmid that is present specifically in virulent strains of *V. crasssotreae* and necessary for full virulence [6]. Here we show that the MARTX gene cluster is involved in *V. splendidus* virulence and absent from the other virulent populations within the Splendidus clade. An interesting hypothesis to explore in the future is that other virulent populations such as *V. chagasii* or *V. cyclitrophicus* carry specific virulent traits. In a context of oyster infection by multiple co-occurring populations, these diverse virulence traits could act synergistically, increasing the vulnerability of the host. Indeed, experimental infections have demonstrated that some strains, belonging to the same [72] or different species [73], are moderately virulent when injected into oyster individually, and display heightened virulence in mixed experimental infections. Hence oyster disease may result from microbial interaction within and between populations and should be evaluated as potentially polymicrobial.

Disclaimer

The material represents an original result and has not been submitted for publication elsewhere.

Acknowledgements We thank the staff of the station Ifremer Argenton and Bouin, the ABIMS and CRBM (Roscoff) and LABGeM (Evry) plateforms, Astrid Lemire, David Goudenège, Remy Van Geersdaële, Julien Le Blanc and Christiane Le Roux for technical support. We are grateful to Jesse Shapiro (University of Montréal, Canada) for his thoughtful comments, which improved the manuscript. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-ADAP-0007-01 « OPOPOP» and ANR-16-CE32-0008-01 « REVENGE ») to FLR, the U.S. National Science Foundation (OCE-1441943) to MFP, Ifremer to MB, AJ, and DP, and the Region Bretagne to AJ and DP.

Author contributions YL, AJ, DP, SC, BP, and FLR performed experiments. MB performed the *in silico* analyses. MB, FLR, and MFP designed the experiments, interpreted results, and wrote the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest. The material represents an original result and has not been submitted for publication elsewhere.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Baker-Austin C, Trinanes JA, Taylor NGH, Hartnell R, Siitonen A, Martinez-Urtaza J. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. Nat Clim Change. 2013;3:73–7.
2. Le Roux F, Wegner KM, Baker-Austin C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C, et al. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). Front Microbiol. 2015;6:830.
3. Vezzulli L, Grande C, Reid PC, Helaouet P, Edwards M, Hofle MG, et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113:E5062–71.

4. Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers MA. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J Invertebr Pathol. 2015;131:2–10.
5. Travers MA, Boettcher Miller K, Roque A, Friedman CS. Bacterial diseases in marine bivalves. J Invertebr Pathol. 2015;131:11–31.
6. Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivesse S, Alunno-Bruscia M, et al. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. ISME J. 2017;11:1043–52.
7. Gay M, Berthe FC, Le Roux F. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis Aquat Organ. 2004;59:49–56.
8. Le Roux F, Zouine M, Chakroun N, Binesse J, Saulnier D, Bouchier C, et al. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. Environ Microbiol. 2009;11:1959–70.
9. Lemire A, Goudenege D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y, et al. Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. ISME J. 2014;9:1523–31.
10. Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. Front Microbiol. 2015;6:686.
11. Perez-Cataluna A, Lucena T, Tarazona E, Arahal DR, Macian MC, Pujalte MJ. An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. Syst Appl Microbiol. 2016;39:361–9.
12. Sawabe T, Koizumi S, Fukui Y, Nakagawa S, Ivanova EP, Kita-Tsukamoto K, et al. Mutation is the main driving force in the diversification of the *Vibrio splendidus* clade. Microbes Environ. 2009;24:281–5.
13. Spratt BG, Maiden MC. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1999;354:701–10.
14. Sundberg LR, Ketola T, Laanto E, Kinnula H, Bamford JK, Penttinen R, et al. Intensive aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria. Proc Biol Sci. 2016;283:20153069.
15. Hunt DE, David LA, Gevers D, Preheim SP, Alm EJ, Polz MF. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. Science . 2008;320:1081–5.
16. Preheim SP, Boucher Y, Wildschutte H, David LA, Veneziano D, Alm EJ, et al. Metapopulation structure of *Vibrionaceae* among coastal marine invertebrates. Environ Microbiol. 2011;13:265–75.
17. Preheim SP, Timberlake S, Polz MF. Merging taxonomy with ecological population prediction in a case study of *Vibrionaceae*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:7195–206.
18. Szabo G, Preheim SP, Kauffman KM, David LA, Shapiro J, Alm EJ, et al. Reproducibility of *Vibrionaceae* population structure in coastal bacterioplankton. ISME J. 2012;7:509–19.
19. Hehemann JH, Arevalo P, Datta MS, Yu X, Corzett CH, Henschel A, et al. Adaptive radiation by waves of gene transfer leads to fine-scale resource partitioning in marine microbes. Nat Commun. 2016;7:12860.
20. Shapiro BJ, Friedman J, Cordero OX, Preheim SP, Timberlake SC, Szabo G, et al. Population genomics of early events in the ecological differentiation of bacteria. Science . 2012;336:48–51.
21. Cordero OX, Ventouras LA, Delong EF, Polz MF. Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:20059–64.
22. Cordero OX, Wildschutte H, Kirkup B, Proehl S, Ngo L, Hussain F, et al. Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. Science . 2012;337:1228–31.
23. Yawata Y, Cordero OX, Menolascina F, Hehemann JH, Polz MF, Stocker R. Competition-dispersal tradeoff ecologically differentiates recently speciated marine bacterioplankton populations. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111:5622–7.
24. Petton B, Boudry P, Alunno-Bruscia M, Pernet F. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostreae gigas*. Aquac Environ Interact. 2015;6:205–22.
25. Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Aquac Environ Interact. 2013;3:257–73.
26. Goudenege D, Travers MA, Lemire A, Petton B, Haffner P, Labreuche Y, et al. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. Environ Microbiol. 2015;17:4189–99.
27. Le Roux F, Wegner KM, Polz MF. Oysters and Vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. Trends Microbiol. 2016;24:568–580.
28. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 2008;18:821–9.
29. Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, et al. MicroScope--an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. Nucleic Acids Res. 2013;41:D636–47. (Database issue)
30. Miele V, Penel S, Duret L. Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. BMC Bioinform. 2011;12:116.
31. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol. 2000;17:540–52.
32. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics . 2006;22:2688–90.
33. Ho L, Ane C. A linear-time algorithm for Gaussian and non-Gaussian trait evolution models. Syst Biol. 2014;63:397–408.
34. Ives AR, Garland T Jr. Phylogenetic logistic regression for binary dependent variables. Syst Biol. 2010;59:9–26.
35. Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005;41:207–34.
36. Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene vsm by use of a novel counterselectable suicide vector. Appl Environ Microbiol. 2007;73:777–84.
37. Val ME, Skovgaard O, Ducos-Galand M, Bland MJ, Mazel D. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. PLoS Genet. 2012;8:e1002472.
38. Demarre G, Guerout AM, Matsumoto-Mashimo C, Rowe-Magnus DA, Marliere P, Mazel D. A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPalpha) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. Res Microbiol. 2005;156:245–55.
39. Le Roux F, Davis BM, Waldor MK. Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. Nucleic Acids Res. 2011;39:1004–13.
40. Labreuche Y, Chenivesse S, Jeudy A, Le Panse S, Boulo V, Ansquer D, et al. Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. Nat Commun. 2017;8:1248.
41. Faury N, Saulnier D, Thompson FL, Gay M, Swings J, Le Roux F. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54:2137–40. (Pt 6)
42. Austin B. Taxonomy of bacterial fish pathogens. Vet Res. 2011;42:20.

43. Gavin HE, Satchell KJ. MARTX toxins as effector delivery platforms. Pathog Dis. 2015;73:ftv092.
44. Satchell KJ. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxins of Vibrios. Microbiol Spectr. 2015 Jun;3. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014.
45. Satchell KJ. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. Infect Immun. 2007;75:5079–84.
46. Antic I, Biancucci M, Zhu Y, Gius DR, Satchell KJ. Site-specific processing of Ras and Rap1 Switch I by a MARTX toxin effector domain. Nat Commun. 2015;6:7396.
47. Biancucci M, Rabideau AE, Lu Z, Loftis AR, Pentelute BL, Satchell KJF. Substrate recognition of MARTX Ras/Rap1-specific endopeptidase. Biochemistry . 2017;56:2747–57.
48. Cordero CL, Kudryashov DS, Reisler E, Satchell KJ. The actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin. J Biol Chem. 2006;281:32366–74.
49. Agarwal S, Zhu Y, Gius DR, Satchell KJ. The Makes Caterpillars Floppy (MCF)-like domain of *Vibrio vulnificus* induces mitochondrion-mediated apoptosis. Infect Immun. 2015;83:4392–403.
50. Ahrens S, Geissler B, Satchell KJ. Identification of a His-Asp-Cys catalytic triad essential for function of the Rho inactivation domain (RID) of *Vibrio cholerae* MARTX toxin. J Biol Chem. 2013;288:1397–408.
51. Goudenege D, Labreuche Y, Krin E, Ansquer D, Mangenot S, Calteau A, et al. Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. ISME J. 2013;7:1985–96.
52. Le Roux F, Labreuche Y, Davis BM, Iqbal N, Mangenot S, Goarant C, et al. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. Environ Microbiol. 2011;13:296–306.
53. Boucher Y. Sustained local diversity of *Vibrio cholerae* O1 biotypes in a previously cholera-free country. MBio. 2016 May 3;7. pii: e00570-16. https://doi.org/10.1128/mBio.00570-16.
54. Martinez-Urtaza J, van Aerle R, Abanto M, Haendiges J, Myers RA, Trinanes J, et al. Genomic variation and evolution of *Vibrio parahaemolyticus* ST36 over the course of a transcontinental epidemic expansion. MBio. 2017 Nov 14;8. pii: e01425-17. https://doi.org/10.1128/mBio.01425-17.
55. Raz N, Danin-Poleg Y, Hayman RB, Bar-On Y, Linetsky A, Shmoish M, et al. Genome-wide SNP-genotyping array to study the evolution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3. PLoS ONE 2014;9:e114576.
56. Shapiro BJ, Levade I, Kovacikova G, Taylor RK, Almagro-Moreno S. Origins of pandemic *Vibrio cholerae* from environmental gene pools. Nat Microbiol. 2016;2:16240.
57. Roux F, Austin B . The Vibrios. . Washington, DC: ASM Press; 2006. 285–296 Chapter 21
58. Labreuche Y, Le Roux F, Henry J, Zatylny C, Huvet A, Lambert C, et al. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. Fish Shellfish Immunol. 2010; 29:753–8.
59. Milton DL, Norqvist A, Wolf-Watz H. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. J Bacteriol. 1992;174:7235–44.
60. Luo L, Wall AA, Yeo JC, Condon ND, Norwood SJ, Schoenwaelder S, et al. Rab8a interacts directly with PI3Kgamma to modulate TLR4-driven PI3K and mTOR signalling. Nat Commun. 2014;5:4407.
61. Kwak JS, Jeong HG, Satchell KJ. Vibrio vulnificus rtxA1 gene recombination generates toxin variants with altered potency during intestinal infection. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108: 1645–50.
62. Roig FJ, Gonzalez-Candelas F, Amaro C. Domain organization and evolution of multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin in *Vibrio vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:657–68.
63. Dolores J, Satchell KJ. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates. MBio. 2013;4:e00624.
64. Lee CT, Amaro C, Wu KM, Valiente E, Chang YF, Tsai SF, et al. A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid. J Bacteriol. 2008;190:1638–48.
65. Cordero OX, Polz MF. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. Nat Rev Microbiol. 2014;12: 263–73.
66. Jousset A, Rochat L, Pechy-Tarr M, Keel C, Scheu S, Bonkowski M. Predators promote defence of rhizosphere bacterial populations by selective feeding on non-toxic cheaters. ISME J. 2009;3:666–74.
67. Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Brito B, Pasic L, Thingstad TF, Rohwer F, et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. Nat Rev Microbiol. 2009;7:828–36.
68. Seed KD, Yen M, Shapiro BJ, Hilaire IJ, Charles RC, Teng JE, et al. Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. Elife . 2014;3:e03497.
69. Wildschutte H, Preheim SP, Hernandez Y, Polz MF. O-antigen diversity and lateral transfer of the wbe region among *Vibrio splendidus* isolates. Environ Microbiol. 2010;12:2977–87.
70. Seed KD, Faruque SM, Mekalanos JJ, Calderwood SB, Qadri F, Camilli A. Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1. PLoS Pathog. 2012;8:e1002917.
71. Martin-Platero AM, Cleary B, Kauffman K, Preheim SP, McGillicuddy DJ, Alm EJ, et al. High resolution time series reveals cohesive but short-lived communities in coastal plankton. Nat Commun. 2018;9:266.
72. Gay M, Renault T, Pons AM, Le Roux F. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Dis Aquat Org. 2004;62:65–74.
73. Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microb Ecol. 2010;59:787–98.

