



**HAL**  
open science

# Survie intracellulaire, effets cytopathiques et virulence de *Vibrio tasmaniensis* LGP32, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*

Audrey Vanhove

► **To cite this version:**

Audrey Vanhove. Survie intracellulaire, effets cytopathiques et virulence de *Vibrio tasmaniensis* LGP32, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier I, 2014. Français. NNT : 2014MON13518 . tel-03858660

**HAL Id: tel-03858660**

**<https://theses.hal.science/tel-03858660>**

Submitted on 17 Nov 2022

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1**

Préparée au sein de l'école doctorale  
**Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,  
Hydrosciences et Environnement (SIBAGHE)**

Et de l'unité de recherche  
**UMR 5119, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (ECOSYM),  
Montpellier**

Spécialité : **Microbiologie, Parasitologie**

Présentée par **Audrey VANHOVE**

**Survie intracellulaire, effets cytopathiques et  
virulence de *Vibrio tasmaniensis* LGP32,  
pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*.**

Soutenue le 11/12/2014 devant le jury composé de

M. Mathieu SICARD, Professeur, Université Montpellier 2	Président
M. Dominique FERRANDON, Directeur de Recherches, CNRS	Rapporteur
M. Olivier NEYROLLES, Directeur de Recherches, CNRS	Rapporteur
M. Yannick LABREUCHE, Cadre IFREMER	Examineur
Mme Natacha KREMER, Chargée de Recherches, CNRS	Examineur
M. Guillaume CHARRIERE, Maitre de conférences, Université Montpellier 2	Invité
Mme Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN, Chargée de Recherches CNRS	Directrice de Thèse
Mme Estelle JUMAS-BILAK, Professeur, Université Montpellier 1	Co-directrice de Thèse



## Remerciements

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans la contribution et la collaboration de nombreuses personnes. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Je remercie Messieurs Dominique Ferrandon et Olivier Neyrolles qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Messieurs Mathieu Sicard, Yannick Labreuche, Guillaume Charrière et Madame Natacha Kremer pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie Messieurs Marc Trousselier et Marc Bouvy pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Ecologie des systèmes marins côtiers (UMR5119).

Je remercie l'Université Montpellier I et l'IFREMER pour m'avoir accordé un financement pour ce travail. Je remercie également la région Languedoc-Roussillon pour le financement attribué au projet Revaresp et l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement attribué au projet Vibriogen dans lequel s'est largement inscrite cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Madame Delphine Destoumieux-Garzón pour ses conseils, sa disponibilité et sa pédagogie. Merci de m'avoir encouragée et soutenue à chaque étape de mon travail. Cette expérience avec toi aura été très enrichissante tant sur le plan scientifique que personnel. Ton humanité et ta gentillesse font de toi une personne exceptionnelle.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Estelle Jumas-Bilak, ma co-directrice de thèse, qui m'a suivie depuis mes débuts dans la recherche et qui n'a jamais cessé de m'encourager et de croire en moi.

Je remercie Marylise Duperthuy, Frédérique Leroux, Astrid Lemire, Annick Jacq, Benjamin Gourbal et Sun Wai pour leur collaboration. Mais aussi Julien de lorgeril pour les interprétations des résultats de qPCR, Chantal Cazevielle du Centre de Ressource en Imagerie Cellulaire, Nicole Lautredoux et Vicky Diakou de la plateforme Montpellier RIO Imaging, Phillipe Clair de la plateforme qPCR haut débit, Yohann Couté du CEA de Grenoble et Patrice Got du plateau de cytométrie en flux de l'UMR5119.

Je tiens à remercier Guillaume Charrière, Evelyne Bachère et Caroline Montagnani pour la relecture de ce manuscrit et Agnès Vergnes pour son aide dans l'organisation de la venue des membres du jury.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et les moments agréables passés ensemble : Aurore Poirier, Agnès Vergnes, Julien de Lorgeril, Marc Leroy, Tristan Rubio, Jean-Luc Rolland, Evelyne Bachère, Caroline Montagnani, Guillaume Charrière, Carmen Lopez Joven, Céline Abi Khalil, Thierry Noël et ceux qui ne sont plus au laboratoire Rafael Da Rosa, Julie Nicod, Danielle Ferraz Mello, Adrien Santini, Pascal Alonso, Julie Fievet et Bernard Romestand. Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire Ecosym et en particulier Audrey Caro, Mylène Toubiana et Solange Fournier.

Je tiens également à remercier mes amis et plus particulièrement Sandrine Brugiroux, Kévin Esteves, Florie Desriac et Claire Gronwald pour leur présence et leur soutien moral tout au long de ma thèse.

Enfin, je remercie mes parents. Vous avez toujours eu confiance en moi et vous m'avez réconfortée dans les moments difficiles. Vous m'avez toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. Je me rends compte de la chance que j'ai de vous avoir.

“La pensée est plus qu'un droit, c'est le souffle même de l'homme”  
*Victor Hugo*



# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>6</b>
<b>CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>9</b>
<b>I. L’HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i></b> .....	<b>9</b>
I.1 LA BIOLOGIE DE L’HUITRE .....	9
I.2 L’HEMOLYPHE ET LES HEMOCYTES.....	11
I.3 LES REACTIONS IMMUNITAIRES DE L’HUITRE.....	12
I.3.1 Les mécanismes de la reconnaissance .....	13
I.3.2 Les voies de signalisation .....	15
I.3.3 La phagocytose.....	18
I.3.3.1 L’acidification du phagosome .....	21
I.3.3.2 Production d’espèces réactives de l’oxygène et de l’azote .....	21
I.3.3.3 Les métaux .....	25
I.3.3.3.1 L’influx de métaux dans le phagosome .....	25
a) Le zinc .....	27
b) Le cuivre .....	27
I.3.3.3.2 L’efflux de métaux du phagosome .....	28
I.3.3.4 Les enzymes hydrolytiques .....	29
I.3.3.5 Les protéases et les inhibiteurs de protéase.....	29
I.3.3.6 Les protéines et peptides antimicrobiens .....	30
<b>II. LES BACTERIES DU GENRE <i>VIBRIO</i></b> .....	<b>32</b>
II.1 LA BIOLOGIE DES VIBRIOS .....	32
II.2 TAXONOMIE .....	32
II.3 LES VIBRIOS PATHOGENES DE L’HUITRE .....	34
II.3.1 Les mortalités de larves.....	35
II.3.2 Les mortalités de juvéniles .....	35
II.3.3 Les mortalités d’adultes .....	37
II.4 FACTEURS DE VIRULENCE DES VIBRIO PATHOGENES .....	38
II.4.1 Les facteurs d’adhérence et de colonisation.....	38
II.4.2 Les facteurs induisant des dommages cellulaires .....	40
II.4.2.1 Les systèmes de sécrétion .....	40
II.4.2.1.1 Les transporteurs membranaires .....	41



II.4.2.1.2	Les vésicules de membrane externe .....	42
II.4.2.2	Les hémolysines.....	43
II.4.2.3	Les phospholipases.....	44
II.4.2.4	Les protéases.....	44
II.4.3	Résistance aux AMPs.....	46
II.4.3.1	Modification de la membrane externe .....	46
II.4.3.2	Induction de la réponse au stress de l'enveloppe.....	46
II.4.3.3	Efflux des AMPs.....	47
II.4.3.4	Immunosuppression de la production d'AMPs.....	47

### **III. LA RESISTANCE/ECHAPPEMENT A LA PHAGOCYTOSE CHEZ LES BACTERIES PATHOGENES**

<b>INTRACELLULAIRES.....</b>	<b>49</b>
III.1 ENTREE DANS LES CELLULES DE L'HOTE .....	50
III.2 SURVIE ET MULTIPLICATION DANS LA CELLULE.....	52
III.2.1 Pathogènes cytosoliques.....	52
III.2.2 Pathogènes intravacuolaires.....	53
III.2.2.1 Altération de la maturation du phagosome.....	53
III.2.2.2 Résistance aux ROS/RNS .....	54
III.2.2.2.1 Régulation de la réponse anti-oxydante .....	55
III.2.2.2.2 Les superoxydes dismutases .....	56
III.2.2.2.3 Les peroxyrédoxines ou alkylperoxydoreductase (Ahp) .....	57
III.2.2.2.4 Les catalases.....	58
III.2.2.2.5 Autres mécanismes .....	58
III.2.2.3 La résistance aux métaux .....	59
III.2.2.3.1 L'homéostasie du cuivre chez les bactéries .....	60
III.2.2.3.1.1 Les systèmes régulateurs de résistance au cuivre .....	60
III.2.2.3.1.2 Les systèmes d'efflux de cuivre.....	61
a) Les ATPases de type P <sub>1B</sub> .....	61
b) Les systèmes d'efflux de type RND .....	62
III.2.2.3.1.3 L'oxydation du cuivre .....	62
III.2.2.3.2 L'homéostasie du zinc chez les bactéries.....	63
III.2.2.3.2.1 Les systèmes régulateurs du zinc.....	63
III.2.2.3.2.2 Import de zinc.....	64
III.2.2.3.2.3 Export de zinc.....	65
III.2.2.3.3 L'homéostasie du fer et du manganèse chez les bactéries.....	65
III.2.2.3.3.1 Les systèmes de régulation du fer et du manganèse.....	66
III.2.2.3.3.2 L'influx et l'efflux de fer et de manganèse.....	66

## **CHAPITRE II: RESULTATS ..... 68**

<b>Section A. <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 sécrète des OMVs qui le protègent contre les peptides antimicrobiens et délivrent des facteurs de virulence aux cellules immunitaires de l'huître.....</b>	<b>68</b>
---	-----------

Publication 1 : Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of <i>Vibrio tasmaniensis</i> virulence factors to oyster immune cells.....	69
Principaux résultats.....	94
Données supplémentaires .....	96

**Section B. Fonctions de survie et mécanismes de virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 :  
une analyse du transcriptome intrahémocytaire de LGP32.....104**

Publication 2 : Determinants of <i>Vibrio</i> survival inside professional phagocytes: Essential role of copper homeostasis and antioxidant response in <i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32. ....	105
Principaux résultats.....	159
Données supplémentaires .....	161

**CHAPITRE III: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES... 167**

**CONCLUSION GENERALE..... 181**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 184**

**ANNEXES ..... 223**

Publication 3 : Resistance to antimicrobial peptides in vibrios .....	223
Publication 4 : Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in <i>Crassostrea gigas</i> . ....	249
Publication 5 : Exposure to the neurotoxic dinoflagellate, <i>Alexandrium catenella</i> , induces apoptosis of the hemocytes of the oyster, <i>Crassostrea gigas</i> .....	261



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN / ARN	Acide désoxyribonucléique / ribonucléique
Ahp	Alkyl hydroperoxide reductase
AMP	Antimicrobial peptides
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
CDF	Cation diffusion facilitator
CFU	Colony forming units
CMI	Concentration minimale inhibitrice
Def	Defensin
ECP	ExtraCellular Products
FAO	Food and Agriculture organisation
GFP	Green fluorescent protein
IFN	Interferon
LBP	LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharides
KDa	Kilo Dalton
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide
NOS	Nitric oxide synthase
NRAMP	Naturally resistance associated macrophage protein
OMP	Outer membrane protein
OMV	Outer membrane vesicle
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus type 1
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglycan
PGRP	Peptidoglycan recognition protein
PmB	Polymyxine B
PRP	Pattern recognition protein
Prp	Proline rich peptide
PRR	Pattern recognition receptor
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
REPAMO	Reseau de pathologie des mollusques
ROS	Reactive oxygen species
RND	Resistance Nodulation Division
RNS	Reactive nitritogen species
SDS PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superoxyde dismutase
TIMPs	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tsa	Thiol specific antioxidant



## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Production de l'espèce d'huître <i>Crassostrea gigas</i> en France. ....	7
Figure 2. Anatomie de l'huître <i>C. gigas</i> . ....	10
Figure 3. Les hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i> . ....	12
Figure 4. Mécanisme de défense de l'hémocyte. ....	13
Figure 5. PAMPs de différentes classes de pathogènes. ....	14
Figure 6. Représentation des voies conservées chez l'huître creuse <i>C. gigas</i> . ....	17
Figure 7. Maturation du phagosome. ....	20
Figure 8. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mammifères. ....	22
Figure 9. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites chez les hémocytes de bivalves. ....	24
Figure 10. Transport de métaux et production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules. ....	26
Figure 11. Arbre phylogénétique des <i>Vibrio</i> par analyse MLST sur 8 gènes ( <i>ftsZ</i> , <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> , <i>mreB</i> , <i>pyrH</i> , <i>recA</i> , <i>topA</i> et ARNr 16S) de 86 souches. ....	33
Figure 12. Modèle d'invasion des hémocytes de <i>C. gigas</i> par <i>V. tasmaniensis</i> LGP32. ....	37
Figure 13. Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (A) et de la structure du lipide A chez les <i>Vibrio</i> (B). ....	40
Figure 14. Systèmes de sécrétion transmembranaire connus chez les bactéries Gram négatives. ....	42
Figure 15. Les pathogènes intracellulaires. ....	50
Figure 16. Mécanismes d'entrée des bactéries dans les cellules de l'hôte. ....	51
Figure 17. Schéma simplifié de la résistance des bactéries aux ROS et aux RNS dans les phagosomes et réactions enzymatiques catalysées par les enzymes SOD, catalase et Ahp. ....	54
Figure 18. Modèle schématique de l'homéostasie du cuivre, du zinc, du fer et du manganèse chez les bactéries à Gram négatif. ....	59
Figure 19. Homéostasie du cuivre chez <i>E. coli</i> . ....	63
Figure 20. Homéostasie du zinc chez <i>E. coli</i> . ....	65
Figure 21. Contact <i>in vitro</i> des hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i> avec <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 après 30 minutes à une MOI (rapport bactéries/hémocytes) de 50:1. ....	68
Figure 22. Cultures en phase exponentielle de <i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32 sauvage et du mutant $\Delta ompU$ observées en microscopie électronique à transmission. ....	97
Figure 23. Modèle proposé pour la titration des AMPs par les OMVs de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32. ....	97
Figure 24. Profils SDS-PAGE 12% des contacts entre les AMPs et les OMVs de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32. ....	99
Figure 25. Schéma des ultracentrifugations différentielles réalisées et activité protéase associée. ....	100
Figure 26. Culots issus d'une ultracentrifugation différentielle des ECPs de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 à 100.000g (A) et 150.000g (B) observés en microscopie électronique à transmission. ....	100
Figure 27. Activité protéase associée aux OMVs isolées à 100.000g (A) ou 150.000g (B) de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 sauvage (WT) et des mutants $\Delta ompU$ et $\Delta vsm$ . ....	101
Figure 28. Cytogrammes des OMVs (266µg) de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 marquées au SybrGreen I en tampon sodium phosphate pH7.3 pendant 15 min en chambre noire. ....	103
Figure 29. Cytotoxicité de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 vis à vis des hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i> après 30 minutes de contact <i>Vibrio</i> /hémocyte. ....	104
Figure 30. Contrôle des délétions par PCR. ....	161
Figure 31. Contrôle des délétions par séquençage. ....	166
Figure 32. Modèle de la survie intracellulaire de <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 dans les hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i> . ....	179



# **INTRODUCTION GENERALE**





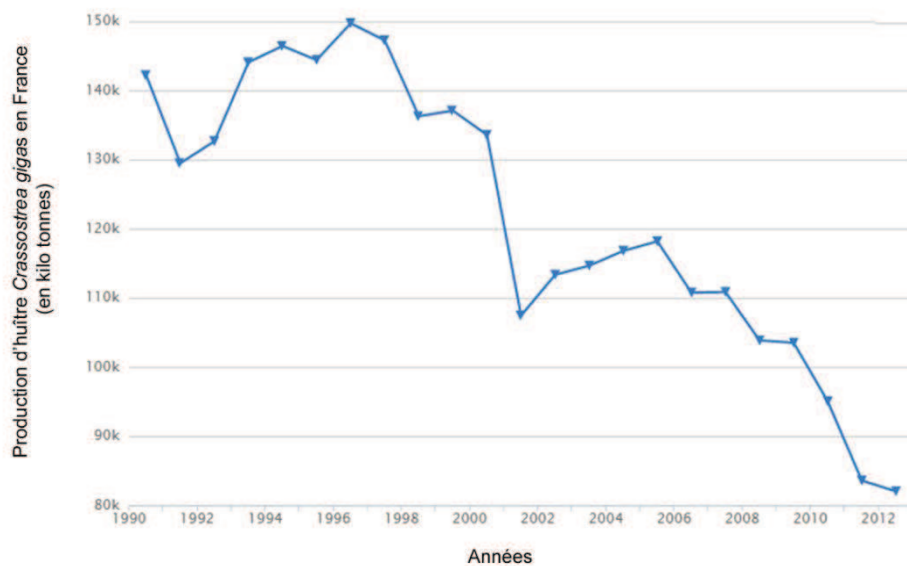
## INTRODUCTION GENERALE

L'ostréiculture occupe une place importante dans l'aquaculture marine mondiale avec une production annuelle d'huître s'élevant à 4,7 millions de tonnes en 2012 (FAO, 2012). En France, l'élevage de l'huître, *Crassostrea gigas*, est la principale activité aquacole avec des productions annuelles avoisinant les 82 000 tonnes en 2012 (Comité National de la Conchyliculture, 2012).

L'ostréiculture française a connu une succession de phases de développement, de pleines exploitations, alternant avec des périodes de crises, le plus souvent liées à la surexploitation du milieu naturel et/ou l'apparition de maladies. Ainsi, suite à l'insuffisance de production des gisements naturels d'huîtres plates *Ostrea edulis*, espèce endémique des côtes françaises, l'espèce *Crassostrea angulata* ou huître portugaise a été introduite en France à partir des années 1860. Cette espèce a toutefois été décimée, à la fin des années 1970, par un Iridovirus, responsable de la « maladie des branchies » (Comps and Duthoit, 1979). Pour relancer la production ostréicole française, l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* a donc été introduite au début des années 1970 à partir du Japon. Elle est aujourd'hui la principale espèce d'huître élevée dans le monde.

Depuis la dernière décennie, dans les écosystèmes marins côtiers, les élevages d'huîtres *C. gigas* subissent des épisodes de mortalité estivale affectant les huîtres juvéniles. Ces mortalités touchent de façon significative les productions françaises avec des pertes variables selon les années (Figure 1). Ces mortalités récurrentes ont pour conséquence d'importantes pertes économiques au sein de la filière ostréicole. Un programme de recherche national multidisciplinaire dénommé MOREST (MORTalités ESTivales) a donc été mis en place en 2005 pour identifier les causes de ces mortalités. Les conclusions de ce programme ont révélé que ces mortalités ont une étiologie multifactorielle impliquant les conditions environnementales, le statut physiologique et/ou génétique de l'huître et la présence de microorganismes pathogènes (Samain and McCombie, 2008). Depuis 2008, les phénomènes de mortalités estivales se sont intensifiés et apparaissent plus tôt dans l'année, dès le printemps, lorsque la température de l'eau atteint 16°C. Par ailleurs, l'origine infectieuse de ces mortalités récurrentes est aujourd'hui avérée (IFREMER, 2009). Un virus de type Herpès nommé OsHV1 est systématiquement retrouvé chez les huîtres moribondes (Saulnier et al., 2009; Saulnier et al., 2010) et un nouveau variant  $\mu$ var, apparu depuis 2008, pourrait contribuer à l'aggravation des mortalités (Segarra et al., 2010; Schikorski et al., 2011a; Schikorski et al., 2011b; Segarra et al., 2014). De plus, considérées comme faisant partie de la microflore naturelle de l'huître, les bactéries du genre *Vibrio* ont été associées à divers épisodes de mortalités. Les souches du clade

Splendidus sont systématiquement retrouvées sur les huîtres moribondes depuis 2008 (IFREMER, 2009) (Lacoste et al., 2001; Gay et al., 2004a; Gay et al., 2004b). Par ailleurs, des souches de *V. aestuarianus* ont pu être isolées (Labreuche et al., 2006b; Labreuche et al., 2006a; Garnier et al., 2008; Saulnier et al., 2009; Labreuche et al., 2010) et souvent lors de mortalités d'huîtres adultes. Le caractère infectieux de ces souches et leur virulence ont pu être démontrés expérimentalement (Waechter et al., 2002; Garnier et al., 2007; Saulnier et al., 2010).



**Figure 1. Production de l'espèce d'huître *Crassostrea gigas* en France.**  
D'après FAOSTAT (<http://data.fao.org/>)

Malgré les travaux consacrés à ce phénomène, on ignore encore à l'heure actuelle le poids relatif des agents pathogènes, de la génétique des huîtres à des forçages environnementaux dans l'expression de pathogénèse. Notamment, les bases cellulaires et moléculaires de ces maladies multifactorielles restent encore méconnues. De nombreuses avancées sur l'huître *C. gigas* ont permis de caractériser des mécanismes de reconnaissance et de contrôle des pathogènes et de peptides antimicrobiens. En revanche, les mécanismes employés par les *Vibrio* pathogènes pour coloniser et tuer l'huître restent encore peu étudiés.

Cette thèse est consacrée à l'étude cellulaire et moléculaire de l'interaction entre une souche de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (clade Splendidus) et les cellules immunitaires de l'huître, qu'elle envahit.

Alors que la capacité de *V. tasmaniensis* LGP32 à envahir les hémocytes a pu être bien caractérisée, nous ignorons à ce jour la nature des effecteurs moléculaires bactériens impliqués dans la virulence et la survie intracellulaire du *Vibrio*. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été, (1) de déterminer le rôle des sécrétions bactériennes dans la virulence du *Vibrio* par une approche protéomique et (2) d'identifier les effecteurs moléculaires impliqués dans la survie intracellulaire et la cytotoxicité du *Vibrio* par une approche transcriptomique. Les travaux exposés dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe « Réponse Immunitaire des Macroorganismes et Environnement » de l'UMR 5119 « Ecologie des Systèmes Marins Côtiers » (Université Montpellier 2, CNRS, IRD, Université Montpellier 1, Ifremer).

Le premier chapitre de ma thèse présente une revue bibliographique sur (1) le système immunitaire de l'huître et plus particulièrement la phagocytose, (2) les *Vibrio* pathogènes de l'huître et les mécanismes de virulence connus chez les *Vibrio* et (3) les mécanismes de résistance et d'échappement à la phagocytose chez les bactéries intracellulaires.

Le deuxième chapitre concerne les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse. La section A présente la caractérisation protéomique des vésicules de membrane externe (OMVs) du *Vibrio*, leur rôle dans la virulence et la résistance aux défenses de l'huître. La section B présente l'analyse transcriptomique du *Vibrio* intracellulaire et la mise en évidence de gènes impliqués dans la survie intraphagocytaire et la virulence de la bactérie.

Le troisième chapitre est une discussion générale qui propose des perspectives de recherche sur le rôle des des OMVs de *V. tamaniensis* LGP32 dans le processus infectieux et les mécanismes de résistance/d'échappement à la phagocytose chez les *Vibrio*.



## **CHAPITRE I**

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



# **CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## **I. L’HUITRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS***

### **I.1 LA BIOLOGIE DE L’HUITRE**

L’huître creuse *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve appartenant à la famille des *Ostreidae* (Lophotrochozoa, Mollusca, Bivalvia) dont la distribution mondiale va du Japon à l’Europe et l’Amérique. Les huîtres sont des animaux benthiques qui se nourrissent par filtration. Ils sont composés d’un corps mou comprimé latéralement et enfermé dans une coquille calcaire. La coquille est composée de deux valves articulées par un ligament charnière et reliée par un muscle adducteur. Les valves sont asymétriques et produites par le manteau, un organe recouvrant le corps interne de l’huître (Figure 2). Le manteau possède également une fonction sensorielle et peut induire la fermeture des valves en réponse à des changements environnementaux. Comme les autres bivalves, les huîtres sont acéphales et le système nerveux est composé de deux paires de cellules nerveuses reliées entre elles (une près de la bouche, l’autre sous le muscle adducteur).

Les huîtres possèdent deux paires de branchies localisées de chaque côté de leur corps. Elles sont utilisées pour la respiration et la filtration du phytoplancton, du zooplancton et des bactéries présents dans l’eau de mer. Au niveau dorsal antérieur, les palpes labiaux (deux paires) entourent la bouche afin que la nourriture soit directement ingérée. Le système digestif commence au niveau de la bouche, une fente en U inversée où commence directement l’œsophage. Ce court œsophage dorsoventral relie la bouche à l’estomac. Ce dernier est entouré par la glande digestive et contient un stylet cristallin assurant le broyage des aliments ingérés. L’intestin est relié au rectum qui se finit au niveau de l’anus (Kennedy et al., 1996).

A l’inverse des autres espèces de bivalves, les huîtres sont des organismes hermaphrodites successifs. La gonade est localisée au niveau de la masse viscérale entre la glande digestive et le manteau. Elle s’étend de l’œsophage à la cavité de péricardique, formant deux lobes qui entourent la glande digestive.