Supplementary Table 1: Features of genomes sequenced in the present study

Population	Strain name	Number of contigs	Genome size (Mb)	Number of CDSs	Accession number
F12	10N.286.45.A3	126	5.48	5124	PIGF00000000
	10N.286.46.E10	134	5.39	5009	PIGE00000000
	10N.286.48.B8	60	5.23	4822	PIGD00000000
	10N.286.51.C3	50	5.19	4758	PIGC00000000
	ZF 223	32	5.15	4727	PIGB00000000
F18	1F_55	117	5.74	5349	PIGA00000000
	1S_113	62	5.33	4842	PIFZ00000000
	1S_129	84	5.36	4875	PIFY00000000
	1S_14	41	5.33	4833	PIFX00000000
	1S_146	73	5.40	4934	PIFW00000000
	1S_296	48	5.40	4905	PIFV00000000
	5S_122	94	5.51	4998	PIFU00000000
	5S_210	41	5.28	4982	PIFT00000000
	5S_226	67	5.34	5070	PIFS00000000
	5S_238	68	5.41	4861	PIFR00000000
	5S_245	60	5.31	4781	PIFQ00000000
	5S_272	105	5.35	4853	PIFP00000000
	5S_279	69	5.40	4914	PIFO00000000
	5S_283	57	5.33	5050	PIFN00000000
	5S_57	53	5.41	5106	PIFM00000000
	FF_139	196	5.84	5641	PIFL00000000
	FF_144	195	5.90	5616	PIFK00000000
	ZS_107	56	5.46	4920	PIFJ00000000
	ZS_117	101	5.35	4847	PIFI00000000
	ZS_138	90	5.34	4865	PIFH00000000
	ZS_173	58	5.49	4906	PIFG00000000
	ZS_181	69	5.28	4968	PIFF00000000
	ZS_183	64	5.35	4841	PIFE00000000
	ZS_185	102	5.45	4960	PIFD00000000

ZS_198	82	5.39	4873	PIFC00000000
ZS_2	80	5.47	4966	PIFB00000000
ZS_211	270	5.56	5282	PIFA00000000
ZS_213	96	5.47	4953	PIEZ00000000
ZS_58	78	5.37	4869	PIEY00000000
ZS_82	53	5.38	5089	PIEX00000000
ZS_90	46	5.38	5085	PIEW00000000
ZF_41	87	5.74	5310	PIEV00000000

Supplementary Table 2: Strains used in the present study

Name	Description	Reference
PIR2	(F-) Δlac169 rpoS(am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMlu I)::pir	Invitrogen, USA
β3914	β2163 *gyrA462, zei298::Tn10* [Km^R Em^R Tc^R]	Le Roux *et al.*, 2007
BL21 (DE3)	F^- *ompT* $hsdS_B(r_B^-\ m_B^-)$ *gal dcm* (DE3)	Novagen, USA
GV1300	BL21 (DE3) + pFO4_GFP_R5-7_{crass}	This study
GV1549	BL21 (DE3) + pFO4_GFP_R5-7_{F12}	This study
TOP10	F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(*Str^R*) endA1 nupG*	Invitrogen, USA
GV1460	J2-8 (*Vibrio* sp. nov F13-like)	Lemire *et al.*, 2015
GV1422	J2-9 (*V. crassostreae*)	Lemire *et al.* 2015
GV1495	J2-9 *ΔR5.7*	Lemire *et al.*, 2015
GV1040	10N.286.48.B8 (hereafter named B8)	Hunt *et al.*, 2008
GV1826	B8 *ΔR-a*	This study
GV1872	B8 *ΔR-b*	This study
GV1906	B8 *ΔR-c*	This study
GV1874	B8 *ΔR-d*	This study
GV1895	B8 *ΔR-e*	This study
GV1897	B8 *ΔR-f*	This study
GV1899	B8 *ΔR-g*	This study
GV1830	B8 *ΔR-h*	This study
GV1601	B8 *ΔR-i*	This study
GV1870	B8 *ΔR-j*	This study
GV1876	B8 *ΔR-k*	This study
GV1908	B8 *ΔR-l*	This study
GV1832	B8 *ΔR-m*	This study
GV1828	B8 *ΔR-n*	This study
GV1903	B8 *ΔR-o*	This study

GV1891	B8 *ΔR-p*	This study
GV1887	B8 *ΔR-q*	This study
GV1889	B8 *ΔR-r*	This study
GV1884	B8 *ΔR-s*	This study
GV1885	B8 *ΔR-t*	This study
GV1858	B8 *ΔR-u*	This study
GV1850	B8 *ΔR-v*	This study
GV1901	B8 *ΔR-w*	This study
GV1905	B8 *ΔR-x*	This study
GV1832	B8 *ΔR-m*	This study
GV1828	B8 *ΔR-n*	This study
GV1903	B8 *ΔR-o*	This study
GV1568	B8 *ΔR5.7*	This study
GV2825	B8 *ΔR5.8*	This study
GV2620	B8 *ΔR-g* + pMRB-P_{LAC}*R-5.7*$_{F12}$	This study
GV2621	B8 *ΔR5-7* + pMRB-P_{LAC}*R-5.7*$_{F12}$	This study
GV2288	8T2_11 (*V. chagasii, #3*)	Bruto et al., 2016
GV2455	8T2_11 *ΔR5.7*	This study
GV2423	7T7_2 (*V. splendidus*, #24)	Bruto et al., 2016
GV2493	7T7_2 *ΔR5.7*	This study
GV1054	ZS_173 (*V. splendidus*, F18)	Hunt *et al.*, 2008
GV2266	ZS_173 *ΔMARTX*	This study
GV1065	ZS_185 (*V. splendidus*, F18)	This study
GV1882	ZS_185 *ΔMARTX*	This study
GV2466	ZS_185 *ΔR5-7*	This study
GV1067	ZS_213 (*V. splendidus*, F18)	Hunt *et al.*, 2008
GV2267	ZS_213 *ΔMARTX*	This study

Supplementary Table S3 : Plasmids used and constructed in this study

Name	Description	Reference
pSW23T	*oriV*$_{R6K\square}$; *oriT*$_{RP4}$; $\square$Cm$^{R}\square$	Demarre *et al.*, 2005
pSWδR5.7	pSW23T; *Δ R*5.7$_{8T2_11\ \&\ ZS_185}$	This study
pSW7848T	*oriV*$_{R6K\square}$; *oriT*$_{RP4}$; *araC*-P$_{BAD}$*ccdB;* $\square$Cm$^{R}\square$	Le Roux *et al.*, 2007
pSWδR-a	pSW7848T; *Δ R-a*	This study
pSWδR-b	pSW7848T; *Δ R-b*	This study
pSWδR-c	pSW7848T; *Δ R-c*	This study
pSWδR-d	pSW7848T; *Δ R-d*	This study
pSWδR-e	pSW7848T; *Δ R-e*	This study
pSWδR-f	pSW7848T; *Δ R-f*	This study
pSWδR-g	pSW7848T; *Δ R-g*	This study
pSWδR-h	pSW7848T; *Δ R-h*	This study
pSWδR-i	pSW7848T; *Δ R-i*	This study
pSWδR-j	pSW7848T; *Δ R-j*	This study
pSWδR-k	pSW7848T; *Δ R-k*	This study
pSWδR-l	pSW7848T; *Δ R-l*	This study
pSWδR-m	pSW7848T; *Δ R-m*	This study
pSWδR-n	pSW7848T; *Δ R-n*	This study
pSWδR-o	pSW7848T; *Δ R-o*	This study
pSWδR-p	pSW7848T; *Δ R-p*	This study
pSWδR-q	pSW7848T; *Δ R-q*	This study
pSWδR-r	pSW7848T; *Δ R-r*	This study
pSWδR-s	pSW7848T; *Δ R-s*	This study
pSWδR-t	pSW7848T; *Δ R-t*	This study
pSWδR-u	pSW7848T; *Δ R-u*	This study
pSWδR-v	pSW7848T; *Δ R-v*	This study
pSWδR-w	pSW7848T; *Δ R-w*	This study
pSWδR-x	pSW7848T; *Δ R-x*	This study
pSWδR5.7$_{F12}$	pSW7848T; *Δ R*5.7$_{F12}$	This study
pSWδ$\square$5.8$_{F12}$	pSW7848T; *Δ R*5.8$_{F12}$	This study

pSWδMARTX	pSW7848T; *Δ* MARTX	This study
pMRB-P_{LAC}*R-5.7* $_{F12}$	*oriV*$_{R6K\gamma}$; *oriT*$_{RP4}$; *oriV*$_{pB1067}$; P_{lac}*R-5.7* $_{F12}$ [Cm^R]	This study
pMRB-P_{LAC}*GFP*	*oriV*$_{R6K\gamma}$; *oriT*$_{RP4}$; *oriV*$_{pB1067}$; P_{lac}*GFP* [Cm^R]	Bruto *et al.*, 2016
pFO4	Amp^R, T7lac promoter, His.Tag	Groisillier *et al.*, 2010
pFO4-R5.7$_{F12}$	pFO4-HisTag-GFP-R5.7$_{F12}$	This study
pFO4-R5.7$_{crass}$	pFO4-HisTag-GFP-R5.7$_{crass}$	This study

Supplementary Table 4: Primers used in this study

Use	Name	Sequence 5'-3' [a]
Deletion of R-a	R-a-1	GCCC**GAATTC**GACATATCCCGGTGGTTCAC
	R-a-2	CCAATAAAGAGAGGAGCCTGGGAAGTTAGTGGGCTTTGTG
	R-a-3	CACAAAGCCCACTAACTTCCCAGGCTCCTCTCTTTATTGG
	R-a-4	GCC**CGAATTC**CAACACACCACCAACCTACG
Deletion of R-b	R-b-1	GCCC**GAATTC**CATCGCCCCAGATTTACTGG
	R-b-2	CACTCGTTATGCTGGTGAGTGGAGTCGTTTGTGTAAAGGG
	R-b-3	CCCTTTACACAAACGACTCCACTCACCAGCATAACGAGTG
	R-b-4	GCCC**GAATTC**GTGTGGTTACGCCTTCATCG
Deletion of R-c	R-c-1	GCCC**GAATTC**CTTGCCGCTCTCGTAGATTG
	R-c-2	CGATACTTCTGGCTGCCATAGTGAGGCATTGAGCTTTGTG
	R-c-3	CACAAAGCTCAATGCCTCACTATGGCAGCCAGAAGTATCG
	R-c-4	GCCC**GAATTC**CGTCGCGATAAAAGTAACGC
Deletion of R-d	R-d-1	GCCC**GAATTC**CCGATTCATCAGAGTTCCAG
	R-d-2	CAGGGTTACTGGAATTGTCCGCAAAGGTGAGGGTTTCAGG
	R-d-3	CCTGAAACCCTCACCTTTGCGGACAATTCCAGTAACCCTG
	R-d-4	GCCC**GAATTC**GGTAACGTAAACGTGATGCG
Deletion of R-e	R-e-1	GCCC**GAATTC**GGGTACTGTGTCACTGTCTC
	R-e-2	CAACTAGTGCAATGAGAGCCAAGCCAGTCAATAGACTGGC
	R-e-3	GCCAGTCTATTGACTGGCTTGGCTCTCATTGCACTAGTTG
	R-e-4	GCCC**GAATTC**CTTGGCATCGCTTCAACACC
Deletion of R-f	R-f-1	GCCC**GAATTC**CCTGCATTGCTGAGTCGAAG

	R-f-2	GAGCCTGAAGCGTATCAGATCCATGCTATGTCG GCCTTTG
	R-f-3	CAAAGGCCGACATAGCATGGATCTGATACGCT TCAGGCTC
	R-f-4	GCCC**GAATTC**CAAGTTACTCTCCCACGGAG
Deletion of R-g	R-g-1	GCCC**GAATTC**CTACGCAGCCAACATGCAAC
	R-g-2	GGCAAAGGCATTTTCACCGTGCCATAAAAAGG CCGACATC
	R-g-3	GATGTCGGCCTTTTTATGGCACGGTGAAAATGC CTTTGCC
	R-g-4	GCCC**GAATTC**TTCGATCTCGATTGGACTGC
Deletion of R-h	R-h-1	GCCC**GAATTC**GTGATCCAGCCTTTGTTCAG
	R-h-2	GATATTCGCGAAGCAGCACCCCTGTTGAGTTGA CAGGAGG
	R-h-3	CCTCCTGTCAACTCAACAGGGGTGCTGCTTCGC GAATATC
	R-h-4	GCCC**GAATTC**CTTTGGAGCTGCGTTCAAAC
Deletion of R-i	R-i-1	GCCC**GAATTC**GGTAGTGGCTGATGAAGTTC
	R-i-2	GCTGCCGTGGTGATATGTATAAAATGTCCCGCA TTAGGCG
	R-i-3	CGCCTAATGCGGGACATTTTATACATATCACCA CGGCAGC
	R-i-4	GCCC**GAATTC**TGGCGCTGTATGACCAAAAC
Deletion of R-j	R-j-1	GCCC**GAATTC**GCAGAAGTATGGTAAGTCCC
	R-j-2	GAAGTACCCAGGGTCGTTTGAATGCCAATACC AAGCGCAG
	R-j-3	CTGCGCTTGGTATTGGCATTCAAACGACCCTGG GTACTTC
	R-j-4	GCCC**GAATTC**CATGCTTTAGGTGCACACGC
Deletion of R-k	R-k-1	GCCC**GAATTC**AGACACAGACATCGGCTATG
	R-k-2	GCATTGAAGTAGGGGACATCGTGAGCAAATAG CGTACCTG
	R-k-3	CAGGTACGCTATTTGCTCACGATGTCCCCTACT

		TCAATGC
	R-k-4	GCCC**GAATTC**CGTATTGGTGATGTAGCCTC
Deletion of R-l	R-l-1	GCCC**GAATTC**CCAGATAACGTAGCAGCAGG
	R-l-2	GTGCCTACAGTCCGAGTAATAAACAGCCAGCA TAAGGCTG
	R-l-3	CAGCCTTATGCTGGCTGTTTATTACTCGGACTG TAGGCAC
	R-l-4	GCCC**GAATTC**CTGCGCTGTCGTTAGCAAAG
Deletion of R-m	R-m-1	GCCC**GAATTC**ACCAACCAACGAAAGTGGTG
	R-m-2	CAAGATGTTACCTCTGCGCTGTGTTGCAGCTTT CATTGGC
	R-m-3	GCCAATGAAAGCTGCAACACAGCGCAGAGGTA ACATCTTG
	R-m-4	GCCC**GAATTC**CACTTCCATAACCTCTGTGC
Deletion of R-n	R-n-1	GCCC**GAATTC**CCAAGACACAATCCATCACC
	R-n-2	CAGTGGTGAAGTTCAGAAGCTATTAGGTGACC TCCCAACG
	R-n-3	CGTTGGGAGGTCACCTAATAGCTTCTGAACTTC ACCACTG
	R-n-4	GCCC**GAATTC**CGACATCGAGAAACTTGGTC
Deletion of R-o	R-o-1	GCCC**GAATTC**GTTGCGTTTGCGGTATCAAG
	R-o-2	CCCGAAGGCTACACTTATTCGACTCTGTGAGCA TGTTTGG
	R-o-3	CCAAACATGCTCACAGAGTCGAATAAGTGTAG CCTTCGGG
	R-o-4	GCCC**GAATTC**ATAGTCTATCGTGCTGCAGG
Deletion of R-p	R-p-1	GCCC**GAATTC**CCTAATTCAGGATCGCCATC
	R-p-2	CATACGCTCAGCAGTATTCGCAAGCACGATGA CAGTTGAC
	R-p-3	GTCAACTGTCATCGTGCTTGCGAATACTGCTGA GCGTATG
	R-p-4	GCCC**GAATTC**GGTCAGATCAAAGACCGATG
Deletion of R-q	R-q-1	GCCC**GAATTC**GAGACTTCGTGTGTCTCTGC

	R-q-2	GTGGGCTTTTTAACGTCTGCCTGGTACATTAGC CAGCTTC
	R-q-3	GAAGCTGGCTAATGTACCAGGCAGACGTTAAA AAGCCCAC
	R-q-4	GCCC**GAATTC**GCAATGGAAGAGCAAGACAG
Deletion of R-r	R-r-1	GCCC**GAATTC**TTCCTGAACAGTAAGCGGAC
	R-r-2	GAACATCGATTCTCAGCCTCAATTGGGGAGAG CATTAGGC
	R-r-3	GCCTAATGCTCTCCCCAATTGAGGCTGAGAATC GATGTTC
	R-r-4	GCCC**GAATTC**GGTAGGATGGATGAGGAAAC
Deletion of R-s	R-s-1	GCCC**GAATTC**GCATCGAACAATGGGATTGG
	R-s-2	CGGTATTACCCAACGGAAACGACATAGAGTAA GACCTCGC
	R-s-3	GCGAGGTCTTACTCTATGTCGTTTCCGTTGGGT AATACCG
	R-s-4	GCCC**GAATTC**CTACTTCTCGGCCATCAAAC
Deletion of R-t	R-t-1	GCCC**GAATTC**CTAAACAGTACTCAGCGCTC
	R-t-2	CTCGTATCTAGCTACCCTTCGTAAGCAAGCCAA GCATCAG
	R-t-3	CTGATGCTTGGCTTGCTTACGAAGGGTAGCTAG ATACGAG
	R-t-4	GCCC**GAATTC**GTTCCTACGTGAACTACCAG
Deletion of R-u	R-u-1	GCCC**GAATTC**AAGGCTATCGTGCCGCATTC
	R-u-2	CCAATACTGCCACAAAGTGCATTTGTGCGGAC AACCTACG
	R-u-3	CGTAGGTTGTCCGCACAAATGCACTTTGTGGCA GTATTGG
	R-u-4	GCCC**GAATTC**CCTGAGGTTGACCACGTTCG
Deletion of R-v	R-v-1	GCCC**GAATTC**TGAACAAGCGTGTGATCACC
	R-v-2	GGTAAGGGGTCGACTTTACCGCTCACGCTAAA GTAACCAC
	R-v-3	GTGGTTACTTTAGCGTGAGCGGTAAAGTCGACC

		CCTTACC
	R-v-4	GCCC**GAATTC**GCACACTATCGACATGACAG
Deletion of R-w	R-w-1	GCCC**GAATTC**CACAATGGACAAGTCCCATC
	R-w-2	GACACTTGTCAGCCAAACACCTTCCATGCCCAA ACTGGAG
	R-w-3	CTCCAGTTTGGGCATGGAAGGTGTTTGGCTGAC AAGTGTC
	R-w-4	GCCC**GAATTC**GCACCGCTAAGTCATCAACC
Deletion of R-x	R-x-1	GCCC**GAATTC**CAAGTAATGCGGGACTGGAC
	R-x-2	CAACCCCAGTTCTCAACAGGGATGTTGCAACG TTACCGAC
	R-x-3	GTCGGTAACGTTGCAACATCCCTGTTGAGAACT GGGGTTG
	R-x-4	GCCC**GAATTC**ATGTTCAAGTGCCTCACCTC
Deletion of R5.7	R5.7-1	GTATCGATAAGCTTGATATC**GAATTC**CTCTTAC CATCGCTCTTCAG
	R5.7-2	CCAAAAAGGCCGACAAGATGGGGTAGCAGAA ACCAACACC
	R5.7-3	GGTGTTGGTTTCTGCTACCCCATCTTGTCGGCC TTTTTGG
	R5.7-4	CCCCCGGGCTGCAG**GAATTC**CTACGCAGCCAA CATGCAAC
Deletion of R5.8	R5.8-1	GTATCGATAAGCTTGATATC**GAATTC**TCTCCTG CAATCACAGTCAC
	R5.8-2	CTAATCACAAATCTAACAGGGATAAAACTCCA TACCCATCGACAAATAG
	R5.8-3	CTATTTGTCGATGGGTATGGAGTTTTATCCCTG TTAGATTTGTGATTAG
	R5.8-4	CCCCCGGGCTGCAG**GAATTC**ACCTCTTAGTTAT TTGGCACAG
Inactivation of R5.7	0504-1	CGTATGCCTGAACATAGTTAG
	0504-2	GGGATCTGATGATCACCGAG

Deletion of *rtxACHBDE*	MX1	GCCC**GAATTC**AGATACATCGGACCATGCTG
	MX2	GGATACTCAGGTACAGCCTAAGGAAGTGACGTGATGGTAC
	MX3	GTACCATCACGTCACTTCCTTAGGCTGTACCTGAGTATCC
	MX4	GCCC**GAATTC**GCTCGAATTGATAGGTTGCG
R5.7$_{F12}$ in MRB	1102-1	GTGAGCGGATAACAAAGGAA**GGGCCC**ATGAGAATTCTACCGATTATTATTTCTC
	1102-2	CGACGCGTCTGCAG**CTCGAG**TCAGTTAGAACAACTGTTGCCATTC
	0207-1	**CTCGAG**CTGCAGACGCGTCG
	0207-2	**GGGCCC**TTCCTTTGTTATCCGCTCAC
R5.7$_{F12}$ in pFO4	1102-3	GGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTAGTGACTGGCTAGAGCTTAATAAC
	1102-4	CATGCATGCTAGCCTCGAGTTAGTTAGAACAACTGTTGCCATTC
	0904-1	CATCACCATCACCATGGATCCAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC
	0904-2	AGAACCACCACCAGAACCACCACCTTTGTATAGTTCATCCATGC
	2003-1	GGA TCC ATG GTG ATG GTG ATG
	2003-2	CTC GAG GCT AGC ATG CAT G
R5.7$_{cras}$ in pFO4	0904-5	GGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTAGCGACTGGCTTGAACTG
	0904-6	CATGCATGCTAGCCTCGAGTTAATTAGAGCAGCTATTGCC

[a] restriction sites are indicated in bold

Supplementary table 5: Annotation of *Vibrio* sp. F12 specific regions.

Region	Locus tag[a]	Product
R-a	160071	AraC-type DNA-binding domain-containing protein
	160070	Putative MOSC domain protein
R-b	180051	Iron-hydroxamate transporter permease subunit
	180052	Ferrichrome-binding protein
	180053	Ferrichrome outer membrane transporter
	180055	Transcriptional activator
	180056	Conserved protein of unknown function with ferric iron reductase domains
	180057	Iron-hydroxamate transporter subunit ; ATP-binding component of ABC superfamily
R-c	10026	Putative Transcription regulator, AsnC-type protein
	10027	Conserved membrane protein of unknown function
R-d	10384	Putative Transcription regulator, TetR-like
	10385	Putative dihydrofolate reductase
	10386	Proton/sodium-glutamate symport protein
R-e	40063	NADH:flavorubredoxin oxidoreductase
	40065	Flavorubredoxin oxidoreductase
R-f	40179	Transcriptional regulator, LysR family protein
	40180	Conserved exported protein of unknown function
R-g	40197	Conserved exported protein of unknown function (R5.7)
	40198	Conserved exported protein of unknown function (R5.8)
R-h	40249	Conserved membrane protein of unknown function
	40250	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator
	40251	Putative glutathione S-transferase
	40252	Putative transcriptional regulator, LysR family protein
	40253	Putative methyl-accepting chemotaxis protein
	40254	Cryptochrome-like protein cry2
	40255	Sigma-54 dependent transcriptional regulator
	40256	Aldehyde dehydrogenase B
	40257	Putative NUDIX hydrolase
	40258	Conserved protein of unknown function

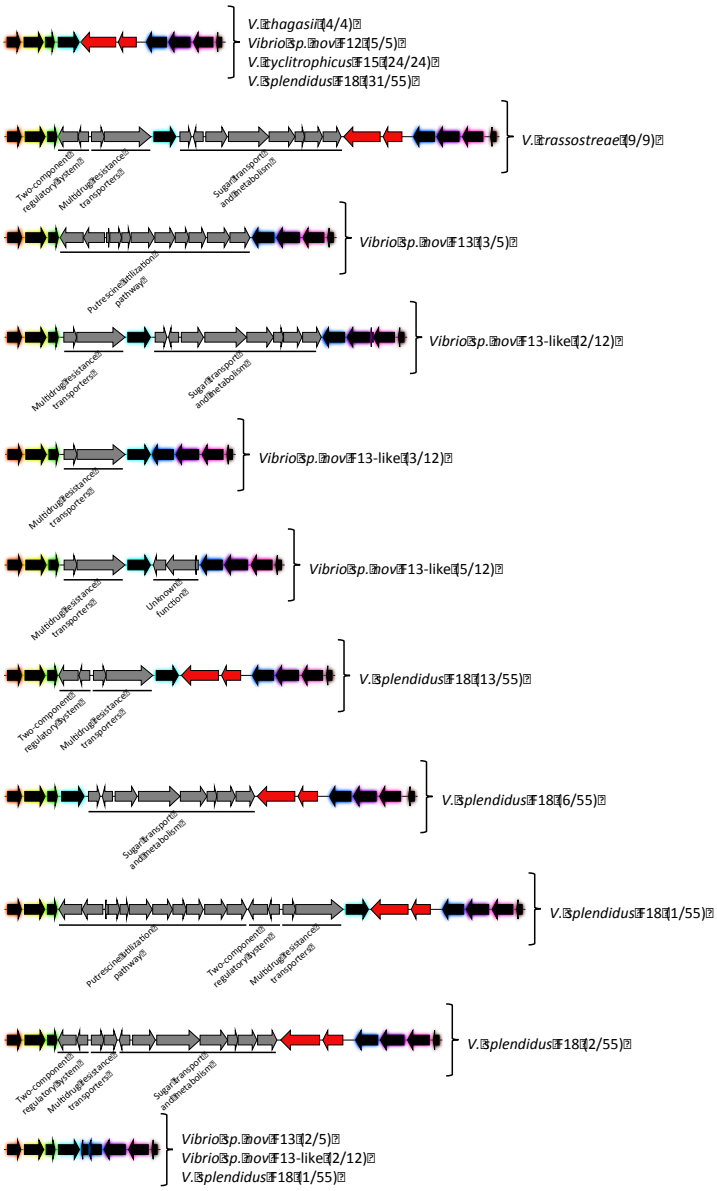
	40259	Putative multidrug efflux transporter
	40260	S-formylglutathione hydrolase
	40261	Alcohol dehydrogenase class 3 (Alcohol dehydrogenase class III)
	40262	Quaternary ammonium compound-resistance protein QacE
	200002	Murein peptide amidase A
	200003	Periplasmic oligopeptide-binding protein
	200004	Putative Ethylbenzene dehydrogenase
	200006	Putative cytochrome c-type protein NrfB
	200007	Putative tetraheme cytochrome c3
R-i	200027	Putative Organic hydroperoxide resistance protein
	200028	Putative Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator
R-j	200054	Putative two component histidine kinase
	200055	Two-component response regulator of C4-dicarboxylate transport
	200056	Putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
	200057	Putative Phosphonate-binding periplasmic transporter
	200058	Putative Phosphonates import ATP-binding protein PhnC
	200059	Putative PhnE phosphonate ABC transporter, permease
	200060	Putative Phosphonate ABC transporter permease protein phnE1
R-k	310012	Conserved protein of unknown function
	310011	Conserved exported protein of unknown function
R-l	130064	Putative 5'-nucleotidase
	130062	Multiple antibiotic resistance protein marC
R-m	100119	Putative membrane bound peptidase; NefD homolog
	100118	Putative Stomatin like transmembrane protein
R-n	100095	Conserved exported protein of unknown function
	100094	Conserved protein of unknown function
R-o	30035	Putative Signal transduction protein containing an EAL and a GGDEF domains
	30034	Putative ABC-type sugar transport system, periplasmic component
	30033	Putative Ribose ABC transporter, periplasmic ribose-binding protein
R-p	170092	Conserved exported protein of unknown function
	170091	Conserved exported protein of unknown function

	170090	Conserved protein of unknown function
	170089	Conserved exported protein of unknown function
	170088	Conserved exported protein of unknown function
	170087	Putative Transcriptional regulator, LuxR family
	170081	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family protein
R-q	80118	GGDEF family protein
	80117	Putative Outer membrane protein and related peptidoglycan-associated (lipo)proteins
	80116	Conserved protein of unknown function
	80115	Conserved protein of unknown function
	80114	TadE-like protein
	80113	Conserved exported protein of unknown function
	80112	Conserved membrane protein of unknown function
	80111	Putative Flp pilus assembly protein TadB
	80109	Putative Flp pilus assembly ATPase TadZ/CpaE
	80108	Conserved exported protein of unknown function
	80106	Putative Flp pilus assembly protein RcpC/CpaB
	80105	Conserved membrane protein of unknown function
	80104	Putative pilin Flp
	80103	Bacterial regulatory helix-turn-helix , lysR family protein
R-r	80026	Conserved exported protein of unknown function
	80025	Conserved exported protein of unknown function
	80024	Conserved protein of unknown function
	80023	Conserved exported protein of unknown function
R-s	80012	Fe2+/Zn2+ uptake regulation protein
	80011	Adenine deaminase family protein
	80010	Putative carbonate dehydratase
	80009	Putative Cobalamin (vitamin B12) biosynthesis CobW-like
R-t	250021	Transcriptional regulator
	250022	Conserved membrane protein of unknown function
R-u	60205	Conserved exported protein of unknown function
	60204	Conserved protein of unknown function
R-v	60093	Putative Cytochrome c556