Les huîtres sont en contact permanent avec un milieu riche en microorganismes incluant des pathogènes et des commensaux. La présence naturelle de bactéries dans l’hémolymphe de bivalves sains est aujourd’hui avérée (Wegner et al., 2013; Lokmer and Mathias Wegner, 2014; Wendling et al., 2014). Cette microflore peut varier en fonction de la température, de la salinité et suite à une



infection. Certaines souches, isolées à partir de l'hémolymphe des huîtres, produisent des composés antimicrobiens (Defer et al., 2013). Ainsi, on peut supposer que cette microflore confère un bénéfice à l'hôte en jouant un rôle de bouclier microbien. De plus, l'huître est généralement habitée par une microflore naturelle pouvant constituer également une barrière contre l'établissement d'agents infectieux. En effet, des études ont démontré la capacité qu'a une microflore commensale intestinale à conférer à son hôte une protection contre des pathogènes en produisant des molécules antimicrobiennes, par compétition pour les nutriments ou par stimulation des défenses immunitaires (Stecher and Hardt, 2011; Kamada et al., 2012; Kamada et al., 2013). Chez l'huître, on retrouve des bactéries de l'hémolymphe capables de produire des peptides antimicrobiens (AMPs) actifs contre les *Vibrio* pathogènes de l'huître incluant *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. tubiashii* (Desriac et al., 2014).

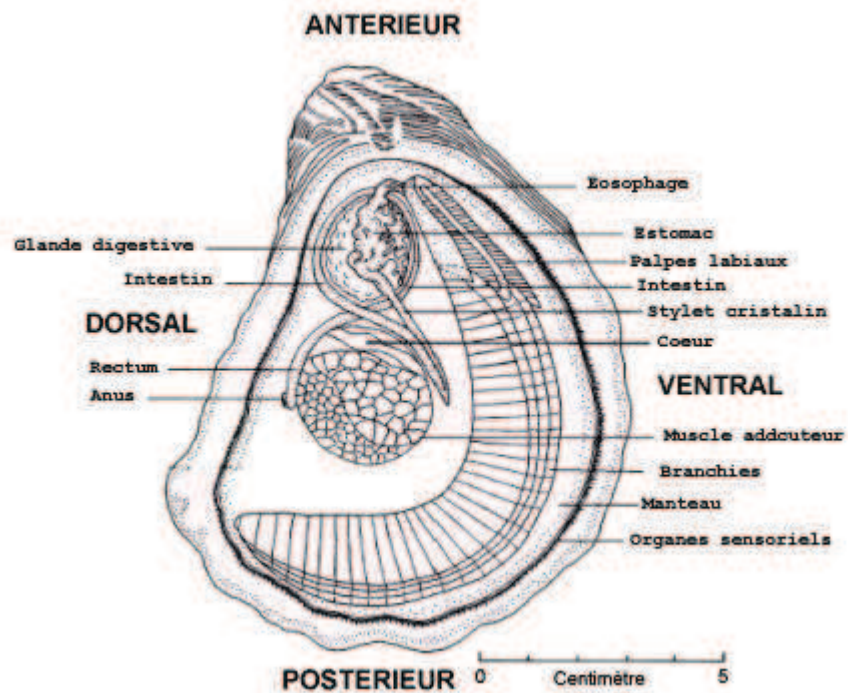


Figure 2. Anatomie de l'huître *C. gigas*.  
Schéma de la vue intérieure de la valve gauche de l'huître adulte. D'après Kennedy, Newell et al. 1996.

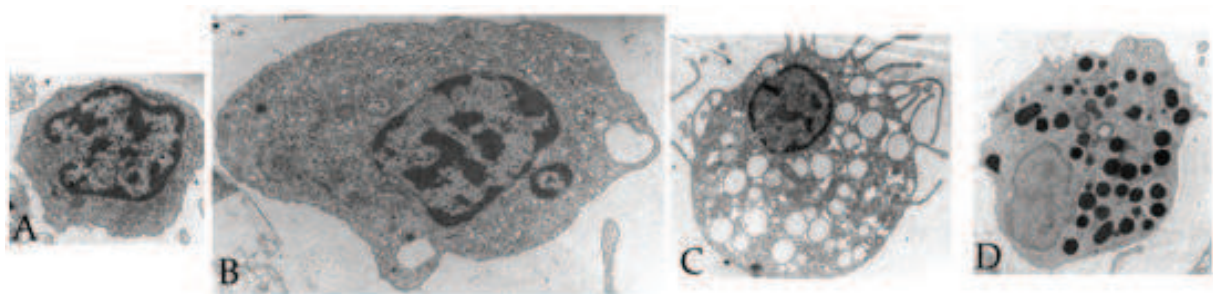
## I.2 L'HEMOLYMPHE ET LES HEMOCYTES

Les huîtres possèdent un système circulatoire semi-ouvert dans lequel circule l'hémolymphe. Ce système est composé du cœur (qui comporte deux paires d'oreillettes et un ventricule), des artères et des veines. L'hémolymphe des huîtres est dépourvue de pigments et est composée de plasma et de cellules circulantes, connues sous le nom d'hémocytes. L'hémolymphe permet le transport d'oxygène, de nutriments et de déchets métaboliques (Bachère et al., 2004). En général, les bivalves sont dépourvus de protéines respiratoires et il est admis que l'oxygène est transporté sous forme dissoute dans l'hémolymphe.

Les hémocytes sont les cellules immunocompétentes de l'huître. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la réparation de lésions ou de la coquille, le transport et la digestion de nutriments et plus particulièrement la réponse immunitaire (Sminia and van der Knaap, 1987; Cheng, 1996). Les hémocytes jouent un rôle dans les mécanismes de reconnaissance et possèdent des capacités de chimiotactisme et de phagocytose. Ils sont impliqués dans les réactions microbicides par la production d'enzymes hydrolytiques, d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) et de protéines/peptides antimicrobiens. Certaines populations d'hémocytes sont considérées comme des « phagocytes professionnels » qui sont capables de phagocyter et de détruire des agents microbiens. Le système circulatoire de l'huître est semi-ouvert, les hémocytes ne sont donc pas confinés aux vaisseaux. Ils peuvent accéder à de nombreux tissus par diapédèse (Galtsoff, 1964; Cheng, 1996; Schmitt et al., 2012a). De plus, les hémocytes infiltrés sont présents dans toutes les cavités et les tissus de l'huître où ils peuvent jouer un rôle dans la réponse immunitaire.

La classification des hémocytes de l'huître a fait l'objet de nombreuses études depuis le début des années 70 mais une classification n'a pas pu être clairement établie. Sur différents critères (morphologie, structures internes, signatures physico-chimiques, fonctions biologiques), les hémocytes ont été classés en deux catégories : les cellules granuleuses et les agranuleuses (Cheng, 1981; Bachère et al., 1988; Ashton-Alcox and Ford, 1998; Hine, 1999; Aladaileh et al., 2007). Les **cellules granuleuses** correspondent à un unique groupe composé de granulocytes basophiles et éosinophiles (Bachère et al., 1988; Hine, 1999). Les **cellules agranuleuses** sont hétérogènes et comprennent trois « types cellulaires » : les cellules « **blast-like** », les cellules « **macrophage-like** » et les **hyalinocytes**. Ces cellules agranuleuses se distinguent de par leur apparence et leurs structures internes caractérisées par l'absence ou la présence de quelques granules cytoplasmiques et de nombreuses vacuoles (Hine, 1999).

Bachère et coll. ont émis l'hypothèse que ces cellules non granuleuses correspondaient à la même lignée cellulaire observée à différentes phases de maturation et d'activité (Figure 3) (Bachère et al., 2004). Divers sites d'hématopoïèse ont été proposés chez l'huître. Cheng (1981) a supposé que les hémocytes provenaient de la différenciation des cellules des tissus conjonctifs. Selon Tirapé (2007), les cellules hématopoïétiques pourraient provenir des cellules endothéliales des vaisseaux de l'huître. Des travaux récents suggèrent que les hémocytes pourraient être produits à la base des branchies (Jemaa et al., 2014). En effet, grâce à des marqueurs cellulaires spécifiques de cellules précurseurs (Sox2) et des hémocytes (EcSOD), les auteurs de ces travaux ont identifié une population de cellules adultes somatiques précurseurs qui se différencieraient en hémocytes dans les branchies.



**Figure 3.** Les hémocytes de l'huître *C. gigas*.

Les hémocytes sont classés en 3 populations : (A) Cellules « blast-like » (B) hyalinocytes (C) granulocytes (C and D). Les granulocytes sont divisés en sous-groupes en fonction du contenu des granules, soit clairs aux électrons (C) ou denses aux électrons (D). Microscopie électronique à transmission x 15000. D'après Schmitt et al., 2012a.

### **I.3 LES REACTIONS IMMUNITAIRES DE L'HUITRE**

La coquille, les tissus épithéliaux et le mucus qui recouvrent entièrement le corps de l'huître sont considérés comme la première ligne de défense de l'huître contre les infections (Glinski and Jarosz, 1997).

Comme les autres invertébrés, l'huître possède également un système de défense basé sur l'immunité innée. L'immunité des huîtres implique non seulement des réactions cellulaires mais également de nombreux effecteurs moléculaires de la réponse immunitaire, produits par les hémocytes et les tissus.

Les principaux éléments de la défense immunitaire de l'huître sont (1) la reconnaissance des microorganismes par des composés solubles ou des récepteurs/protéines cellulaires, (2) la signalisation et l'activation des hémocytes, (3) les réactions de défense cellulaire et la production d'effecteurs moléculaires impliqués dans la défense de l'hôte (Schmitt et al., 2012a) (Figure 4).

Grâce aux avancées récentes sur la réponse immunitaire de l'huître réalisées par le développement d'approche génomique, on connaît aujourd'hui un certain nombre de récepteurs, d'éléments de signalisation et d'effecteurs impliqués dans ces mécanismes (Gueguen et al., 2003; Tanguy et al., 2004; Fleury et al., 2009; Lang et al., 2009; Roberts et al., 2009b; Taris et al., 2009; de Lorgeril et al., 2011b). Par ailleurs en 2012, le génome de l'huître *C. gigas* a été séquencé et assemblé dans le cadre d'une collaboration entre la Chine et les Etats-Unis (Zhang et al., 2012).

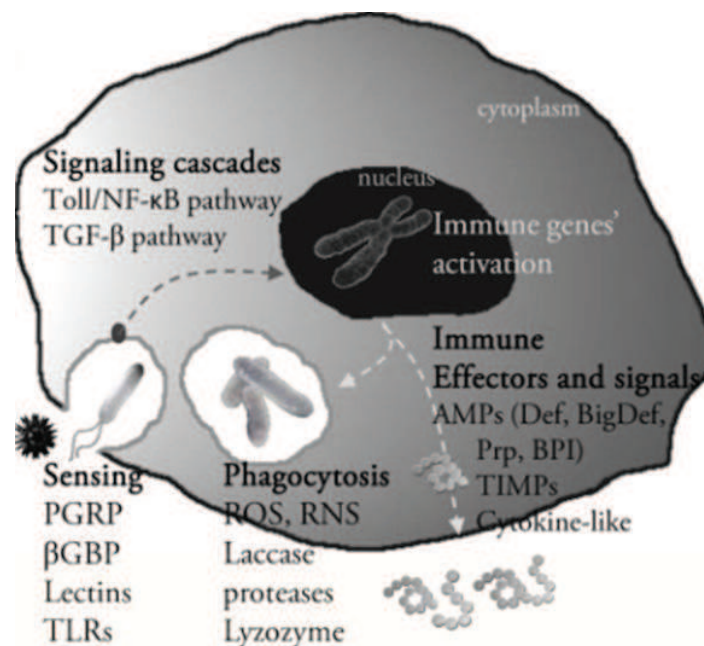


Figure 4. Mécanisme de défense de l'hémocyte.

Les hémocytes sécrètent des moléculaires et possèdent des récepteurs cellulaires (PGRP, βGBP, lectines, TLRs, SOD...) qui détectent la présence de pathogènes. Cette reconnaissance entraîne l'activation de séries de réactions immunitaires comprenant la phagocytose (production de ROS/ RNS, de protéases et de lysosymes), l'activation des voies de signalisation (voies NF-κB et TGF-β), la production d'effecteurs immunitaires (protéines et peptides antimicrobiens, inhibiteurs de protéases) et de cytokines. D'après Schmitt et al., 2012a.

### I.3.1 Les mécanismes de la reconnaissance

La réponse immunitaire de l'huître est initiée par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes appelés **PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)** (Medzhitov and Janeway, 2002; Janeway et al., 2005) ou à des signaux de danger dits **DAMPs (damage-associated molecular patterns)** (Matzinger, 2002; Janeway et al., 2005; Rubartelli and Lotze, 2007) qui sont des molécules partagées et conservées par les microorganismes et les composants des cellules de l'hôte qui se trouvent exposés lors d'une blessure et/ou d'une injection.