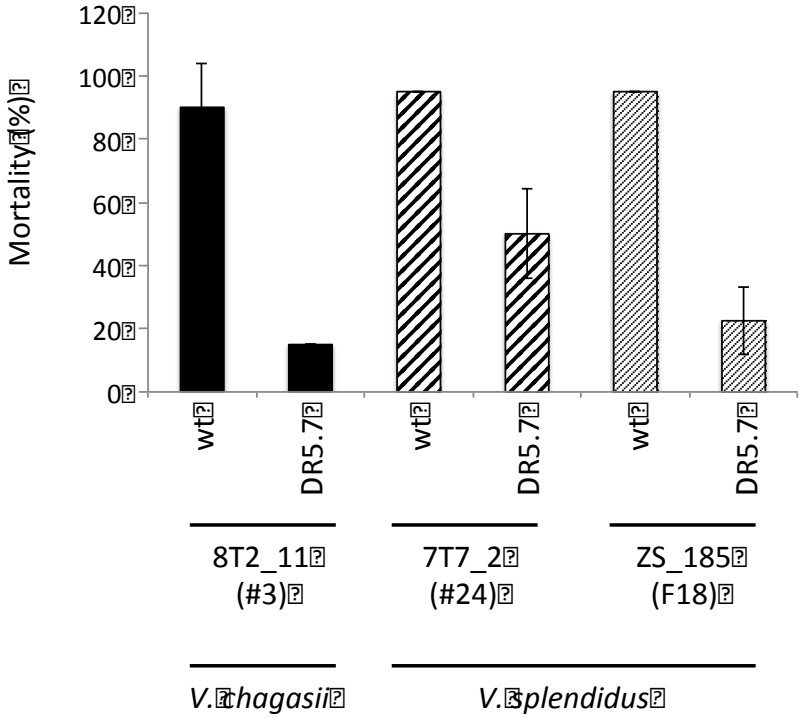
	60092	Hydrogenase cytochrome B-type subunit-like protein
	60091	Transcriptional regulator, MarR family protein
R-w	60041	Transcriptional regulator
	60040	Conserved exported protein of unknown function
R-x	350020	Predicted Na+/dicarboxylate symporter
	440001	Coenzyme A disulfide reductase
	440002	Conserved exported protein of unknown function

[a]Locus tag in B8 (VB12B8_v1_XXXXXX)

Supplementary Figure 1: Comparison of the genetic organization of the R5-7/8 locus in the Splendidus clade. The first genetic organization (top of the figure) is mostly found in the populations of the Splendidus clade and was used as a reference for Figure 3. The R5.7 and R5.8 genes are represented with red arrows. The surrounding genes of R5-7/8 are represented by black arrows shrouded by colors to keep track in the different genetic organization shown in this figure. Genes in grey are intermittently present in the R5-7 locus and encode for different metabolic activities that are indicated when known. The distribution among different species the Splendidus clade of the different genetic organization of the R5-7/8 locus is shown on the right.



Supplementary Figure 2: Virulence of R5.7 inactivated strains belonging to the Splendidus clade. Comparison of mortalities induced by wild type strain (wt) and R5.7 inactivated mutant of a strain representative of *V. chagasii* (8T2_11) and *V. splendidus* (7T7_2) isolated in France (population #3 and 24 in Bruto et al., 2016) and *V. splendidus* isolated in Plum Island (population F18 in Hunt et al., 2008). All infections were performed in duplicate and at least twice by intramuscular injection of strains (10^7 cfu/animal) in 20 oysters and counting the percentage of mortalities at 24H (y-axis).



Références bibliographiques

-A-

Ackermann, Hans-W. 2009. “Phage Classification and Characterization.” In *Bacteriophages*, edited by Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski, 501:127–40. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13.

Avrani, Sarit, Daniel A Schwartz, and Debbie Lindell. 2012. “Virus-Host Swinging Party in the Oceans: Incorporating Biological Complexity into Paradigms of Antagonistic Coexistence.” *Mobile Genetic Elements* 2 (2): 88–95. https://doi.org/10.4161/mge.20031.

Azam, Aa Haeruman, and Yasunori Tanji. 2019. “Bacteriophage-Host Arm Race: An Update on the Mechanism of Phage Resistance in Bacteria and Revenge of the Phage with the Perspective for Phage Therapy.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (5): 2121–31. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09629-x.

-B-

Bachère, Evelyne, Yannick Gueguen, Marcelo Gonzalez, Julien De Lorgeril, Julien Garnier, and Bernard Romestand. 2004. “Insights into the Anti-Microbial Defense of Marine Invertebrates: The Penaeid Shrimps and the Oyster Crassostrea Gigas.” *Immunological Reviews* 198 (1): 149–68. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x.

Bachère, Evelyne, Rafael Diego Rosa, Paulina Schmitt, Aurore C. Poirier, Nicolas Merou, Guillaume M. Charrière, and Delphine Destoumieux-Garzón. 2015. “The New Insights into the Oyster Antimicrobial Defense: Cellular, Molecular and Genetic View.” *SI: Molluscan Immunity* 46 (1): 50–64. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040.

Bai, Changming, Chongming Wang, Junyang Xia, Hailin Sun, Shuai Zhang, and Jie Huang. 2015. “Emerging and Endemic Types of Ostreid Herpesvirus 1 Were Detected in Bivalves in China.” *Journal of Invertebrate Pathology* 124 (January): 98–106. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.007.

Bailly-Bechet, Marc, Massimo Vergassola, and Eduardo Rocha. 2007. “Causes for the Intriguing Presence of TRNAs in Phages.” *Genome Research* 17 (10): 1486–95.

https://doi.org/10.1101/gr.6649807.

Baker-Austin, Craig, James D. Oliver, Munirul Alam, Afsar Ali, Matthew K. Waldor, Firdausi Qadri, and Jaime Martinez-Urtaza. 2018. “Vibrio Spp. Infections.” *Nature Reviews Disease Primers* 4 (1). https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8.

Bankevich, Anton, Sergey Nurk, Dmitry Antipov, Alexey A. Gurevich, Mikhail Dvorkin, Alexander S. Kulikov, Valery M. Lesin, et al. 2012. “SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing.” *Journal of Computational Biology* 19 (5): 455–77. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.

Barlow, Miriam. 2009. “What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer.” In *Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux*, edited by Maria Boekels Gogarten, Johann Peter Gogarten, and Lorraine C. Olendzenski, 397–411. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_23.

Beaz-Hidalgo, Roxana, Ana L Diéguez, Ilse Cleenwerck, Sabela Balboa, Alejandra Doce, Paul De Vos, and Jesús L Romalde. 2010. “Vibrio Celticus Sp. Nov., a New Vibrio Species Belonging to the Splendidus Clade with Pathogenic Potential for Clams.” *Systematic and Applied Microbiology* 33 (6): 311–15.

Bédier, E. 2009. “Observatoire National Conchylicole.”

Bergh, Øivind, Knut Yngve BØrsheim, Gunnar Bratbak, and Mikal Heldal. 1989. “High Abundance of Viruses Found in Aquatic Environments.” *Nature* 340 (6233): 467–68. https://doi.org/10.1038/340467a0.

Binesse, Johan, Claude Delsert, Denis Saulnier, Marie-Christine Champomier-Verges, Monique Zagorec, Hélène Munier-Lehmann, Didier Mazel, and Frédérique Le Roux. 2008. “Metalloprotease vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of Vibrio Splendidus.” *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (23): 7108–17.

Biskri, Latefa, Marie Bouvier, Anne-Marie Guérout, Stéphanie Boisnard, and Didier Mazel. 2005. “Comparative Study of Class 1 Integron and Vibrio Cholerae Superintegron Integrase

Activities." *Journal of Bacteriology* 187 (5): 1740–50. https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1740-1750.2005.

Bradley, D E. 1967. "Ultrastructure of Bacteriophage and Bacteriocins." *Bacteriological Reviews* 31 (4): 230–314.

Bruto, Maxime, Adèle James, Bruno Petton, Yannick Labreuche, Sabine Chenivesse, Marianne Alunno-Bruscia, Martin F Polz, and Frédérique Le Roux. 2017. "Vibrio Crassostreae, a Benign Oyster Colonizer Turned into a Pathogen after Plasmid Acquisition." *The Isme Journal* 11: 1043.

Bruto, Maxime, Yannick Labreuche, Adèle James, Damien Piel, Sabine Chenivesse, Bruno Petton, Martin F. Polz, and Frédérique Le Roux. 2018. "Ancestral Gene Acquisition as the Key to Virulence Potential in Environmental Vibrio Populations." *The ISME Journal*. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3.

Buckling A., and Rainey P. B.. 2002. "Antagonistic Coevolution between a Bacterium and a Bacteriophage." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269 (1494): 931–36. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1945.

Burrus, Vincent. 2017. "Mechanisms of Stabilization of Integrative and Conjugative Elements." *Current Opinion in Microbiology* 38 (August): 44–50. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.014.

-C-

Cabezón, Elena, Jorge Ripoll-Rozada, Alejandro Peña, Fernando de la Cruz, and Ignacio Arechaga. 2015. "Towards an Integrated Model of Bacterial Conjugation." *FEMS Microbiology Reviews*, September, n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12085.

Carpena, Nuria, Keith A Manning, Terje Dokland, Alberto Marina, and José R Penadés. 2016. "Convergent Evolution of Pathogenicity Islands in Helper Cos Phage Interference." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 371 (1707): 20150505. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0505.

Casjens, Sherwood R, and Roger W Hendrix. 2015. “Bacteriophage Lambda: Early Pioneer and Still Relevant.” *Virology* 479–480 (May): 310–30. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.010.

Castillo, Daniel, Nanna Rørbo, Jóhanna Jørgensen, Janina Lange, Demeng Tan, Panos G Kalatzis, Sine Lo Svenningsen, and Mathias Middelboe. 2019. “Phage Defense Mechanisms and Their Genomic and Phenotypic Implications in the Fish Pathogen Vibrio Anguillarum.” *FEMS Microbiology Ecology* 95 (fiz004). https://doi.org/10.1093/femsec/fiz004.

Cianfanelli, Francesca R., Laura Monlezun, and Sarah J. Coulthurst. 2016. “Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon.” *Trends in Microbiology* 24 (1): 51–62. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005.

Clerissi, Camille, Julien de Lorgeril, Bruno Petton, Aude Lucasson, Jean-Michel Escoubas, Yannick Gueguen, Guillaume Mitta, and Eve Toulza. 2018. “Diversity and Stability of Microbiota Are Key Factors Associated to Healthy and Diseased Crassostrea Gigas</Em> Oysters.” *BioRxiv*, January, 378125. https://doi.org/10.1101/378125.

Cochennec, Nathalie, Frédérique Le Roux, Franck Berthe, and André Gerard. 2000. “Detection of Bonamia Ostreae Based on Small Subunit Ribosomal Probe.” *Journal of Invertebrate Pathology* 76 (1): 26–32. https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939.

Cordero, Otto X., and Martin F. Polz. 2014. “Explaining Microbial Genomic Diversity in Light of Evolutionary Ecology.” *Nature Reviews Microbiology* 12 (March): 263.

Cordero, Otto X., Laure-Anne Ventouras, Edward F. DeLong, and Martin F. Polz. 2012. “Public Good Dynamics Drive Evolution of Iron Acquisition Strategies in Natural Bacterioplankton Populations.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (49): 20059. https://doi.org/10.1073/pnas.1213344109.

Cordero, Otto X., Hans Wildschutte, Benjamin Kirkup, Sarah Proehl, Lynn Ngo, Fatima Hussain, Frederique Le Roux, Tracy Mincer, and Martin F. Polz. 2012. “Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance.” *Science* 337 (6099): 1228. https://doi.org/10.1126/science.1219385.

-D-

Davies, Emily V, Chloe E James, Irena Kukavica-Ibrulj, Roger C Levesque, Michael A Brockhurst, and Craig Winstanley. 2016. "Temperate Phages Enhance Pathogen Fitness in Chronic Lung Infection." *The ISME Journal* 10 (10): 2553–55. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.51.

De Sordi, Luisa, Varun Khanna, and Laurent Debarbieux. 2017. "The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses." *Cell Host & Microbe* 22 (6): 801-808.e3. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.010.

Decaestecker, Ellen, Sabrina Gaba, Joost A. M. Raeymaekers, Robby Stoks, Liesbeth Van Kerckhoven, Dieter Ebert, and Luc De Meester. 2007. "Host–Parasite 'Red Queen' Dynamics Archived in Pond Sediment." *Nature* 450 (November): 870.

Defer, Diane, Florie Desriac, Joël Henry, Nathalie Bourgougnon, Michèle Baudy-Floc'h, Benjamin Brillet, Patrick Le Chevalier, and Yannick Fleury. 2013. "Antimicrobial Peptides in Oyster Hemolymph: The Bacterial Connection." *Fish & Shellfish Immunology* 34 (6): 1439–47. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357.

Defoirdt, Tom. 2018. "Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy." *Trends in Microbiology* 26 (4): 313–28. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005.

DePaola, A, S McLeroy, and G McManus. 1997. "Distribution of Vibrio Vulnificus Phage in Oyster Tissues and Other Estuarine Habitats." *Applied and Environmental Microbiology* 63 (6): 2464–67.

DePaola, Angelo, Miles L. Motes, Amy M. Chan, and Curtis A. Suttle. 1998. "Phages Infecting Vibrio Vulnificus</Em> Are Abundant and Diverse in Oysters (Crassostrea Virginica</Em>) Collected from the Gulf of Mexico." *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1): 346.

Díaz-Muñoz, Samuel L., and Britt Koskella. 2014. "Chapter Four - Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments." In *Advances in Applied Microbiology*, edited by Sima Sariaslani and Geoffrey Michael Gadd, 89:135–83. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800259-9.00004-4.

Dubert, Javier, Juan L. Barja, and Jesús L. Romalde. 2017. “New Insights into Pathogenic Vibrios Affecting Bivalves in Hatcheries: Present and Future Prospects.” *Frontiers in Microbiology* 8: 762. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00762.

Duperthuy, Marylise, Johan Binesse, Frédérique Le Roux, Bernard Romestand, Audrey Caro, Patrice Got, Alain Givaudan, Didier Mazel, Evelyne Bachère, and Delphine Destoumieux-Garzón. 2010. “The Major Outer Membrane Protein OmpU of Vibrio Splendidus Contributes to Host Antimicrobial Peptide Resistance and Is Required for Virulence in the Oyster Crassostrea Gigas.” *Environmental Microbiology* 12 (4): 951–63.

Duperthuy, Marylise, Paulina Schmitt, Edwin Garzón, Audrey Caro, Rafael D Rosa, Frédérique Le Roux, Nicole Lautrédou-Audouy, Patrice Got, Bernard Romestand, and Julien de Lorgeril. 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 (7): 2993–98.

Durand, Eric, Van Son Nguyen, Abdelrahim Zoued, Laureen Logger, Gérard Péhau-Arnaudet, Marie-Stéphanie Aschtgen, Silvia Spinelli, et al. 2015. “Biogenesis and Structure of a Type VI Secretion Membrane Core Complex.” *Nature* 523 (July): 555.

Dwivedi, Bhakti, Bingjie Xue, Daniel Lundin, Robert A Edwards, and Mya Breitbart. 2013. “A Bioinformatic Analysis of Ribonucleotide Reductase Genes in Phage Genomes and Metagenomes.” *BMC Evolutionary Biology* 13 (1): 33. https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-33.

-E-

EFSA Panel on Animal Health and welfare (AHAW). 2010. “Scientific Opinion on the Increased Mortality Events in Pacific Oysters, *Crassostrea Gigas*: Oyster Mortality.” *EFSA Journal* 8 (11): 1894. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1894.

Eizaguirre, Christophe, Tobias L. Lenz, Martin Kalbe, and Manfred Milinski. 2012. “Rapid and Adaptive Evolution of MHC Genes under Parasite Selection in Experimental Vertebrate Populations.” *Nature Communications* 3 (January): 621.

Escudero, Jose Antonio, Celine Loot, Vincent Parissi, Aleksandra Nivina, Christiane Bouchier, and Didier Mazel. 2016. “Unmasking the Ancestral Activity of Integron Integrases Reveals a Smooth Evolutionary Transition during Functional Innovation.” *Nature Communications* 7 (1): 10937. https://doi.org/10.1038/ncomms10937.

Espejo, Romilio T., Katherine García, and Nicolas Plaza. 2017. “Insight Into the Origin and Evolution of the Vibrio Parahaemolyticus Pandemic Strain.” *Frontiers in Microbiology* 8 (July). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01397.

-F-

Fabioux, Caroline, Arnaud HUVET, Pierrick LE SOUCHU, Marcel LE PENNEC, and Stephane POUVREAU. 2005. “Temperature and Photoperiod Drive Crassostrea Gigas Reproductive Internal Clock.” *Aquaculture* 250 (1–2): 458–70. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.038.

Faruque, Shah M. 2014. “Role of Phages in the Epidemiology of Cholera.” In *Cholera Outbreaks*, edited by G. Balakrish Nair and Yoshifumi Takeda, 165–80. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/82_2013_358.

Faruque, Shah M, Iftekhar Bin Naser, M Johirul Islam, A S G Faruque, A N Ghosh, G Balakrish Nair, David A Sack, and John J Mekalanos. 2005. “Seasonal Epidemics of Cholera Inversely Correlate with the Prevalence of Environmental Cholera Phages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (5): 1702–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0408992102.

Faury, N. 2004. “Vibrio Crassostreae Sp. Nov., Isolated from the Haemolymph of Oysters (Crassostrea Gigas).” *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 54 (6): 2137–40. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63232-0.

Fleury, Elodie, Jeanne Moal, Viviane Boulo, Jean-Yves Daniel, David Mazurais, Alain Hénaut, Charlotte Corporeau, Pierre Boudry, Pascal Favrel, and Arnaud Huvet. 2010. “Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality.” *Marine*

Biotechnology 12 (3): 326–39. https://doi.org/10.1007/s10126-009-9227-9.

Fournes, Florian, Marie-Eve Val, Ole Skovgaard, and Didier Mazel. 2018. "Replicate Once Per Cell Cycle: Replication Control of Secondary Chromosomes." *Frontiers in Microbiology* 9: 1833. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01833.

Friman, Ville-Petri, and Angus Buckling. 2014. "Phages Can Constrain Protist Predation-Driven Attenuation of Pseudomonas Aeruginosa Virulence in Multienemy Communities." *The ISME Journal* 8 (9): 1820–30. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.40.

-G-

Gandon, S., A. BUCKLING, E. DECAESTECKER, and T. DAY. 2008. "Host–Parasite Coevolution and Patterns of Adaptation across Time and Space." *Journal of Evolutionary Biology* 21 (6): 1861–66. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01598.x.

Garnier, Matthieu, Yannick Labreuche, and Jean-Louis Nicolas. 2008. "Molecular and Phenotypic Characterization of Vibrio Aestuarianus Subsp. Francensis Subsp. Nov., a Pathogen of the Oyster Crassostrea Gigas." *Systematic and Applied Microbiology* 31 (5): 358–65.

Gavin, Hannah E., Nike T. Beubier, and Karla J. F. Satchell. 2017. "The Effector Domain Region of the Vibrio Vulnificus MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine." *PLOS Pathogens* 13 (1): e1006119. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006119.

Gay, M, Fcj Berthe, and F Le Roux. 2004. "Screening of Vibrio Isolates to Develop an Experimental Infection Model in the Pacific Oyster Crassostrea Gigas." *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 49–56. https://doi.org/10.3354/dao059049.

Gay, Mélanie. 2004. "Infection Expérimentale Chez Crassostrea Gigas : Étude de Deux Souches Pathogènes Apparentées à Vibrio Splendidus," December.

Gordeeva, Julia, Natalya Morozova, Nicolas Sierro, Artem Isaev, Tomas Sinkunas, Ksenia Tsvetkova, Mikhail Matlashov, et al. 2019. "BREX System of Escherichia Coli Distinguishes

Self from Non-Self by Methylation of a Specific DNA Site." *Nucleic Acids Research* 47 (1): 253–65. https://doi.org/10.1093/nar/gky1125.

Goudenège, David, Marie Agnès Travers, Astrid Lemire, Bruno Petton, Philippe Haffner, Yannick Labreuche, Delphine Tourbiez, et al. 2015. "A Single Regulatory Gene Is Sufficient to Alter Vibrio Aestuarianus Pathogenicity in Oysters." *Environmental Microbiology* 17 (11): 4189–99. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12699.

Green, Timothy J., and Caroline Montagnani. 2013. "Poly I:C Induces a Protective Antiviral Immune Response in the Pacific Oyster (Crassostrea Gigas) against Subsequent Challenge with Ostreid Herpesvirus (OsHV-1 Mvar)." *Fish & Shellfish Immunology* 35 (2): 382–88. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051.

Green, Timothy J., David Raftos, Peter Speck, and Caroline Montagnani. 2015. "Antiviral Immunity in Marine Molluscs." *Journal of General Virology* 96 (9): 2471–82. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244.

Grizel, Henri. 1974. "Recherche Sur l'agent de La Maladie de La Glande Digestive de Ostrea Edulis Linné." *SciPeche Bull Inst Peches Marit* 240: 7–29.

Gueguen, Yannick, Amaury Herpin, André Aumelas, Julien Garnier, Julie Fievet, Jean-Michel Escoubas, Philippe Bulet, et al. 2006. "Characterization of a Defensin from the Oyster Crassostrea Gigas: RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, AND GENE EXPRESSION." *Journal of Biological Chemistry* 281 (1): 313–23. https://doi.org/10.1074/jbc.M510850200.

-H-

Hanington, P.C., and S.-M. Zhang. 2011. "The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation." *Journal of Innate Immunity* 3 (1): 17–27. https://doi.org/10.1159/000321882.

Harrison, Ellie, and Michael A. Brockhurst. 2017. "Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage: What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger." *BioEssays* 39 (12): 1700112. https://doi.org/10.1002/bies.201700112.

Hatfull, Graham F. 2008. “Bacteriophage Genomics.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (5): 447–53. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004.

Hazen, Tracy H., Li Pan, Ji-Dong Gu, and Patricia A. Sobecky. 2010. “The Contribution of Mobile Genetic Elements to the Evolution and Ecology of Vibrios.” *FEMS Microbiology Ecology* 74 (3): 485–99. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00937.x.

Heidelberg, John F., Jonathan A. Eisen, William C. Nelson, Rebecca A. Clayton, Michelle L. Gwinn, Robert J. Dodson, Daniel H. Haft, et al. 2000. “DNA Sequence of Both Chromosomes of the Cholera Pathogen Vibrio Cholerae.” *Nature* 406 (6795): 477–83. https://doi.org/10.1038/35020000.

Heierson, A, I Sidén, A Kivaisi, and H G Boman. 1986. “Bacteriophage-Resistant Mutants of Bacillus Thuringiensis with Decreased Virulence in Pupae of Hyalophora Cecropia.” *Journal of Bacteriology* 167 (1): 18–24. https://doi.org/10.1128/jb.167.1.18-24.1986.

Hennes, K P, and M Simon. 1995. “Significance of Bacteriophages for Controlling Bacterioplankton Growth in a Mesotrophic Lake.” *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1): 333.

Herelle, M. F. d’. 1917. “On an Invisible Microbe Antagonistic to Dysentery Bacilli. Note by M. F. d’Herelle, Presented by M. Roux. Comptes Rendus Academie Des Sciences 1917; 165:373–5 Y1 - 2011/01/01.” *Bacteriophage* 1 (1): 3–5. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14941.

Herrington, D A, R H Hall, G Losonsky, J J Mekalanos, R K Taylor, and M M Levine. 1988. “Toxin, Toxin-Coregulated Pili, and the ToxR Regulon Are Essential for Vibrio Cholerae Pathogenesis in Humans.” *The Journal of Experimental Medicine* 168 (4): 1487–92. https://doi.org/10.1084/jem.168.4.1487.

Hine, PM. 1992. “Herpesviruses Associated with Mortalities among Hatchery-Reared Larval Pacific Oysters Crassostrea Gigas.” *Dis. Aquat. Org.* 12: 135–42.

Ho, Brian T., Tao G. Dong, and John J. Mekalanos. 2014. “A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System.” *Cell Host & Microbe* 15 (1): 9–21. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.008.

Hochhut, B, Y Lotfi, D Mazel, S M Faruque, R Woodgate, and M K Waldor. 2001. “Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Gene Clusters in Vibrio Cholerae O139 and O1 SXT Constins.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (11): 2991–3000. https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001.

Howard, Dorothy W, and Cecelia S Smith. 1983. “Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks.”

Howard-Varona, Cristina, Katherine R Hargreaves, Stephen T Abedon, and Matthew B Sullivan. 2017. “Lysogeny in Nature: Mechanisms, Impact and Ecology of Temperate Phages.” *The ISME Journal* 11 (7): 1511–20. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16.

Hunt, Dana E., Lawrence A. David, Dirk Gevers, Sarah P. Preheim, Eric J. Alm, and Martin F. Polz. 2008. “Resource Partitioning and Sympatric Differentiation Among Closely Related Bacterioplankton.” *Science* 320 (5879): 1081. https://doi.org/10.1126/science.1157890.

Hurley, Catherine C, AnneMarie Quirke, F Jerry Reen, and E Fidelma Boyd. 2006. “Four Genomic Islands That Mark Post-1995 Pandemic Vibrio Parahaemolyticus Isolates.” *BMC Genomics* 7 (May): 104–104. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-104.

Huvet, Arnaud, Amaury Herpin, Lionel Dégremont, Yannick Labreuche, Jean-François Samain, and Charles Cunningham. 2004. “The Identification of Genes from the Oyster Crassostrea Gigas That Are Differentially Expressed in Progeny Exhibiting Opposed Susceptibility to Summer Mortality.” *Gene* 343 (1): 211–20. https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.008.

Hyman, Paul, and Mark van Raaij. 2018. “Bacteriophage T4 Long Tail Fiber Domains.” *Biophysical Reviews* 10 (2): 463–71. https://doi.org/10.1007/s12551-017-0348-5.

Itoh, Naoki, and Keisuke G. Takahashi. 2008. “Distribution of Multiple Peptidoglycan Recognition Proteins in the Tissues of Pacific Oyster, Crassostrea Gigas.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 150 (4): 409–17. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.011.

-J-

Jensen, Mark A, Shah M Faruque, John J Mekalanos, and Bruce R Levin. 2006. “Modeling the Role of Bacteriophage in the Control of Cholera Outbreaks.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (12): 4652–57. https://doi.org/10.1073/pnas.0600166103.

Jeong, Hee-Gon, and Karla J. F. Satchell. 2012. “Additive Function of Vibrio Vulnificus MARTXVv and VvhA Cytolysins Promotes Rapid Growth and Epithelial Tissue Necrosis During Intestinal Infection.” *PLOS Pathogens* 8 (3): e1002581. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002581.

John, Seth G, Carolina B Mendez, Li Deng, Bonnie Poulos, Anne Kathryn M Kauffman, Suzanne Kern, Jennifer Brum, Martin F Polz, Edward A Boyle, and Matthew B Sullivan. 2011. “A Simple and Efficient Method for Concentration of Ocean Viruses by Chemical Flocculation.” *Environmental Microbiology Reports* 3 (2): 195–202. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00208.x.

Johnson, Christopher M, and Alan D Grossman. 2015. “Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work.” *Annual Review of Genetics* 49: 577–601. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018.

Jonge, Patrick A. de, Franklin L. Nobrega, Stan J.J. Brouns, and Bas E. Dutilh. 2019. “Molecular and Evolutionary Determinants of Bacteriophage Host Range.” *Trends in Microbiology* 27 (1): 51–63. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.006.