Les **PAMPs** les plus connus sont le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane (PG) des bactéries à Gram positif et négatif, les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries à Gram positif, les  $\beta$ -1,3-glucanes des champignons et les ARN double brin des virus répliatifs (Mogensen, 2009) (Figure 5). Cependant ces molécules ne sont pas spécifiques des pathogènes et sont partagées par différents organismes incluant des bactéries symbiotiques ou mutualistes (Nyholm and Graf, 2012). Ainsi, le terme plus général de motifs de reconnaissance présents à la surface des micro-organismes (MAMPs - microbial-associated molecular patterns) a été introduit en 2004 (Koropatnick et al., 2004).

Le système immunitaire répond également à des signaux intracellulaires qui sont déclenchés par des molécules endogènes sécrétées par des tissus endommagés, les **DAMPs**. Parmi les DAMPs, on peut citer les protéines de chocs thermiques (HSP), les « High mobility group box 1 (HMGB1)» et des protéines qui dérivent de la matrice extracellulaire. Parmi les DAMPs non protéiques, on peut citer l'ATP, l'acide urique, le sulfate d'héparine et l'ADN (Matzinger, 2002). Récemment, une CgHMGB1 a été identifiée et caractérisée chez *C. gigas* (Li et al., 2013a).

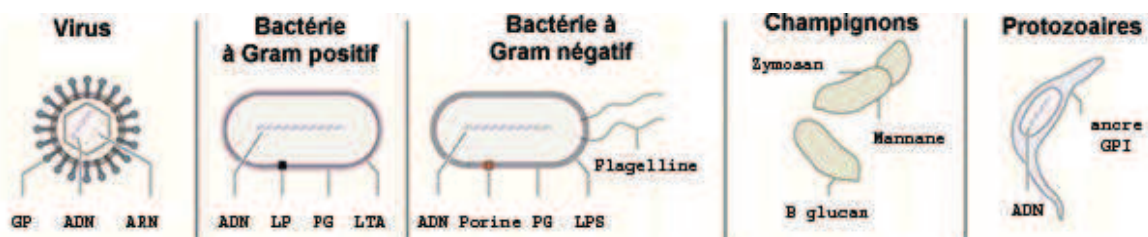


Figure 5. PAMPs de différentes classes de pathogènes.

Les virus, les bactéries à Gram positif et négatif, les champignons et les protozoaires présentent une grande variété de PAMPs, dont certains sont partagés entre les différentes classes de pathogènes. La majorité des PAMPs sont les acides nucléiques (ADN, ARNdb, ARNsb, et l'ARN 5'-triphosphate) mais aussi les glycoprotéines (GP), les lipoprotéines (LP) et composants membranaires (peptidoglycanes [PG], les acides lipoteichoïques [LTA], les lipopolysaccharides [LPS], et les glycosylphosphatidylinositols [ancre GPI]). D'après Mogensen, 2009.

La reconnaissance des éléments étrangers se fait soit par des **protéines solubles de l'hôte** (PRPs - pattern recognition proteins), soit par des **récepteurs associés aux membranes cellulaires** (PRRs - pattern recognition receptors). Chaque PRPs et PRRs peut se lier spécifiquement

Parmi, les PRRs et PRPs identifiés et caractérisés chez l'huître *C. gigas*, on retrouve des **protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP)** (Itoh and Takahashi, 2008, 2009; Zhang et al., 2013), des **protéines de liaison aux  $\beta$ -1,3-glucanes ( $\beta$ GBP)** des champignons (Tanguy et al., 2004;

Itoh et al., 2009) et des **lectines** (gigalines, ficolines, galectines et lectines de type C) (Olafsen et al., 1992; Gueguen et al., 2003; Yamaura et al., 2008; Roberts et al., 2009b; de Lorgeril et al., 2011b).

On retrouve également parmi les PRRs potentiels de l'huître des **récepteurs de type toll (TLRs)** (Zhang et al., 2011b; Zhang et al., 2013). Les auteurs ont montré que ces TLR partageaient la même organisation structurale, comprenant un peptide signal, un domaine transmembranaire, un domaine TIR et un domaine riche en leucine (LRR). Ces TLRs sont localisés au niveau de la membrane plasmique et des endosomes tardifs (Zhang et al., 2013). Néanmoins, leurs ligands n'ont pas été caractérisés chez l'huître.

Il faut également citer parmi les PRRs la protéine antimicrobienne **Cg-BPI** (bactericidal/permeability-increasing protein) et la protéine majoritaire du plasma **Cg-EcSOD** qui est une superoxyde dismutase extracellulaire à cuivre/zinc, ayant toutes deux des propriétés de liaison au LPS (Gonzalez et al., 2005; Gonzalez et al., 2007).

Enfin, une  **$\beta$ -intégrine ( $\beta_{CGH}$ )** a été identifiée dans différentes sous-populations d'hémocytes. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire jouant des rôles importants dans la réponse immunitaire et une variété d'autres processus physiologiques (Barczyk et al., 2010). Terahara (2006) ont proposé que la phagocytose des hyalinocytes est dépendante de l'intégrine alors que la phagocytose des granulocytes impliquerait d'autres récepteurs fonctionnels. De plus, il a été démontré que la  $\beta$ -intégrine des huîtres reconnaissait la protéine majoritaire du plasma (Cg-EcSOD) via son motif RGD (Arg-Gly-Asp) (Gonzalez et al., 2005; Duperthuy et al., 2011).

### **I.3.2 Les voies de signalisation**

La reconnaissance des microorganismes ou de leurs signaux par les PRRs/PRPs permet l'activation des voies de signalisation cellulaires. Ces voies induisent l'expression et la production de médiateurs de l'immunité (molécules de signalisation et effecteurs) pour aboutir à l'élimination des pathogènes ou des cellules infectées. De nombreuses similitudes ont été mises en évidence entre les voies de signalisation existantes chez les invertébrés et les vertébrés pour activer les mécanismes de la réponse innée.

Chez l'huître *C. gigas*, différentes voies ont pu être caractérisées et impliquées dans la réponse antimicrobienne.

En particulier, une voie emblématique de la réponse immunitaire a été mise en évidence chez l'huître, la **voie du facteur de transcription Rel/NF- $\kappa$ B** jouant un rôle clé à de nombreux niveaux

de la réponse immunitaire comme largement montré chez les mammifères et la drosophile (Medzhitov and Janeway, 1998; Hoffmann et al., 1999).

Des éléments conservés de cette voie ont été mis en évidence chez de nombreux organismes invertébrés, des plus évolués (deutérostomiens) aux plus primitifs (diploblastiques telles que les éponges ou unicellulaires telle que l'amibe) (Fallon et al., 2001; Staskawicz et al., 2001; Azumi et al., 2003; Wiens et al., 2005; Hibino et al., 2006; Chen et al., 2007a; Oshiumi et al., 2008). L'huître creuse reste le lophotrochozoaire le plus étudié concernant la voie NF- $\kappa$ B dont plusieurs éléments ont fait l'objet d'analyses fonctionnelles ayant montré leur capacité à compléter des voies hétérologues (Escoubas et al., 1999; Gueguen et al., 2003; Montagnani et al., 2004; Montagnani et al., 2008; Roberts et al., 2009a; de Lorgeril et al., 2011a; Zhang et al., 2011c). Différents récepteurs susceptibles d'être impliqués dans l'activation de la voie ont également été décrits chez *C. gigas* : différents TLRs (Toll-like receptors) (de Lorgeril et al., 2011a; Zhang et al., 2011b; Zhang et al., 2013); mais aussi deux TNF-Rs (tumor necrosis factor receptors) (Sun et al., 2014) et un homologue de l'IL1-R dans le génome de l'huître (C. Montagnani, communication personnelle). Le séquençage récent du génome entier de l'huître a aujourd'hui permis de mettre en évidence l'existence d'une vingtaine de composants de cette voie (Zhang et al., 2012) (Figure 6). Enfin, bien que cette voie soit principalement impliquée dans l'immunité, elle peut intervenir dans d'autres processus physiologiques (Hayden and Ghosh, 2008). Chez l'huître *C. gigas*, *Cg-Rel*, *Cg-I $\kappa$ B* et *Cg-MyD88*, et les TLRs sont impliqués dans la réponse antimicrobienne (Tirapé et al., 2007; Zhang et al., 2011c; Green and Montagnani, 2013; Zhang et al., 2013). L'activation de ces voies de signalisation intracellulaire entraîne la production de nombreux effecteurs de la réponse immunitaire, incluant des cytokines et des facteurs de transcription. Chez *C. gigas*, on retrouve le facteur de nécrose tumorale *Cg-TNF1*, des interleukines IL-17 régulées en réponse à l'infection (Roberts et al., 2008; Li et al., 2014; Sun et al., 2014).

D'autres voies de signalisation cellulaires impliquées dans l'immunité ont également pu être identifiées chez l'huître. Ainsi, des éléments de la **voie du TGF- $\beta$**  (Transforming growth factor beta) ont été identifiés chez *C. gigas*. On retrouve ainsi un récepteur de l'activine/BMP de type I (BMP-bone morphogetic proteins) dont *Cg-BMPRI* et *Cg-ALR1*, un récepteur de l'activine de type II, 3 récepteurs de la sous-famille de type I et un transducteur de signal Smad (Lelong et al., 2000, 2001; Herpin et al., 2002; Herpin et al., 2004; Herpin et al., 2005; Herpin et al., 2007; Lelong et al., 2007; Fleury et al., 2008; Le Quere et al., 2009; Corporeau et al., 2011). De manière intéressante, le gène codant le facteur de croissance- $\beta$  (*Cg-TGF- $\beta$* ) semble être surexprimé en réponse à des *Vibrio*, suggérant un possible rôle de cette voie dans la réponse antibactérienne.

Récemment, Montagnani et coll. ont exploré la réponse antivirale chez l'huître et ont montré l'implication d'éléments homologues à la **voie JAK/STAT** et ont soulevé l'hypothèse de l'existence **d'une voie de type IFN (Interferon)**, méconnue chez les invertébrés (Green and Montagnani, 2013; Green et al., 2014a).

Enfin, un facteur de transcription LITAF (Lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor) impliqué dans une voie encore inconnue, a été identifié et semble fortement induit dans les hémocytes suite à une infection microbienne (Park et al., 2008).

Par ailleurs, des voies d'activation des mécanismes cellulaires de mort cellulaire, impliquées dans l'élimination de cellules infectées ont été identifiées (mécanismes d'apoptose et d'autophagie) (de Lorgeril et al., 2011a). La voie de l'apoptose est notamment bien décrite et conservée chez *C. gigas* (Zhang et al., 2011a).

Ainsi, de nombreuses données s'accumulent aujourd'hui sur les mécanismes de signalisation chez *C. gigas*, mettant en évidence la conservation, la complexité et la grande diversité des mécanismes moléculaires sous-jacents à la réponse antimicrobienne chez ces organismes (Figure 6).

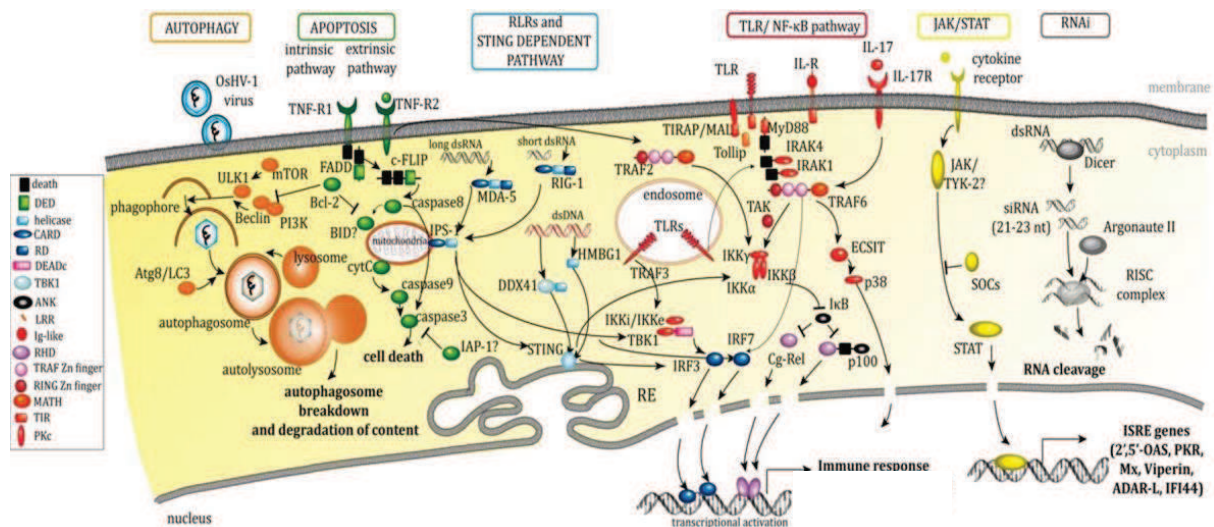


Figure 6. Représentation des voies conservées chez l'huître creuse *C. gigas*.