Joshi, Avatar, Benjamin Kostiuk, Andrew Rogers, Jennifer Teschler, Stefan Pukatzki, and Fitnat H. Yildiz. 2017. “Rules of Engagement: The Type VI Secretion System in Vibrio Cholerae.” *Trends in Microbiology* 25 (4): 267–79. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.003.

-K-

Kalatzis, Panos G, Daniel Castillo, Pantelis Katharios, and Mathias Middelboe. 2018. "Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 7 (1): 15. https://doi.org/10.3390/antibiotics7010015.

Karunasagar, Indrani, M.M. Shivu, S.K. Girisha, G. Krohne, and Iddya Karunasagar. 2007. "Biocontrol of Pathogens in Shrimp Hatcheries Using Bacteriophages." *Larvi 2005* 268 (1): 288–92. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.049.

Kauffman, Anne Kathryn Marie. 2014. "Demographics of Lytic Viral Infection of Coastal Ocean Vibrio."

Kauffman, Kathryn M., Fatima A. Hussain, Joy Yang, Philip Arevalo, Julia M. Brown, William K. Chang, David VanInsberghe, et al. 2018. "A Major Lineage of Non-Tailed DsDNA Viruses as Unrecognized Killers of Marine Bacteria." *Nature* 554 (January): 118.

Keeling, Se, Cl Brosnahan, R Williams, E Gias, M Hannah, R Bueno, Wl McDonald, and C Johnston. 2014. "New Zealand Juvenile Oyster Mortality Associated with Ostreid Herpesvirus 1—an Opportunistic Longitudinal Study." *Diseases of Aquatic Organisms* 109 (3): 231–39. https://doi.org/10.3354/dao02735.

Keen, Eric C. 2015. "A Century of Phage Research: Bacteriophages and the Shaping of Modern Biology." *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37 (1): 6–9. https://doi.org/10.1002/bies.201400152.

Kesarcodi-Watson, A, H Kaspar, MJ Lategan, and L Gibson. 2009. "Two Pathogens of Greenshell™ Mussel Larvae, Perna Canaliculus: Vibrio Splendidus and a V. Coralliilyticus/Neptunius-like Isolate." *Journal of Fish Diseases* 32 (6): 499–507.

Kim, Byoung. 2018. "The Modes of Action of MARTX Toxin Effector Domains." *Toxins* 10 (12): 507. https://doi.org/10.3390/toxins10120507.

Kim, Min Soo, Young Deuk Kim, Sung Sik Hong, Kwangseo Park, Kwan Soo Ko, and

Heejoon Myung. 2015. “Phage-Encoded Colanic Acid-Degrading Enzyme Permits Lytic Phage Infection of a Capsule-Forming Resistant Mutant Escherichia Coli Strain.” Edited by K. E. Wommack. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (3): 900. https://doi.org/10.1128/AEM.02606-14.

Koch, T, A Raudonikiene, K Wilkens, and W Rüger. 1995. “Overexpression, Purification, and Characterization of the ADP-Ribosyltransferase (GpAlt) of Bacteriophage T4: ADP-Ribosylation of E. Coli RNA Polymerase Modulates T4 ‘Early’ Transcription.” *Gene Expression* 4 (4–5): 253–64.

Koskella, Britt, and Michael A. Brockhurst. 2014. “Bacteria–Phage Coevolution as a Driver of Ecological and Evolutionary Processes in Microbial Communities.” *FEMS Microbiology Reviews* 38 (5): 916–31. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072.

Koskella, Britt, Derek M. Lin, Angus Buckling, and John N. Thompson. 2012. “The Costs of Evolving Resistance in Heterogeneous Parasite Environments.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1735): 1896–1903. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2259.

Kulikov, Eugene, Alla Golomidova, Maria Letarova, Elena Kostryukova, Alexandr Zelenin, Nikolai Prokhorov, and Andrey Letarov. 2014. “Genomic Sequencing and Biological Characteristics of a Novel Escherichia Coli Bacteriophage 9g, a Putative Representative of a New Siphoviridae Genus.” *Viruses* 6 (12): 5077–92. https://doi.org/10.3390/v6125077.

-L-

Labreuche, Y, P Soudant, M Goncalves, C Lambert, and J Nicolas. 2006. “Effects of Extracellular Products from the Pathogenic Vibrio Aestuarianus Strain 01/32 on Lethality and Cellular Immune Responses of the Oyster Crassostrea Gigas.” *Developmental & Comparative Immunology* 30 (4): 367–79. https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003.

Labreuche, Yannick, Frédérique Le Roux, Joël Henry, Céline Zatylny, Arnaud Huvet, Christophe Lambert, Philippe Soudant, Didier Mazel, and Jean-Louis Nicolas. 2010. “Vibrio Aestuarianus Zinc Metalloprotease Causes Lethality in the Pacific Oyster Crassostrea Gigas and Impairs the Host Cellular Immune Defenses.” *Fish & Shellfish Immunology* 29 (5): 753–

58. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.007.

Labrie, Simon J., Julie E. Samson, and Sylvain Moineau. 2010. “Bacteriophage Resistance Mechanisms.” *Nature Reviews Microbiology* 8 (March): 317.

Lacoste, A, F Jalabert, S Malham, A Cueff, F Gélébart, C Cordevant, M Lange, and Sa Poulet. 2001. “A Vibrio Splendidus Strain Is Associated with Summer Mortality of Juvenile Oysters Crassostrea Gigas in the Bay of Morlaix (North Brittany, France).” *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 139–45. https://doi.org/10.3354/dao046139.

Lafont, Maxime, Priscila Goncalves, Ximing Guo, Caroline Montagnani, David Raftos, and Timothy Green. 2019. “Transgenerational Plasticity and Antiviral Immunity in the Pacific Oyster (Crassostrea Gigas) against Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1).” *Developmental & Comparative Immunology* 91 (February): 17–25. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.022.

Lambert, Christophe, Jean-Louis Nicolas, and Valérie Cilia. 1999. “Vibrio Splendidus-Related Strain Isolated from Brown Deposit in Scallop (Pecten Maximus) Cultured in Brittany (France).” *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19 (3): 102–6.

Lawrence, Jeffrey G., Graham F. Hatfull, and Roger W. Hendrix. 2002. “Imbroglios of Viral Taxonomy: Genetic Exchange and Failings of Phenetic Approaches.” *Journal of Bacteriology* 184 (17): 4891. https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4891-4905.2002.

Le Roux, F, M Gay, C Lambert, Jl Nicolas, M Gouy, and F Berthe. 2004. “Phylogenetic Study and Identification of Vibrio Splendidus-Related Strains Based on GyrB Gene Sequences.” *Diseases of Aquatic Organisms* 58: 143–50. https://doi.org/10.3354/dao058143.

Le Roux, Frédérique. 2017. “Environmental Vibrios: «a Walk on the Wild Side».” *Environmental Microbiology Reports* 9 (1): 27–29. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12497.

Le Roux, Frédérique, Johan Binesse, Denis Saulnier, and Didier Mazel. 2007. “Construction of a Vibrio Splendidus Mutant Lacking the Metalloprotease Gene vsm by Use of a Novel Counterselectable Suicide Vector.” *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (3): 777–84.

Le Roux, Frédérique, and Melanie Blokesch. 2018. “Eco-Evolutionary Dynamics Linked to Horizontal Gene Transfer in Vibrios.” *Annual Review of Microbiology* 72 (1): 89–110. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062148.

Le Roux, Frédérique, Brigid M Davis, and Matthew K Waldor. 2011. “Conserved Small RNAs Govern Replication and Incompatibility of a Diverse New Plasmid Family from Marine Bacteria.” *Nucleic Acids Research* 39 (3): 1004–13. https://doi.org/10.1093/nar/gkq852.

Le Roux, Frédérique, K. Mathias Wegner, and Martin F. Polz. 2016. “Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals.” *Trends in Microbiology* 24 (7): 568–80. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.006.

Le Roux, Gema Lorenzo, Pierre Peyret, Corinne Audemard, Antonio Figueras, Christian Vivarès, Manolo Gouy, and Franck Berthe. 2001. “Molecular Evidence for the Existence of Two Species of Marteilia in Europe.” *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48 (4): 449–54. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00178.x.

Le, Tuan Son, Paul C. Southgate, Wayne O’Connor, Sue Poole, and D. Ipek Kurtböke. 2018. “Bacteriophages as Biological Control Agents of Enteric Bacteria Contaminating Edible Oysters.” *Current Microbiology* 75 (5): 611–19. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1424-6.

Lee, Jae Yun, Zhiqun Li, and Eric S. Miller. 2017. “Vibrio Phage KVP40 Encodes a Functional NAD^+ Salvage Pathway.” Edited by Tina M. Henkin. *Journal of Bacteriology* 199 (9). https://doi.org/10.1128/JB.00855-16.

Leibovitz, L., R. Elston, V. P. Lipovsky, and J. Donaldson. 1978. “A NEW DISEASE OF LARVAL PACIFIC OYSTERS (Crassostrea Gigas)1.” *Proceedings of the Annual Meeting - World Mariculture Society* 9 (1-4): 603–15. https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1978.tb00277.x.

Leiman, Petr G, Marek Basler, Udupi A Ramagopal, Jeffrey B Bonanno, J Michael Sauder, Stefan Pukatzki, Stephen K Burley, Steven C Almo, and John J Mekalanos. 2009. “Type VI Secretion Apparatus and Phage Tail-Associated Protein Complexes Share a Common

Evolutionary Origin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (11): 4154–59. https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106.

Lemire, Astrid, David Goudenège, Typhaine Versigny, Bruno Petton, Alexandra Calteau, Yannick Labreuche, and Frédérique Le Roux. 2014. "Populations, Not Clones, Are the Unit of Vibrio Pathogenesis in Naturally Infected Oysters." *The Isme Journal* 9 (December): 1523.

Lin, Ying-Rong, and Chan-Shing Lin. 2012. "Genome-Wide Characterization of Vibrio Phage Φpp2 with Unique Arrangements of the Mob-like Genes." *BMC Genomics* 13 (1): 224. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-224.

Lokmer, Ana, M. Anouk Goedknegt, David W. Thieltges, Dario Fiorentino, Sven Kuenzel, John F. Baines, and K. Mathias Wegner. 2016. "Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales." *Frontiers in Microbiology* 7: 1367. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01367.

Lokmer, Ana, and Karl Mathias Wegner. 2015. "Hemolymph Microbiome of Pacific Oysters in Response to Temperature, Temperature Stress and Infection." *The ISME Journal* 9 (3): 670–82. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160.

Lorgeril, Julien de, Aude Lucasson, Bruno Petton, Eve Toulza, Caroline Montagnani, Camille Clerissi, Jeremie Vidal-Dupiol, et al. 2018. "Immune-Suppression by OsHV-1 Viral Infection Causes Fatal Bacteraemia in Pacific Oysters." *Nature Communications* 9 (1): 4215. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3.

-M-

Makarova, Kira S., Daniel H. Haft, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, et al. 2011. "Evolution and Classification of the CRISPR–Cas Systems." *Nature Reviews Microbiology* 9 (May): 467.

Makino, Kozo, Kenshiro Oshima, Ken Kurokawa, Katsushi Yokoyama, Takayuki Uda, Kenichi Tagomori, Yoshio Iijima, et al. 2003. "Genome Sequence of Vibrio Parahaemolyticus: A Pathogenic Mechanism Distinct from That of V Cholerae." *The Lancet* 361 (9359): 743–49. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1.

Mathias, C B, A Kirschner, and B Velimirov. 1995. “Seasonal Variations of Virus Abundance and Viral Control of the Bacterial Production in a Backwater System of the Danube River.” *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10): 3734.

Matsuzaki, Shigenobu, Shuji Tanaka, Tetsuro Koga, and Tomio Kawata. 1992. “A Broad-Host-Range Vibriophage, KVP40, Isolated from Sea Water.” *Microbiology and Immunology* 36 (1): 93–97. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb01645.x.

Mazel, Didier. 2006. “Integrons: Agents of Bacterial Evolution.” *Nature Reviews Microbiology* 4 (8): 608–20. https://doi.org/10.1038/nrmicro1462.

McFall-Ngai, Margaret, Michael G. Hadfield, Thomas C. G. Bosch, Hannah V. Carey, Tomislav Domazet-Lošo, Angela E. Douglas, Nicole Dubilier, et al. 2013. “Animals in a Bacterial World, a New Imperative for the Life Sciences.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (9): 3229. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110.

Meibom, Karin L., Melanie Blokesch, Nadia A. Dolganov, Cheng-Yen Wu, and Gary K. Schoolnik. 2005. “Chitin Induces Natural Competence in Vibrio Cholerae</Em>.” *Science* 310 (5755): 1824. https://doi.org/10.1126/science.1120096.

Menouni, Rachid, Geoffrey Hutinet, Marie-Agnès Petit, and Mireille Ansaldi. 2015. “Bacterial Genome Remodeling through Bacteriophage Recombination.” *FEMS Microbiology Letters* 362 (1): 1–10. https://doi.org/10.1093/femsle/fnu022.

Metzger, Lisa C., Noémie Matthey, Candice Stoudmann, Esther J. Collas, and Melanie Blokesch. 2019. “Ecological Implications of Gene Regulation by TfoX and TfoY among Diverse Vibrio Species.” *Environmental Microbiology* 21 (7): 2231–47. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14562.

Miller, Eric S., John F. Heidelberg, Jonathan A. Eisen, William C. Nelson, A. Scott Durkin, Ann Ciecko, Tamara V. Feldblyum, et al. 2003. “Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range Vibriophage KVP40: Comparative Genomics of a T4-Related Bacteriophage.” *Journal of Bacteriology* 185 (17): 5220. https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5220-5233.2003.

Miller, Eric S, Elizabeth Kutter, Gisela Mosig, Fumio Arisaka, Takashi Kunisawa, and Wolfgang Rüger. 2003. “Bacteriophage T4 Genome.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 67 (1): 86–156. https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.86-156.2003.

Miossec, Laurence, Le Deuff Rose-marie, and Goulletquer Philippe. 2009. “Alien Species Alert: Crassostrea Gigas (Pacific Oyster),” January.