Ce schéma a été construit sur la base de l'identification de séquences conservées au sein du génome de l'huître. Les domaines caractéristiques des protéines sont indiqués (TIR, Toll/IL1 receptor; Ig, immunoglobulin; DD, death domain; LRR, leucine rich repeat; TM, transmembrane; PKc, protein kinase; RHD, rel homology domain; IPT, immunoglobulin-like fold, plexins, transcription factors; RING, RING-finger (really interesting new gene) domain; zf-TRAF, TRAF type zinc finger; MAT, meprin and TRAF-C homology domain; UBL-TBK1\_like, ubiquitin-like domain of human Tbk1 and similar proteins). Extrait de Montagnani, 2013.



### I.3.3 La phagocytose

La reconnaissance des microorganismes entraîne l'activation des hémocytes. Ces derniers effectuent de nombreuses réactions immunitaires, incluant des réponses cellulaires (phagocytose, encapsulation, infiltration) et la production de nombreuses molécules effectrices impliquées dans la défense de l'hôte (espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, des enzymes lysosomiales et des peptides antimicrobiens). Les hémocytes circulants sont capables de migrer de l'hémolymphe vers les tissus conjonctifs et sont recrutés au site d'infection pour une réponse locale (Cochennec-Laureau et al., 2003). D'une manière générale, lors du processus de phagocytose, l'agent étranger est internalisé dans un phagosome qui fusionne ensuite avec les granules cytoplasmiques (incluant les lysosomes). Après la fusion, un arsenal de composants microbicides (enzymes hydrolytiques, espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), peptides et protéines antimicrobiennes) sont relargués dans la phagosome afin de neutraliser/dégrader les particules phagocytées. L'existence de ces effecteurs cellulaires et moléculaires a été montrée chez l'huître. Lorsque l'huître est envahie par de plus gros organismes comme des nématodes ou des champignons, les hémocytes forment des agrégats autour des parasites pour les immobiliser (Schmitt et al., 2012a).

La phagocytose est un mécanisme important de l'immunité innée à médiation cellulaire pour le contrôle des pathogènes, qui est connue depuis de nombreuses années (Prix Nobel Elie Metchnikov 1908). Dans le règne animal, ce mécanisme d'élimination des particules de petites tailles (quelques microns de diamètres) est conservé des protozoaires hétérotrophes, comme les amibes, jusqu'aux métazoaires supérieurs, comme l'homme. Chez ce dernier, ce processus est assuré par les phagocytes professionnels : macrophages, les cellules dendritiques immatures et les polynucléaires neutrophiles (Flannagan et al., 2009).

La phagocytose se déroule en trois étapes : la **reconnaissance** des particules étrangères, l'**adhésion** (ou l'attachement) qui est l'étape au cours de laquelle la membrane de la cellule phagocytaire adhère à la particule qu'elle va ingérer, l'**ingestion** où les particules étrangères sont entourées par des pseudopodes pour ensuite former une vacuole intracellulaire : le phagosome; et enfin la **dégradation** du matériel ingéré consécutive à la fusion du phagosome avec les lysosomes constituant le phagolysosome.

La reconnaissance et l'attachement aux microorganismes peut être directe, via les PRRs, ou indirecte, via le recrutement d'opsonines. Après cette reconnaissance, l'élément étranger est internalisé dans la cellule par des remaniements du cytosquelette d'actine. Ce processus fait intervenir des phosphoinositides (PIP2 et P(1)3) et des petites Rho GTPases. Chez *C. gigas*, il a été

montré que la phagocytose des hyalinocytes était dépendante de l'intégrine (Terahara et al., 2006). Il a récemment été montré que le pathogène de l'huître *V. tasmaniensis* LGP32 utilisait les  $\beta$ -intégrines des hémocytes de l'huître pour les envahir (Duperthuy et al., 2011).

Suite à cette internalisation, le corps étranger se retrouve localisé dans une vacuole de phagocytose appelé phagosome. La maturation du phagosome s'effectue par des échanges séquentiels avec d'autres compartiments vésiculaires comme les endosomes précoces, les endosomes tardifs et les lysosomes aboutissant *in fine* à la formation du phagolysosome permettant ainsi de tuer et dégrader la bactérie phagocytée (Figure 7).

La maturation du phagosome va ainsi permettre à la vacuole d'acquérir des fonctions importantes pour son activité microbicide telle que l'acidification du milieu intra-vacuolaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), l'accumulation de métaux tels que le cuivre et le zinc, et l'apport d'activité enzymatiques et de peptides antimicrobiens (Flannagan et al., 2012).

Le rôle crucial de la phagocytose dans la réponse immunitaire de l'huître a été initialement mis en évidence *in vitro*. En effet, la phagocytose de particules de zymosan (extrait membranaire de levure) induit un fort burst oxydatif, correspondant à la production massive de ROS, et une production d'enzymes lysosomiales par les hémocytes (Bachère et al., 1991; Bachère et al., 2004; Poirier et al., 2014). Chez l'huître, seuls les granulocytes et les hyalinocytes sont considérés comme des « phagocytes professionnels ». Les granulocytes auraient une activité de phagocytose plus importante que les hyalinocytes contre les bactéries, les levures mais pas contre les billes de latex (Takahashi and Mori, 2000).

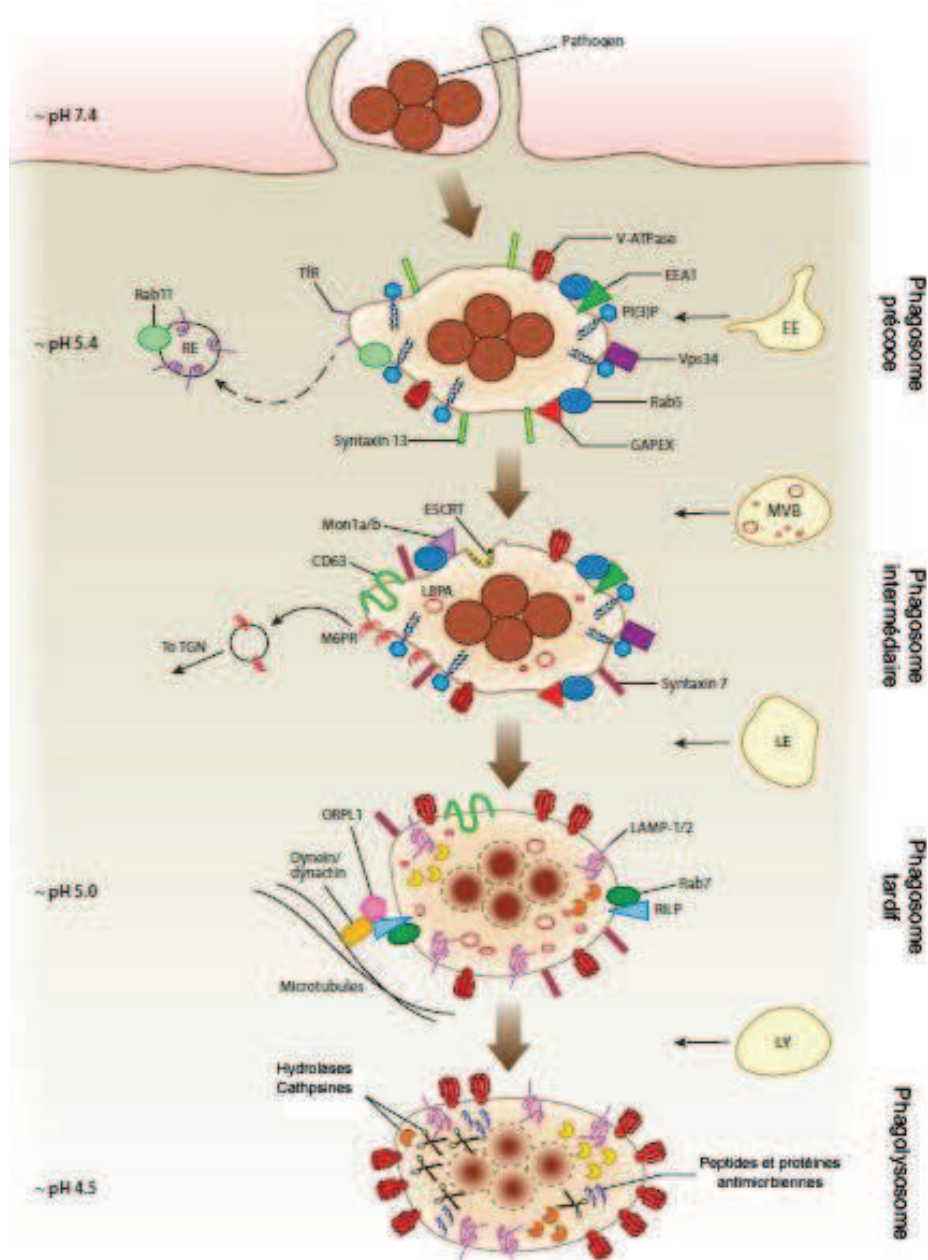


Figure 7. Maturation du phagosome.

Après l'internalisation de particules étrangères, la phagosome subit de nombreuses transformations créant ainsi un environnement microbicide. La maturation du phagosome résulte d'une interaction séquentielle avec les sous-compartiments de la voie d'endocytose. Parmi les stades de maturation du phagosome, on distingue en fonction de leurs propriétés biochimiques : le phagosome précoce, le phagosome intermédiaire, le phagosome tardif et la phagolysosome. Au cours de la maturation, des ATPases situées à la membrane des vésicules (V-ATPases) délivrent des ions  $H^+$  dans le phagosome entraînant ainsi une acidification. Le phagosome s'enrichit également en hydrolases et en protéines anti-microbiennes permettant la dégradation de l'élément étranger. EE : early endosomal, MVB : multivesicular body, LE : late endosome ; LY : lysosome. D'après Flannagan et al., 2012.

### **1.3.3.1 L'acidification du phagosome**

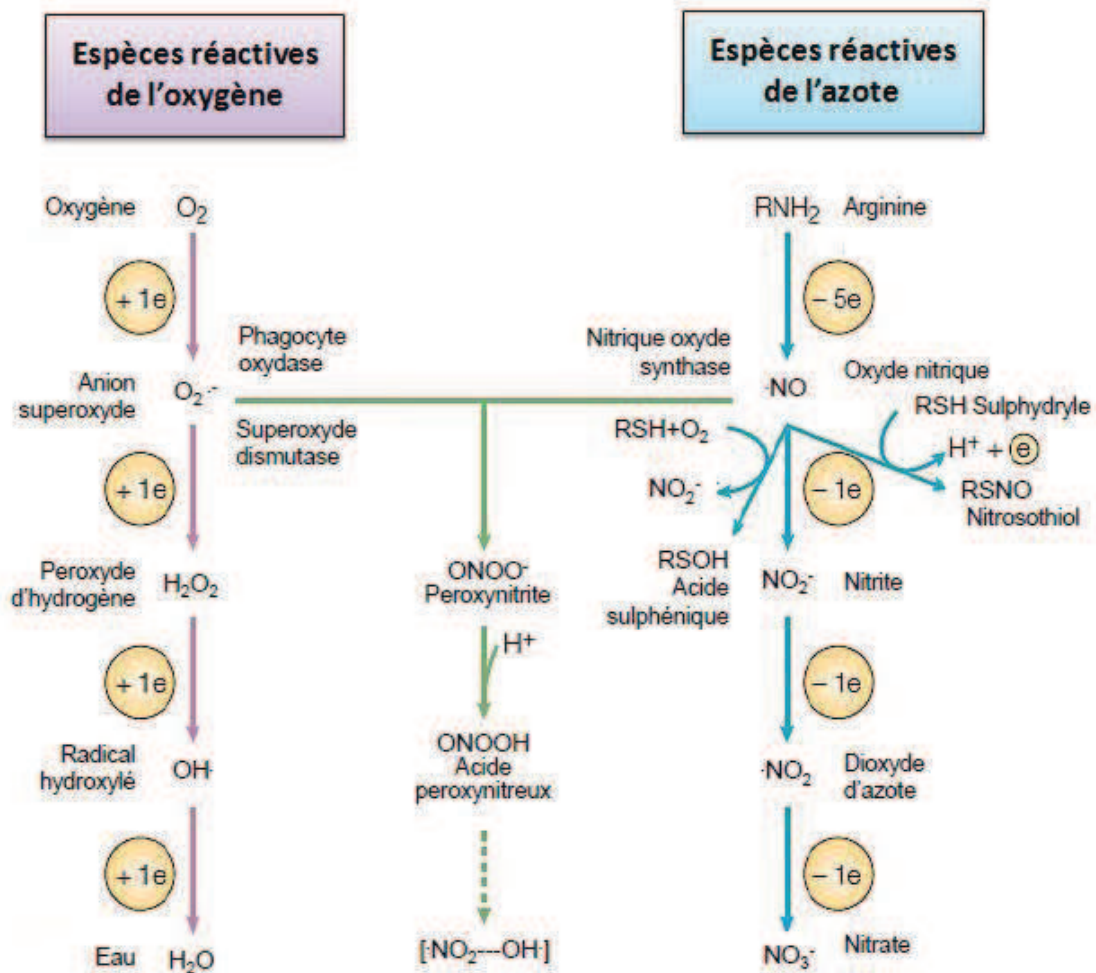
L'acidification de la vacuole de phagocytose est un élément important de la maturation du phagosome. Chez les mammifères, le pH du phagosome précoce des macrophages est d'environ 5,4. Une fois la maturation terminée le pH du phagolysosome est inférieur à 4,5. Cette acidification est due à l'accumulation de protons  $H^+$  vers le lumen phagosomal grâce l'action de V-ATPases (les ATPases vésiculaires) dont la quantité s'accroît au niveau de la membrane phagosomale au cours de la maturation (Sun-Wada et al., 2009). Cette étape requiert l'hydrolyse de l'ATP cytosolique pour assurer un transport actif de proton (Lukacs et al., 1991; Beyenbach and Wieczorek, 2006). L'acidification crée un environnement hostile à la croissance de la bactérie internalisée et permet aussi le bon fonctionnement de nombreuses enzymes hydrolytiques possédant un pH optimum acide telles que les cathepsines D et L (Huynh and Grinstein, 2007). Les protons intraphagosomaux participent également à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), composés microbicides du phagosome (Winterbourn, 2008; DeCoursey, 2010). L'acidification du phagosome n'est pas une conséquence de la formation du phagolysosome mais semble être une partie intégrante du processus de maturation qui contrôle le trafic membranaire (Gordon et al., 1980; van Deurs et al., 1996). De manière intéressante, une « ATPase  $H^+$  transporting lysosomal protein » a été identifiée chez *C. gigas* (Huvet et al., 2004) et est surexprimée chez les huîtres survivant à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al., 2011b).

Chez l'huître *C. virginica*, il a été montré que la phagocytose de particules de zymosan entraînait une acidification du phagosome jusqu'à un pH de 3,9 (Beaven and Paynter, 1999). Chez l'huître *S. glomerata*, la présence du parasite *Marteilia sydneyi* entraîne également une diminution du pH du phagosome (Kuchel et al., 2010).

### **1.3.3.2 Production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote**

Une part importante de l'activité microbicide des phagocytes s'effectue via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), qui peuvent agir de manière extracellulaire mais surtout au sein du phagosome. Ces molécules peuvent oxyder les lipides, les glucides ou les acides nucléiques, en altérer la conformation et donc la fonction (Kohen and Nyska, 2002). A terme, l'accumulation de ces molécules est fatale pour le pathogène. Une activité enzymatique clé dans la production de ROS est celle du complexe de la NADPH oxydase qui s'assemble au niveau de la membrane plasmique et de la membrane du phagosome suite à l'activation de la cellule. Ce complexe catalyse l'oxydation du NADPH du cytosol en  $NADP^+$  et forme ainsi l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et le peroxynitrite (ONOO), radicaux hautement réactifs, qui s'accumulent

dans le lumen du phagosome. Une superoxyde dismutase (SOD) présente dans le phagosome permet alors la synthèse du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), moins toxique, à partir de l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et de protons  $H^+$ . Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est à son tour converti en acide hypochloreux (HOCl) en présence d'ion  $Cl^-$  sous l'action de la myéloperoxydase (MPO) (Imlay and Linn, 1988; Fang, 2004).



**Figure 8. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mammifères.**  
Adapté de Fang, 2004.

Comme les ROS, les espèces réactives de l'azote (RNS) contribuent également à l'élimination des pathogènes. La formation d'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) dans les phagocytes est catalysée par une oxyde nitrique synthase (NOS). Comme l'ion superoxyde, le  $NO\cdot$  est synthétisé à la membrane du phagososome. L'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) est très toxique réagissant, rapidement avec les ROS pour former de nombreuses espèces réactives de l'azote tels que le nitrite ( $NO_2^-$ ) ou le nitrate ( $NO_3^-$ ) (Figure 8). D'après Fang et al. (2004), chacune de ces espèces a un mécanisme d'action, une localisation et une activité biologique différente.

Des études sur *E. coli* ont montré qu'à de faibles concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le mécanisme majeur des ROS était des dommages à l'ADN (Imlay and Linn, 1986, 1988). La peroxydation des lipides bactériens a également été observée après phagocytose par des neutrophiles mais aucune corrélation avec la mort des bactéries n'a été montrée (Shohet et al., 1974). L'oxyde nitrique peut également inhiber la respiration bactérienne (Pacelli et al., 1995).

La production de ROS a été reportée chez les hémocytes d'huîtres. Chez les hémocytes non stimulés, la production de ROS ne provient pas de la NADPH-oxidase cytoplasmique, de l'oxyde nitrique synthase ou de la myéloperoxydase, mais de la mitochondrie (Donaghy et al., 2012) (Figure 9). Immédiatement après la phagocytose de particules de zymozan, des espèces réactives de l'oxygène et d'azote (ROS/RNS) sont produites (Delaporte et al., 2003; Lambert et al., 2003; Lambert et al., 2007). Pour s'en prémunir, les pathogènes peuvent réduire la production de ROS par les hémocytes de l'huître comme montré pour différentes espèces de *Vibrio* (Labreuche et al., 2006b; Labreuche et al., 2006a; Duperthuy et al., 2011).

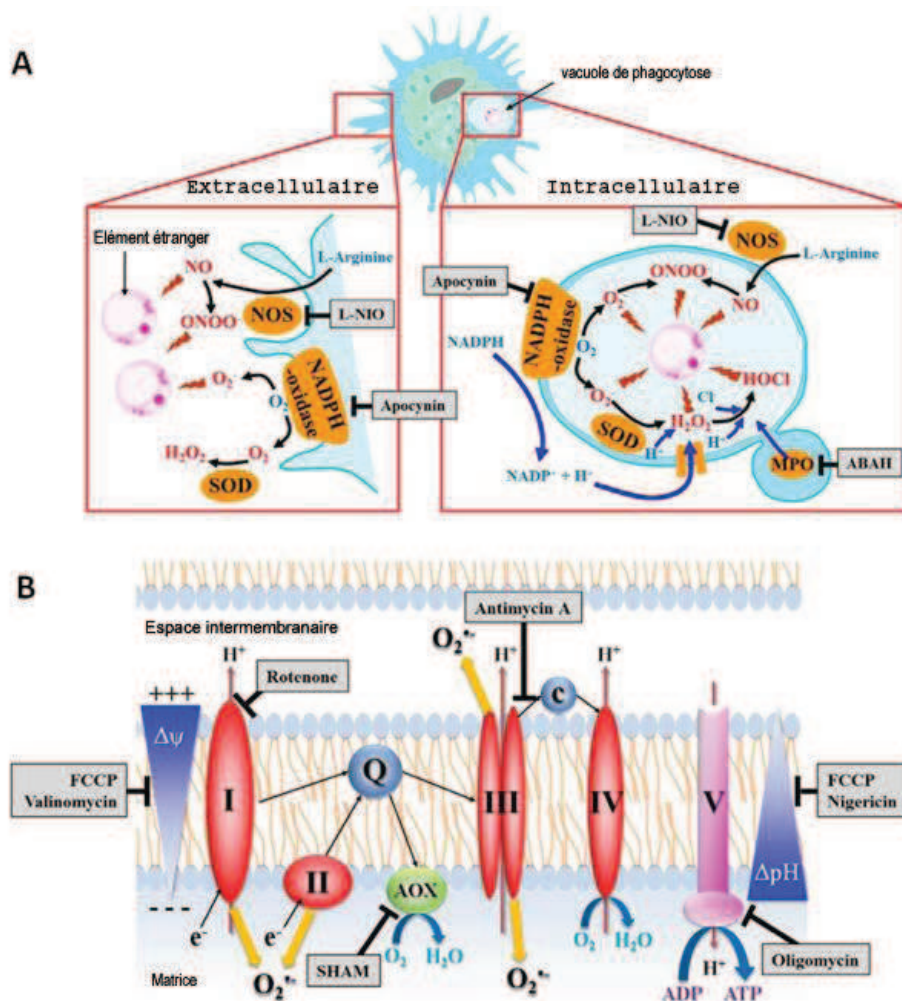


Figure 9. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites chez les hémocytes de bivalves.

A. Production des ROS/RNS à la membrane plasmique (droite) et à l'intérieur du phagososome (gauche). B. Chaîne respiratoire mitochondriale hypothétique. Les inhibiteurs des molécules cibles sont indiqués en gris. SOD : superoxyde dismutase, NOS : oxyde nitrique synthase, MPO : myeloperoxydase. D'après Donaghy et al., 2012.

La production de molécules toxiques comme les ROS et RNS peut aussi entraîner des dommages tissulaires chez l'hôte. C'est pourquoi les organismes possèdent des systèmes de défense antioxydants efficaces comme la production d'enzymes antioxydantes telle que des superoxyde dismutases (SOD), des peroxydases (catalases et glutathione peroxydases), des peroxyredoxines et des glutathione S- transférases (Vertuani et al., 2004). Les activités antioxydantes de l'hémolymphe des huîtres ont été largement décrites dans la littérature et des homologues d'enzymes antioxydantes ont été identifiées (Gonzalez et al., 2005; Jo et al., 2008; Park et al., 2009). La majorité des études sur les enzymes antioxydantes chez l'huître portent sur les SOD. Ces protéines peuvent être impliquées dans la réponse anti-oxydante, la réparation des lésions mais aussi la séquestration

du fer en excès (Scotti et al., 2007). Il faut également mentionner que la respiration mitochondriale entraîne la production de ROS à de faibles concentrations (Figure 9).

Chez les eucaryotes, on retrouve des SOD à cuivre/zinc (Cu/Zn) extracellulaires ou cytosoliques (Tainer et al., 1982) et des SOD à manganèse (Mn) mitochondriales (Borgstahl et al., 1992). Chez l'huître *C. gigas*, la protéine majoritaire du plasma est une superoxyde dismutase Cu/Zn extracellulaire (EcSOD) (Gonzalez et al., 2005; Scotti et al., 2007; Green et al., 2009; Itoh et al., 2010b), également appelée carvortine. Elle est capable de se lier aux hémocytes via les  $\beta$ -intégrines et d'agir en tant qu'osponine avec les *Vibrio* (Duperthuy et al., 2011). Une étude récente a permis de montrer que cette protéine majoritaire du plasma de *C. gigas* présentait également des activités antivirales (Green et al., 2014b).

### **1.3.3.3 Les métaux**

#### **1.3.3.3.1 L'influx de métaux dans le phagosome**

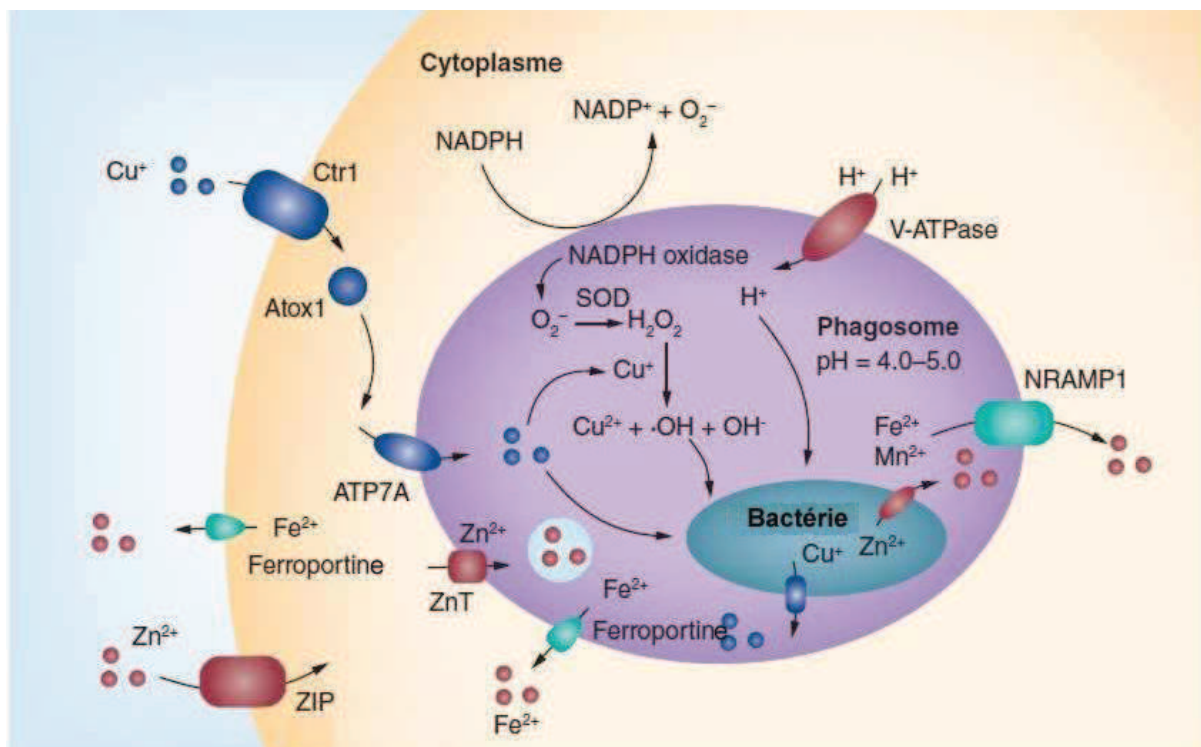
Les propriétés antimicrobiennes du zinc et du cuivre dans les macrophages ont souvent été suggérées. Des études récentes ont apporté des informations au sujet des mécanismes qui régulent l'homéostasie du cuivre et du zinc et leur participation dans les défenses immunitaires (Soldati and Neyrolles, 2012; German et al., 2013) (Figure 10). De nos jours, la régulation du cuivre et du zinc chez les cellules eucaryotes est bien décrite, mais les mécanismes intervenant au sein des phagosomes restent encore peu étudiés.