Moebus, K. 1980. “A Method for the Detection of Bacteriophages from Ocean Water.” *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 34 (1): 1–14. https://doi.org/10.1007/BF01983537.

Moehler, Jenny, K. Mathias Wegner, Karsten Reise, and Sabine Jacobsen. 2011. “Invasion Genetics of Pacific Oyster Crassostrea Gigas Shaped by Aquaculture Stocking Practices.” *Journal of Sea Research* 66 (3): 256–62. https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.08.004.

Monteiro, Rodrigo, Diana Priscila Pires, Ana Rita Costa, and Joana Azeredo. 2019. “Phage Therapy: Going Temperate?” *Special Issue: Antimicrobial Resistance and Novel Therapeutics* 27 (4): 368–78. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008.

Mühling, Martin, Nicholas J. Fuller, Andrew Millard, Paul J. Somerfield, Dominique Marie, William H. Wilson, David J. Scanlan, Anton F. Post, Ian Joint, and Nicholas H. Mann. 2005. “Genetic Diversity of Marine Synechococcus and Co-Occurring Cyanophage Communities: Evidence for Viral Control of Phytoplankton.” *Environmental Microbiology* 7 (4): 499–508. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00713.x.

Munro, J, J Oakey, E Bromage, and L Owens. 2003. “Experimental Bacteriophage-Mediated Virulence in Strains of Vibrio Harveyi.” *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 187–94. https://doi.org/10.3354/dao054187.

Munson-McGee, Jacob H, Shengyun Peng, Samantha Dewerff, Ramunas Stepanauskas, Rachel J Whitaker, Joshua S Weitz, and Mark J Young. 2018. “A Virus or More in (Nearly) Every Cell: Ubiquitous Networks of Virus-Host Interactions in Extreme Environments.” *The ISME Journal* 12 (7): 1706–14. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0071-7.

-N-

Nakamura, Muneaki, Prashanth Srinivasan, Michael Chavez, Matthew A. Carter, Antonia A. Dominguez, Marie La Russa, Matthew B. Lau, et al. 2019. "Anti-CRISPR-Mediated Control of Gene Editing and Synthetic Circuits in Eukaryotic Cells." *Nature Communications* 10 (1): 194. https://doi.org/10.1038/s41467-018-08158-x.

Netea, Mihai G. 2013. "Training Innate Immunity: The Changing Concept of Immunological Memory in Innate Host Defence." *European Journal of Clinical Investigation* 43 (8): 881–84. https://doi.org/10.1111/eci.12132.

Nicolas, JL, M Comps, and N Cochennec. 1992. "Herpes-like Virus Infecting Pacific Oyster Larvae, Crassostrea Gigas." *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 12 (1): 11–13.

Nicolas, Jl, S Corre, G Gauthier, R Robert, and D Ansquer. 1996. "Bacterial Problems Associated with Scallop Pecten Maximus Larval Culture." *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 67–76. https://doi.org/10.3354/dao027067.

-O-

Ofir, Gal, Sarah Melamed, Hila Sberro, Zohar Mukamel, Shahar Silverman, Gilad Yaakov, Shany Doron, and Rotem Sorek. 2018. "DISARM Is a Widespread Bacterial Defence System with Broad Anti-Phage Activities." *Nature Microbiology* 3 (1): 90–98. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0.

Ofir, Gal, and Rotem Sorek. 2018. "Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights." *Cell* 172 (6): 1260–70. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045.

Okada, Kazuhisa, Tetsuya Iida, Kumiko Kita-Tsukamoto, and Takeshi Honda. 2005. "Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes." *Journal of Bacteriology* 187 (2): 752. https://doi.org/10.1128/JB.187.2.752-757.2005.

-P-

Parizadeh, Leila, Delphine Tourbiez, Céline Garcia, Philippe Haffner, Lionel Dégremont, Frédérique Le Roux, and Marie-Agnès Travers. 2018. "Ecologically Realistic Model of Infection for Exploring the Host Damage Caused by Vibrio Aestuarianus." *Environmental*

Microbiology 20 (12): 4343–55. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350.

Peeler, Edmund J., R. Allan Reese, Deborah L. Cheslett, Fiona Geoghegan, Ayesha Power, and Mark A. Thrush. 2012. "Investigation of Mortality in Pacific Oysters Associated with Ostreid Herpesvirus-1μVar in the Republic of Ireland in 2009." *Preventive Veterinary Medicine* 105 (1): 136–43. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.02.001.

Pérez-Sánchez, Tania, Brenda Mora-Sánchez, and José Luis Balcázar. 2018. "Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges." *Trends in Microbiology* 26 (11): 896–903. https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002.

Petton, Bruno, Maxime Bruto, Adèle James, Yannick Labreuche, Marianne Alunno-Bruscia, and Frédérique Le Roux. 2015. "Crassostrea Gigas Mortality in France: The Usual Suspect, a Herpes Virus, May Not Be the Killer in This Polymicrobial Opportunistic Disease." *Frontiers in Microbiology* 6: 686. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686.

Petton, Bruno, Fabrice Pernet, Rene Robert, and Pierre Boudry. 2013. *Temperature Influence on Pathogen Transmission and Subsequent Mortalities in Juvenile Pacific Oysters Crassostrea Gigas*. Vol. 3. https://doi.org/10.3354/aei00070.

Pichot, Yves, Michel Comps, Gilbert Tige, Henri Grizel, and Marie-Agnes Rabouin. 1981. "Recherches Sur Bonamia Ostreae Gen. n., Sp. n., Parasite Nouveau de l'huitre Plate Ostrea Edulis." *Studies on Bonamia Ostreae Gen. n., Sp. n., a New Parasite of the European Flat Oyster, Ostrea Edulis L., Fr]. Rev Trav Inst Pêch Marit* 43: 131–40.

Piel, Damien, Maxime Bruto, Adèle James, Yannick Labreuche, Christophe Lambert, Adrian Janicot, Sabine Chenivesse, et al. 2019. "Selection of *Vibrio Crassostreae* Relies on a Plasmid Expressing a Type 6 Secretion System Cytotoxic for Host Immune Cells." *Environmental Microbiology*, August. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14776.

Preheim, Sarah P., Yan Boucher, Hans Wildschutte, Lawrence A. David, Daniele Veneziano, Eric J. Alm, and Martin F. Polz. 2011. "Metapopulation Structure of Vibrionaceae among Coastal Marine Invertebrates." *Environmental Microbiology* 13 (1): 265–75. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02328.x.

Pukatzki, Stefan, Amy T Ma, Andrew T Revel, Derek Sturtevant, and John J Mekalanos. 2007. “Type VI Secretion System Translocates a Phage Tail Spike-like Protein into Target Cells Where It Cross-Links Actin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (39): 15508–13. https://doi.org/10.1073/pnas.0706532104.

-Q-

Quirke, A. M., F. Jerry Reen, Marcus J. Claesson, and E. Fidelma Boyd. 2006. “Genomic Island Identification in Vibrio Vulnificus Reveals Significant Genome Plasticity in This Human Pathogen.” *Bioinformatics* 22 (8): 905–10. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl015.

-R-

Rakonjac, Jasna, Nicholas J Bennett, Julian Spagnuolo, Dragana Gagic, and Marjorie Russel. 2011. “Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications.” *Current Issues in Molecular Biology* 13 (2): 51.

Rehman, Sana, Zahid Ali, Momna Khan, Nazish Bostan, and Saadia Naseem. 2019. “The Dawn of Phage Therapy.” *Reviews in Medical Virology* 29 (4): e2041. https://doi.org/10.1002/rmv.2041.

Reise, Karsten. 1998. “Pacific Oysters Invade Mussel Beds in the European Wadden Sea.” *Senckenbergiana Maritima* 28 (4): 167–75. https://doi.org/10.1007/BF03043147.

Reise, Karsten, Christian Buschbaum, Heike Büttger, Johannes Rick, and K. Mathias Wegner. 2017. “Invasion Trajectory of Pacific Oysters in the Northern Wadden Sea.” *Marine Biology* 164 (4). https://doi.org/10.1007/s00227-017-3104-2.

Reyes-Robles, Tamara, Rebecca S Dillard, Lynne S Cairns, Cecilia A Silva-Valenzuela, Max Housman, Afsar Ali, Elizabeth R Wright, and Andrew Camilli. 2018. “Vibrio Cholerae Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection.” *Journal of Bacteriology* 200 (15): e00792-17. https://doi.org/10.1128/JB.00792-17.

Rørbo, Nanna, Anita Rønneseth, Panos Kalatzis, Bastian Rasmussen, Kirsten Engell-

Sørensen, Hans Kleppen, Heidrun Wergeland, Lone Gram, and Mathias Middelboe. 2018. "Exploring the Effect of Phage Therapy in Preventing Vibrio Anguillarum Infections in Cod and Turbot Larvae." *Antibiotics* 7 (2): 42. https://doi.org/10.3390/antibiotics7020042.

Ross, Alexa, Samantha Ward, and Paul Hyman. 2016. "More Is Better: Selecting for Broad Host Range Bacteriophages." *Frontiers in Microbiology* 7 (September): 1352–1352. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01352.

Rost, Burkhard. 1999. "Twilight Zone of Protein Sequence Alignments." *Protein Engineering, Design and Selection* 12 (2): 85–94. https://doi.org/10.1093/protein/12.2.85.

Rowe-Magnus, Dean A, Anne-Marie Guérout, and Didier Mazel. 1999. "Super-Integrons." *Research in Microbiology* 150 (9): 641–51. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)00127-8.

Royet, Julien, Dipika Gupta, and Roman Dziarski. 2011. "Peptidoglycan Recognition Proteins: Modulators of the Microbiome and Inflammation." *Nature Reviews Immunology* 11 (November): 837.

Rubio, Tristan, Daniel Oyanedel, Yannick Labreuche, Eve Toulza, Xing Luo, Maxime Bruto, Cristian Chaparro, et al. 2019. "Species-Specific Mechanisms of Cytotoxicity toward Immune Cells Determine the Successful Outcome of Vibrio</Em> Infections." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, June, 201905747. https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116.

Ruska, H. 1943. "Versuch Zu Einer Ordnung Der Virusarten." *Archives of Virology* 2 (5): 480–98. https://doi.org/10.1007/BF01244584.

Russell, Alistair B., S. Brook Peterson, and Joseph D. Mougous. 2014. "Type VI Secretion System Effectors: Poisons with a Purpose." *Nature Reviews Microbiology* 12 (January): 137.
Salmond, George P. C., and Peter C. Fineran. 2015. "A Century of the Phage: Past, Present and Future." *Nature Reviews Microbiology* 13 (November): 777.

-S-

Salomon, Dor, Herman Gonzalez, Barrett L. Updegraff, and Kim Orth. 2013. "Vibrio

Parahaemolyticus Type VI Secretion System 1 Is Activated in Marine Conditions to Target Bacteria, and Is Differentially Regulated from System 2." *PLOS ONE* 8 (4): e61086. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061086.

Salvi, Daniele, Armando Macali, and Paolo Mariottini. 2014. "Molecular Phylogenetics and Systematics of the Bivalve Family Ostreidae Based on RRNA Sequence-Structure Models and Multilocus Species Tree." Edited by Valerio Ketmaier. *PLoS ONE* 9 (9): e108696. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108696.

Salvi, Daniele, and Paolo Mariottini. 2016. "Molecular Taxonomy in 2D: A Novel ITS2 RRNA Sequence-Structure Approach Guides the Description of the Oysters' Subfamily Saccostreinae and the Genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae)." *Zoological Journal of the Linnean Society*, July. https://doi.org/10.1111/zoj.12455.

Samain, Jean-François, and Helen McCombie. 2008. *Summer Mortality of Pacific Oyster Crassostrea Gigas: The Morest Project*. Editions Quae.

Samson, Julie E., Alfonso H. Magadán, Mourad Sabri, and Sylvain Moineau. 2013. "Revenge of the Phages: Defeating Bacterial Defences." *Nature Reviews Microbiology* 11 (August): 675.

Satchell, Karla J F. 2015. "Multifunctional-Autoprocessing Repeats-in-Toxin (MARTX) Toxins of Vibrios." *Microbiology Spectrum* 3 (3): 10.1128/microbiolspec.VE-0002–2014. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014.

Saulnier, Denis, Sophie De Decker, Philippe Haffner, Laetitia Cobret, Maeva Robert, and Céline Garcia. 2010. "A Large-Scale Epidemiological Study to Identify Bacteria Pathogenic to Pacific Oyster Crassostrea Gigas and Correlation between Virulence and Metalloprotease-like Activity." *Microbial Ecology* 59 (4): 787–98.

Sawabe, Tomoo, Yoshitoshi Ogura, Yuta Matsumura, Feng Gao, AKM Amin, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, et al. 2013. "Updating the Vibrio Clades Defined by Multilocus Sequence Phylogeny: Proposal of Eight New Clades, and the Description of Vibrio Tritonius Sp. Nov." *Frontiers in Microbiology* 4: 414. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00414.

Schulte, Rebecca D., Carsten Makus, Barbara Hasert, Nico K. Michiels, and Hinrich Schulenburg. 2010. “Multiple Reciprocal Adaptations and Rapid Genetic Change upon Experimental Coevolution of an Animal Host and Its Microbial Parasite.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (16): 7359. https://doi.org/10.1073/pnas.1003113107.

Seed, Kimberley D. 2015. “Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack.” Edited by Virginia L. Miller. *PLOS Pathogens* 11 (6): e1004847. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004847.

Seed, Kimberley D., Shah M. Faruque, John J. Mekalanos, Stephen B. Calderwood, Firdausi Qadri, and Andrew Camilli. 2012. “Phase Variable O Antigen Biosynthetic Genes Control Expression of the Major Protective Antigen and Bacteriophage Receptor in Vibrio Cholerae O1.” *PLOS Pathogens* 8 (9): e1002917. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002917.

Shapiro, B. Jesse, Jonathan Friedman, Otto X. Cordero, Sarah P. Preheim, Sonia C. Timberlake, Gitta Szabó, Martin F. Polz, and Eric J. Alm. 2012. “Population Genomics of Early Events in the Ecological Differentiation of Bacteria.” *Science* 336 (6077): 48. https://doi.org/10.1126/science.1218198.