Le cuivre et le zinc sont requis pour de nombreux processus métaboliques mais ils peuvent être toxiques lorsqu'ils sont en excès. Le cuivre existe sous deux formes d'oxydation dans les systèmes biologiques : le  $\text{Cu}^+$  (réduit) et le  $\text{Cu}^{2+}$  (oxydé), qui sont utilisées par les enzymes rédox qui utilisent le cuivre en tant qu'accepteur ou donneurs d'électrons. Dans les environnements riches en ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) et peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), comme le phagosome, le cuivre  $\text{Cu}^+$  peut permettre de former des radicaux hydroxyl toxiques par la chimie de Fenton (Fenton, 1984). Ces métaux sont également essentiels aux SOD qui catalysent la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à partir de l'ion superoxyde chez les macrophages et les monocytes (Maggini et al., 2007).

L'accumulation de cuivre et de zinc dans les phagosomes a été décrite chez les macrophages infectés ayant internalisé des bactéries. Ainsi, l'analyse des éléments du phagosome de macrophages infectés par des espèces *Mycobacterium* a montré que les cytokines  $\text{TNF}\alpha$  et  $\text{INF}\gamma$  induisaient une accumulation de zinc et de cuivre dans les phagosomes de macrophages infectés par *M. avium* et



que le zinc s'accumulait au cours du temps suite à une infection par *M. tuberculosis* (Wagner et al., 2005). Une étude similaire a également montré une accumulation de zinc dans les phagosomes de macrophages infectés par *M. tuberculosis* après 4h de contact et démontré que le zinc colocalise avec les bactéries internalisées (Botella et al., 2011). Des auteurs travaillant sur le pathogène *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ont montré qu'une infection des macrophages par ce pathogène induisait une accumulation de cuivre dans des vésicules intracellulaires (Achard et al., 2012). On peut ainsi supposer que ces vésicules fusionnent par la suite avec la vacuole de phagocytose pour enrichir le phagosome en cuivre. Une étude récente a montré que le NO<sup>•</sup> pouvait inhiber la réplication de l'ADN bactérien de manière irréversible grâce des mécanismes mobilisant le zinc (Schapiro et al., 2003).



**Figure 10. Transport de métaux et production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules.**  
 La NADPH oxydase produit du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui interagit avec le Cu<sup>+</sup> et le Fe<sup>2+</sup> pour générer des radicaux hydroxyl (OH<sup>•</sup>) et l'ion hydroxyl (OH<sup>-</sup>) qui sont hautement toxiques pour la bactérie. L'import de Cu<sup>+</sup> dans la cellule s'effectue par les protéines membranaires Ctr1. Ensuite, la protéine chaperonne ATOX fixe le Cu<sup>+</sup> et le délivre aux ATP7A pour qu'il soit transporté dans le phagosome. Les transporteurs Zip permettent la pénétration du cuivre dans le cytoplasme de la cellule et les exporteurs Znt délivrent le cuivre dans le phagosome des macrophages. D'après German et al., 2013.

### a) Le zinc

L'homeostasie du zinc est régulée par des transporteurs et des métallothionéines (Botella et al., 2012; German et al., 2013) (Figure 10). Elle est principalement régulée par deux familles de transporteurs de zinc : les exporteurs de zinc, SLC30A (ZnT) et les importeurs de zinc, SLC39A (ZIP) (Lichten and Cousins, 2009). Les transporteurs ZnT diminuent la concentration en zinc cytosolique en transportant le zinc hors des cellules ou vers les vésicules intracellulaires. A l'inverse, les transporteurs Zip augmentent la concentration en zinc cytosolique en transportant le zinc de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et depuis les organelles intracellulaires vers le cytoplasme. Ces transporteurs peuvent être localisés à la membrane plasmique et à la membrane des lysosomes et des endosomes et *in fine* à la membrane du phagosome.

Il a été montré que le transporteur ZnT1, situé à la membrane des vésicules intracellulaires, était surexprimé dans les macrophages infectés par *M. tuberculosis* (Botella et al., 2011). Par la suite, ces vésicules vont probablement fusionner avec le phagolysosome. Enfin, il a été montré que les métallothionéines étaient surexprimées dans les macrophages en présence de LPS (Leibbrandt and Koropatnick, 1994).

Chez *C. gigas*, deux gènes et un ADNc de métallothionéine ont été séquencés : CgMT1, CgMT2 et CgMT3 (Tanguy and Moraga, 2001; Tanguy et al., 2001). Par ailleurs, de nombreux transporteurs de zinc (Zip et Znt) sont retrouvés *in silico* dans le génome de l'huître mais aucun d'entre eux n'a été caractérisé à ce jour.

### b) Le cuivre

Parmi les protéines impliquées dans la régulation du cuivre chez les eucaryotes, on retrouve des transporteurs et des protéines de liaison au cuivre (Stafford et al., 2013).

Les protéines CTR (Copper transport protein) sont des transporteurs à haute affinité pour le cuivre. Les CTR1 sont localisés à la membrane plasmique et à la membrane des vésicules intracellulaires. Ils sont responsables du transport du cuivre de la membrane plasmique aux endosomes lorsque le niveau de cuivre extracellulaire est élevé (Klomp et al., 2002; Petris et al., 2003). Les transporteurs CTR2 possèdent une séquence similaire aux CTR1 et sont exprimés au niveau des vésicules intracellulaires, incluant les lysosomes et les endosomes tardifs (Bertinato et al., 2008).

On retrouve également les ATPases, ATP7A et les ATP7B, qui transportent le cuivre en utilisant l'hydrolyse de l'ATP (Linz and Lutsenko, 2007; Lutsenko et al., 2008). Ces dernières peuvent être localisées au niveau de la membrane plasmique et aux niveaux des vésicules intracellulaires.

Il a été montré qu'une infection des macrophages par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induisait une modulation de l'expression de *ctr1*, *ctr2* et *atp7a* (Achard et al., 2012). White (2009) ont montré que l'ATP7A colocalise partiellement avec les phagosomes durant la phagocytose de billes de latex et que le « knockout » de *atp7a* entraîne une diminution des capacités des macrophages à tuer les bactéries *E.coli*. Parmi les protéines liant le cuivre, on retrouve les protéines chaperonnes ATOX, CCS et Cox17 qui délivrent le cuivre aux ATP7A, aux SOD à cuivre/zinc du cytosol et aux mitochondries, respectivement (Gabbiani et al., 2012; German et al., 2013).

L'ensemble de ces études suggèrent qu'un des mécanismes de défense des macrophages contre l'invasion des bactéries soit l'accumulation de cuivre et de zinc dans les phagosomes. Trois ATPases de type 1 homologues à ATP7A, deux transporteurs de cuivre homologues à Ctr1 et une protéine chaperonne ATOX1 sont retrouvés *in silico* dans le génome de l'huître mais aucun d'entre eux n'a encore été étudiés.

#### **1.3.3.2 L'efflux de métaux du phagosome**

Le fer et le manganèse sont des métaux essentiels à la survie des bactéries intracellulaires et plus particulièrement le  $Fe^{2+}$  chez les *Mycobacteria*, *Salmonella*, *Legionella* et *Leishmania* spp. Ainsi, le macrophage diminue leur concentration dans le phagosome afin de limiter la croissance des bactéries. Parmi les protéines impliquées dans la diminution du fer et du manganèse, on retrouve la protéine NRAMP (Forbes and Gros, 2001; Cellier et al., 2007), une calprotectine (Damo et al., 2013) et une ferroportine (Madejczyk and Ballatori, 2012).

Certains macrophages utilisent des transporteurs de type NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein) pour diminuer la quantité de  $Fe^{2+}$  et de  $Mn^{2+}$  dans le phagosome (Jabado et al., 2000). La protéine NRAMP1 se trouve localisée à la membrane des phagosome des macrophages et à la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes (Gruenheid et al., 1997; Jabado et al., 2002; Courville et al., 2006). Des études sur les pathogènes intracellulaires capables de survivre dans les macrophages ont montré que la protéine NRAMP1 était localisée à la membrane des vacuoles contenant les bactéries *Salmonella*, *Leishmania*, *Mycobacterium avium* et *Yersinia* (Searle et al., 1998; Govoni et al., 1999).

On retrouve un transporteur de métaux divalents homologue à NRAMP1 dans le génome de *C. gigas*. Il est ainsi fort probable que ces mécanismes soient également employés par les hémocytes phagocytant des bactéries de l'huître *C. gigas*.

#### **1.3.3.4 Les enzymes hydrolytiques**

Au cours de la phagocytose, les microorganismes se retrouvent localisés dans les phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes et les granules intracellulaires. Ces granules sont caractérisées par leur pH acide et la présence d'une grande variété d'enzymes hydrolytiques et d'effecteurs antimicrobiens. Parmi les enzymes hydrolytiques, les lysozymes jouent un rôle important dans la dégradation des microorganismes grâce à leurs propriétés lytiques du peptidoglycane des bactéries (Bachali et al., 2002).

Les lysozymes de l'huître sont exprimés dans de nombreux tissus, incluant les hémocytes (*Cg*L-1 ou *Cg*-lyzol) mais aussi les épithelia comme la glande digestive (*Cg*L- 2 ou *Cg*\_lysoz2) et le manteau (*Cg*L-3 ou *Cg*\_lysoz3) (Matsumoto et al., 2006; Itoh and Takahashi, 2007; Itoh et al., 2007; Itoh et al., 2010a; Xue et al., 2010). *Cg*L-1 et *Cg*L-3, sont actifs contre des bactéries à Gram positif (Itoh et al., 2010a). Il a également été démontré qu'une infection par le pathogène *V. tasmaniensis* LGP32 induisait la surexpression de la *Cg*L-1 dans les hémocytes, comparé à une souche non virulente (de Lorgeril et al., 2011b).

#### **1.3.3.5 Les protéases et les inhibiteurs de protéase**

Les hémocytes produisent des protéases et des inhibiteurs de protéases. Ces derniers participent à de nombreuses réactions immunitaires en régulant les cascades de signalisation endogènes (Hibbetts et al., 1999). De plus, les inhibiteurs de protéases de l'hôte peuvent inactiver les protéases sécrétées par les agents infectieux (Armstrong, 2006). De nombreuses séquences codant des inhibiteurs de protéases ont été identifiées chez l'huître. On retrouve ainsi des serpinines, des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) et des  $\alpha$ 2-macroglobulines (Montagnani et al., 2001; Gueguen et al., 2003; Roberts et al., 2009b). *Cg-timp* est exprimé uniquement dans les hémocytes et est modulé en réponse à des dommages de la coquille, à une infection bactérienne et à une exposition aux produits extracellulaires de *Vibrio* (Montagnani et al., 2001; Montagnani et al., 2007).

### 1.3.3.6 *Les protéines et peptides antimicrobiens*

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des effecteurs de la défense contre les pathogènes très conservés dans le règne vivant. Il s'agit généralement de peptides cationiques, amphipatiques, qui interagissent avec les membranes des bactéries via des interactions électrostatiques avec les lipopolysaccharide chargés négativement des bactéries à Gram négatif ou les acides teichoïques des bactéries à Gram positif (Bulet et al., 2004). De nombreux AMPs sont capables de former des pores dans les membranes bactériennes, entraînant ainsi la lyse de la cellule (Brogden, 2005). Les AMPs peuvent également se lier à des composants essentiels des membranes bactériennes ou être transloqués dans le cytoplasme, où ils interfèrent avec des processus cellulaires vitaux tels que la synthèse des acides nucléiques, de protéines, d'enzymes et de composants de la paroi (Brotz et al., 1998; Park et al., 1998; Kragol et al., 2001; Patrzykat et al., 2002; Srinivasan et al., 2010; Wilmes et al., 2011). Les AMPs peuvent agir en synergie en combinant leurs mécanismes d'action pour combattre les bactéries pathogènes (Schmitt et al., 2012b).