Shapiro, B. Jesse, Inès Levade, Gabriela Kovacikova, Ronald K. Taylor, and Salvador Almagro-Moreno. 2016. “Origins of Pandemic Vibrio Cholerae from Environmental Gene Pools.” *Nature Microbiology* 2 (December): 16240.

Shimahara, Yoshiko, Jun Kurita, Ikunari Kiryu, Toyohiro Nishioka, Kei Yuasa, Morihiko Kawana, Takashi Kamaishi, and Norihisa Oseko. 2012. “Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Variants in Japan.” *Fish Pathology* 47 (4): 129–36.

Sillanpää J. Kirsikka, Sundh Henrik, and Sundell Kristina S. 2018. “Calcium Transfer across the Outer Mantle Epithelium in the Pacific Oyster, Crassostrea Gigas.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285 (1891): 20181676. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1676.

Smillie, Chris, M Pilar Garcillán-Barcia, M Victoria Francia, Eduardo PC Rocha, and

Fernando de la Cruz. 2010. “Mobility of Plasmids.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (3): 434–52.

Stern, Adi, and Rotem Sorek. 2011. “The Phage-Host Arms Race: Shaping the Evolution of Microbes.” *BioEssays* 33 (1): 43–51. https://doi.org/10.1002/bies.201000071.

Stone, Edel, Katrina Campbell, Irene Grant, and Olivia McAuliffe. 2019. “Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions.” *Viruses* 11 (6): 567. https://doi.org/10.3390/v11060567.

Sugumar, G, T Nakai, Y Hirata, D Matsubara, and K Muroga. 1998. “Vibrio Splendidus Biovar II as the Causative Agent of Bacillary Necrosis of Japanese Oyster Crassostrea Gigas Larvae.” *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 111–18. https://doi.org/10.3354/dao033111.

Sun, Xingmin, André Göhler, Knut J. Heller, and Horst Neve. 2006. “The Ltp Gene of Temperate Streptococcus Thermophilus Phage TP-J34 Confers Superinfection Exclusion to Streptococcus Thermophilus and Lactococcus Lactis.” *Virology* 350 (1): 146–57. https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.001.

-T-

Takemura, Alison, Diana Chien, and Martin Polz. 2014. “Associations and Dynamics of Vibrionaceae in the Environment, from the Genus to the Population Level.” *Frontiers in Microbiology* 5: 38. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038.

Tan, Demeng, Amalie Dahl, and Mathias Middelboe. 2015. “Vibriophages Differentially Influence Biofilm Formation by Vibrio Anguillarum Strains.” Edited by K. E. Wommack. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (13): 4489–97. https://doi.org/10.1128/AEM.00518-15.

Tan, Demeng, Sine Lo Svenningsen, and Mathias Middelboe. 2015. “Quorum Sensing Determines the Choice of Antiphage Defense Strategy in Vibrio Anguillarum.” Edited by Bonnie Bassler. *MBio* 6 (3). https://doi.org/10.1128/mBio.00627-15.

Taylor, R K, V L Miller, D B Furlong, and J J Mekalanos. 1987. “Use of PhoA Gene Fusions to Identify a Pilus Colonization Factor Coordinately Regulated with Cholera Toxin.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 (9): 2833–37. https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2833.

Thiaville, Jennifer J., Stefanie M. Kellner, Yifeng Yuan, Geoffrey Hutinet, Patrick C. Thiaville, Watthanachai Jumpathong, Susovan Mohapatra, et al. 2016. "Novel Genomic Island Modifies DNA with 7-Deazaguanine Derivatives." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (11): E1452–59. https://doi.org/10.1073/pnas.1518570113.

Thompson, Fabiano L., Tetsuya Iida, and Jean Swings. 2004. "Biodiversity of Vibrios." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68 (3): 403. https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.

Tison, David L, and Ramon J Seidler. 1983. "Vibrio Aestuarianus: A New Species from Estuarine Waters and Shellfish." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33 (4): 699–702.

Travers, Marie-Agnès, Katherine Boettcher Miller, Ana Roque, and Carolyn S. Friedman. 2015. "Bacterial Diseases in Marine Bivalves." *Pathogens and Disease Processes in Marine Molluscs* 131 (October): 11–31. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010.

Troost, Karin. 2010. "Causes and Effects of a Highly Successful Marine Invasion: Case-Study of the Introduced Pacific Oyster Crassostrea Gigas in Continental NW European Estuaries." *Journal of Sea Research* 64 (3): 145–65. https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.02.004.

Twort, FW. 1915. "An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses by Twort FW, L.R.C.P. Lond., M.R.C.S. (From the Laboratories of the Brown Institution, London) Y1 - 2011/05/01." *Bacteriophage* 1 (3): 127–29. https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16737.

Tzipilevich, Elhanan, Michal Habusha, and Sigal Ben-Yehuda. 2017. "Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors." *Cell* 168 (1–2): 186-199.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.003.

-V-

Vanhove, Audrey S, Tristan P Rubio, An N Nguyen, Astrid Lemire, David Roche, Julie

Nicod, Agnès Vergnes, Aurore C Poirier, Elena Disconzi, and Evelyne Bachère. 2016. “Copper Homeostasis at the Host Vibrio Interface: Lessons from Intracellular Vibrio Transcriptomics.” *Environmental Microbiology* 18 (3): 875–88.

Vanhove, Audrey Sophie, Marylise Duperthuy, Guillaume M Charrière, Frédérique Le Roux, David Goudenège, Benjamin Gourbal, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Yohann Couté, Sun Nyunt Wai, and Delphine Destoumieux-Garzón. 2015. “Outer Membrane Vesicles Are Vehicles for the Delivery of V Ibrio Tasmaniensis Virulence Factors to Oyster Immune Cells.” *Environmental Microbiology* 17 (4): 1152–65.

Vinod, M.G., M.M. Shivu, K.R. Umesha, B.C. Rajeeva, G. Krohne, Indrani Karunasagar, and Iddya Karunasagar. 2006. “Isolation of Vibrio Harveyi Bacteriophage with a Potential for Biocontrol of Luminous Vibriosis in Hatchery Environments.” *Aquaculture* 255 (1): 117–24. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.003.

-W-

Waechter, Magali, Frédérique Le Roux, Jean-Louis Nicolas, Éric Marissal, and Franck Berthe. 2002. “Caractérisation de Bactéries Pathogènes de Naissain d’huître Creuse Crassostrea Gigas.” *Comptes Rendus Biologies* 325 (3): 231–38.

Waldor, Matthew K., and John J. Mekalanos. 1996. “Lysogenic Conversion by a Filamentous Phage Encoding Cholera Toxin.” *Science* 272 (5270): 1910. https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910.

Wang, Lianrong, Shi Chen, Tiegang Xu, Koli Taghizadeh, John S Wishnok, Xiufen Zhou, Delin You, Zixin Deng, and Peter C Dedon. 2007. “Phosphorothioation of DNA in Bacteria by Dnd Genes.” *Nature Chemical Biology* 3 (11): 709–10. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.39.

Wang, Lingling, Xiaorui Song, and Linsheng Song. 2018. “The Oyster Immunity.” *Aqua Species Immunity* 80 (March): 99–118. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025.

Wang, Xiaoxue, Younghoon Kim, Qun Ma, Seok Hoon Hong, Karina Pokusaeva, Joseph M Sturino, and Thomas K Wood. 2010. “Cryptic Prophages Help Bacteria Cope with Adverse

Environments." *Nature Communications* 1: 147–147. https://doi.org/10.1038/ncomms1146.

Wegner, Karl Mathias, Nils Volkenborn, Hannes Peter, and Alexander Eiler. 2013. "Disturbance Induced Decoupling between Host Genetics and Composition of the Associated Microbiome." *BMC Microbiology* 13 (1): 252. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-252.

Weitz, Joshua S., Timothée Poisot, Justin R. Meyer, Cesar O. Flores, Sergi Valverde, Matthew B. Sullivan, and Michael E. Hochberg. 2013. "Phage–Bacteria Infection Networks." *Trends in Microbiology* 21 (2): 82–91. https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.11.003.

Wendling, Carolin Charlotte, and K Mathias Wegner. 2014. "Adaptation to Enemy Shifts: Rapid Resistance Evolution to Local Vibrio Spp. in Invasive Pacific Oysters." PANGAEA. https://doi.org/10.1594/PANGAEA.833020.

Westra, Edze R., Daan C. Swarts, Raymond H.J. Staals, Matthijs M. Jore, Stan J.J. Brouns, and John van der Oost. 2012. "The CRISPRs, They Are A-Changin': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity." *Annual Review of Genetics* 46 (1): 311–39. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155447.

Wiedenbeck, Jane, and Frederick M. Cohan. 2011. "Origins of Bacterial Diversity through Horizontal Genetic Transfer and Adaptation to New Ecological Niches." *FEMS Microbiology Reviews* 35 (5): 957–76. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x.

-X-

Xiong, Lei, Siyi Liu, Si Chen, Yao Xiao, Bochen Zhu, Yali Gao, Yujing Zhang, et al. 2019. "A New Type of DNA Phosphorothioation-Based Antiviral System in Archaea." *Nature Communications* 10 (1): 1688. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09390-9.

-Y-

Yen, Minmin, and Andrew Camilli. 2017. "Mechanisms of the Evolutionary Arms Race between Vibrio Cholerae and Vibriophage Clinical Isolates." *International Microbiology. Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, no. 20: 116–20. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.292.

Yoshida, S, M Ogawa, and Y Mizuguchi. 1985. “Relation of Capsular Materials and Colony Opacity to Virulence of Vibrio Vulnificus.” *Infection and Immunity* 47 (2): 446–51.
Young, K K, G J Edlin, and G G Wilson. 1982. “Genetic Analysis of Bacteriophage T4 Transducing Bacteriophages.” *Journal of Virology* 41 (1): 345–47.

Yu, Ying, Hong Yang, Jun Li, Peipei Zhang, Beibei Wu, Binglin Zhu, Yan Zhang, and Weihuan Fang. 2012. “Putative Type VI Secretion Systems of Vibrio Parahaemolyticus Contribute to Adhesion to Cultured Cell Monolayers.” *Archives of Microbiology* 194 (10): 827–35. https://doi.org/10.1007/s00203-012-0816-z.

-Z-

Zahid, M Shamim Hasan, S M Nashir Udden, A S G Faruque, Stephen B Calderwood, John J Mekalanos, and Shah M Faruque. 2008. “Effect of Phage on the Infectivity of Vibrio Cholerae and Emergence of Genetic Variants.” *Infection and Immunity* 76 (11): 5266–73. https://doi.org/10.1128/IAI.00578-08.

Zhang, Guofan, Xiaodong Fang, Ximing Guo, Li Li, Ruibang Luo, Fei Xu, Pengcheng Yang, et al. 2012. “The Oyster Genome Reveals Stress Adaptation and Complexity of Shell Formation.” *Nature* 490 (September): 49.

Zhang, Hui, Zhenquan Yang, Yan Zhou, Hongduo Bao, Ran Wang, Tingwu Li, Maoda Pang, Lichang Sun, and Xiaohui Zhou. 2018. “Application of a Phage in Decontaminating Vibrio Parahaemolyticus in Oysters.” *International Journal of Food Microbiology* 275 (June): 24–31. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.027.

Zhang, Tao, Limei Qiu, Zhibin Sun, Lingling Wang, Zhi Zhou, Rui Liu, Feng Yue, Rui Sun, and Linsheng Song. 2014. “The Specifically Enhanced Cellular Immune Responses in Pacific Oyster (Crassostrea Gigas) against Secondary Challenge with Vibrio Splendidus.” *Developmental & Comparative Immunology* 45 (1): 141–50. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015.

Évolution de la virulence de *V. crassostreae* en lien avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs

La compréhension de la dynamique écologique et évolutive des agents infectieux est importante pour diagnostiquer, prédire et prévenir les maladies chez les espèces d'élevage et sauvages. L'objectif général de ce projet est d'étudier l'évolution de la virulence de *V. crassostreae* en relation avec l'huître en tant qu'hôte et les phages en tant que prédateurs. Nous avons identifié des mécanismes moléculaires à l'origine de l'adaptation des vibrios avec l'huître creuse. Nous avons démontré l'émergence de souches virulentes de *V. crassostreae* en zone impactée par le syndrome de mortalité des huîtres juvéniles. L'émergence de *V. crassostreae* plus virulent est liée à l'acquisition d'un plasmide codant un système de sécrétion de type 6 responsable d'une activité létale contre les hémocytes de l'huître. Ce projet fournit également des connaissances sur les interactions entre *V. crassostreae* et les phages tels que l'identification de l'unité de prédation ainsi que de potentiels mécanismes impliqués dans la résistance des souches et la virulence des phages. Il s'agit d'une première étape vers le développement de stratégies prophylactiques ou thérapeutiques respectueuses de l'environnement.

Mots-clés : Vibrio – interactions hôte/parasite – émergence de pathogènes – bactériophages

Evolution of virulence of *V. crassostreae* in relation to oyster as a host and phages as predators

Understanding the ecological and evolutionary dynamics of infectious agents is important for diagnosing, predicting and preventing diseases in farmed and wild species. This project was aimed at studying the evolution of *V. crassostreae* virulence in relation to the oyster as a host and to the phages as predators. We identified the molecular mechanisms leading to the adaptation of vibrios to oysters. We demonstrated the emergence of virulent strains of *V. crassostreae* in the area impacted by the juvenile oyster mortality syndrome. The emergence of more virulent *V. crassostreae* strains is linked to the acquisition of a plasmid encoding a type 6 secretion system responsible for lethal activity towards oyster hemocytes. This project also provides knowledge on the interactions between *V. crassostreae* and phages such as the identification of the predation unit as well as potential mechanisms involved in strain resistance and phage virulence. This represents a first step towards the development of prophylactic ecofriendly strategies.

Keywords: Vibrio - host / parasite interactions - pathogen emergence - bacteriophages