Les phagocytes peuvent utiliser les AMPs pour tuer les micro-organismes qui ont été phagocytés. Ainsi, les phagocytes humains, en particulier les neutrophiles, sont connus pour exprimer une grande diversité d'AMPs. Les neutrophiles expriment des  $\alpha$ -défensines, stockées dans les granules azurophiles qui fusionnent avec le phagolysosome pour tuer les bactéries internalisées, et la cathelicidine LL-37, stockée dans les granules sécrétoires qui relarguent leur contenu à l'extérieur. Leur expression est constitutive mais la délivrance est régulée par divers signaux microbiens. Dans les phagolysosomes des neutrophiles, la concentration des défensines est d'environ 10mg/ml (Ganz, 2003). Les macrophages expriment quant à eux un nombre limité d'AMPs par rapport aux neutrophiles. Ces cellules utilisent les AMPs tels que l'hepcidine, LL-37 et les  $\beta$ -défensines 2 humaines pour contrôler les pathogènes intracellulaires (Liu and Modlin, 2008). Le rôle de LL-37 dans la dégradation intracellulaire des mycobactéries est maintenant bien documenté (Liu and Modlin, 2008; Sonawane et al., 2011).

Les hémocytes de l'huître produisent aussi une large gamme d'AMPs conventionnels et non conventionnels (Schmitt et al., 2012c) incluant des **défensines**, des **big-défensines**, des **peptides riche en proline** et une **Cg-molluscidine** récemment identifiée, ainsi que deux protéines antimicrobiennes, **Cg-BPI** (bacterial/permeability-increased protein) et une **Cg-Mepg1** (macrophage expressed gene 1-like ) (Gonzalez et al., 2007; He et al., 2011; Zhang et al., 2011d; Seo et al., 2013). La Cg-BPI est stockée dans de larges vacuoles cytoplasmiques mais la localisation des autres peptides n'est pas clairement établie. L'expression de la Cg-BPI, de Cg-Mepg1 et des big-défensines 1 et 2 est

régulée dans les hémocytes infiltrants après une infection bactérienne mais l'expression des défensines est constitutive dans les hémocytes (Gonzalez et al., 2007; He et al., 2011; Rosa et al., 2011).

Les *Cg*-BPIs sont actives uniquement sur les bactéries à Gram négatif (Gonzalez et al., 2007; Zhang et al., 2011d). Gonzalez (2007) et al. ont montré que *Cg*-BPI était capable de se lier au LPS et de perméabiliser des bactéries. *Cg*-Mepg1 (macrophage expressed gene 1-like), appartenant à la superfamille des perforines, se révèle peu active contre les bactéries à Gram négatif et positif (He et al., 2011). Le peptide riche en proline *Cg*-Prp présente une faible activité anti-microbienne et agit essentiellement en synergie avec les autres AMPs d'huître (Gueguen et al., 2009). Les défensines *Cg*-Defh1 et 2 présentent des activités antimicrobiennes contre les bactéries à Gram positif en inhibant la biosynthèse du peptidoglycane (Schmitt et al., 2010). La *Cg*Molluscidine est active contre les bactéries à Gram négatif et positif (Seo et al., 2013). Enfin, récemment, des **histones** présentant des propriétés antimicrobiennes ont été isolées à partir de branchies d'huîtres stimulées par des challenges microbiens; ces antimicrobiens dits non-conventionnels sont libérés par les hémocytes en réponse à un stress oxydant (Schmitt, 2010 ; Seo et al., 2010; Poirier et al., 2014).

## II. LES BACTERIES DU GENRE *VIBRIO*

### II.1 LA BIOLOGIE DES VIBRIOS

Les *Vibrio* sont des bactéries qui appartiennent à la classe des  $\gamma$ -*proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae*. Les *Vibrio* sont des petits bacilles à Gram négatif, droits ou incurvés, de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long et extrêmement mobiles grâce à la présence d'un ou plusieurs flagelles. Ces bactéries ont un mode de vie aquatique et sont présentes dans les eaux douces mais aussi les eaux salées et saumâtres. Les *Vibrio* sont des bactéries ubiquistes des milieux marins côtiers qui colonisent de nombreux organismes aquatiques. Ce sont des bactéries saprophytes retrouvées dans la plupart des zones côtières des régions tempérées ou tropicales du monde : eaux saumâtres, estuaires, lits des fleuves. Ils peuvent être libres ou associés au zooplancton (copépodes), aux algues marines et aux plantes aquatiques. Les *Vibrio* apparaissent sur gélose Zobell sous forme de colonies blanches, circulaires à bords réguliers et légèrement convexes. Les *Vibrios* sont des bactéries aéro-anaérobie facultatives. Ils se cultivent entre 10°C et 40°C et leur pH optimal est de 7. Les *Vibrio* possèdent des propriétés caractéristiques qui permettent de les sélectionner sur différents milieux. Ils se cultivent à un pH légèrement alcalin entre de 7,5 et 9 et jusqu'à de fortes concentrations en NaCl (10 à 30 g/l), du fait de leur caractère le plus souvent halophile. Quelques espèces possèdent un pouvoir pathogène (Thompson et al., 2004), les unes vis-à-vis de vertébrés comme *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. anguillarum* chez l'homme et le poisson (Frans et al., 2011; Ceccarelli and Colwell, 2014), les autres vis-à-vis d'invertébrés comme *V. nigripulchritudo*, *V. shilonii* et *Vibrio harveyi* chez les crevettes, les coraux et les mollusques respectivement (Goarant et al., 2000; Rosenberg et al., 2007; Travers et al., 2008). D'autres espèces sont au contraire des symbiotes de céphalopodes comme *V. fischeri* chez le calamar (Altura et al., 2013; Kremer et al., 2014).

### II.2 TAXONOMIE

De nombreuses espèces de *Vibrionaceae* ont pu être décrites grâce à des méthodes de génotypage moléculaire tels que AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) ou MLSA (Multilocus sequence analysis) (Thompson et al., 2001; Thompson et al., 2005; Sawabe et al., 2007; Thompson et al., 2007; Sawabe et al., 2009; Thompson et al., 2009). Actuellement, 142 espèces ont été décrites dans la famille des *Vibrionaceae* et classifiées en 7 genres. Du fait des limitations générées par les phylogénies basées sur le séquençage de l'ARN 16S, Sawabe et al. (2007) ont développé en 2007 une analyse MLSA basée sur 58 souches du genre *Vibrio* en utilisant 9 gènes de ménage (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *topA* et l'ARN 16S). Cette étude a permis

d'identifier 14 clades monophylétiques mais quelques clades n'ont pu être définis compte tenu de la difficulté de dessiner des amorces universelles pour ces gènes chez les *Vibrionaceae*. Plus récemment, Sawabe et al. (2013) ont amélioré cette phylogénie en utilisant 86 souches de *Vibrio*, 10 génomes de *Vibrio* séquencés et 8 gènes de ménage. Cette étude a permis d'identifier 8 nouveaux clades et d'actualiser 9 clades dont le clade Splendidus contenant désormais 12 espèces dont *V. crassostreae*, *V. splendidus* et *V. tasmaniensis* qui sont des bactéries qui peuvent coloniser les organismes marins (Figure 11).

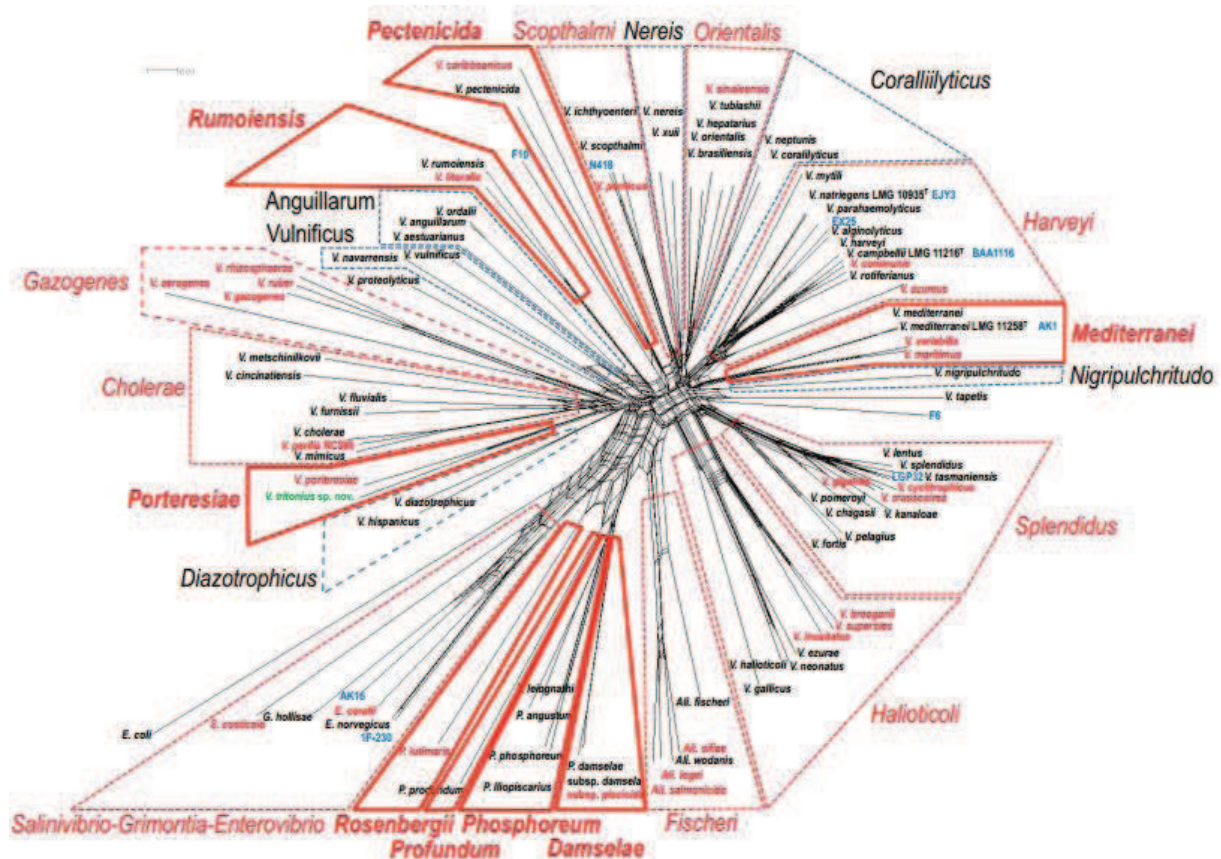


Figure 11. Arbre phylogénétique des *Vibrio* par analyse MLST sur 8 gènes (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *topA* et ARNr 16S) de 86 souches. Les clades encadrés en rouge (ligne continue) correspondent aux nouveaux clades identifiés. Les clades encadrés en rouge (tiret) et en noir (tiret) correspondent, respectivement, aux clades actualisés ou inchangés. D'après Sawabe et al., 2013.

Les *Vibrio* présentent la particularité de posséder deux chromosomes circulaires de contenu génétique et de taille dissemblables (Okada et al., 2005; Lukjancenko and Ussery, 2014). Ces chromosomes ont été mis en évidence grâce aux séquençages de génome complet de nombreuses espèces *Vibrio* tels que *V. cholerae* O1 (biotype El Tor) (Schoolnik and Yildiz, 2000), *V. parahaemolyticus* (Makino et al., 2003), *V. vulnificus* YJ016 (Chen et al., 2003), *V. fisheri* ES114 (Ruby



et al., 2005) et *V. tasmaniensis* LGP32 (Le Roux et al., 2009). Un projet Vibroscope a été mis en place pour séquencer le génome complet de *Vibrio* pathogènes d'invertébrés marins d'intérêt aquacole. Il s'agit de *V. aestuarianus* pathogène de l'huître, *V. tapetis* pathogène de palourde et *V. nigripulchritudo* pathogène de crevette. Avec les projets du NGS (New Generation Sequencing), le nombre de souches séquencées est en train de croître très fortement, comme notamment pour le clade Splendidus où de nombreuses souches ont été séquencées (Le Roux et coll. données non publiées). A terme, ces séquençages permettront d'identifier des éléments génétiques nouveaux impliqués dans la pathogénicité.

Les *Vibrio* possèdent une forte plasticité génomique (Dryselius et al., 2007) qui leur permet une grande adaptation à l'environnement (diversité de niches, de milieux). Des études suggèrent que les deux chromosomes ont pris forme grâce aux transferts horizontaux de gènes impliqués, entre autres, dans la résistance aux antibiotiques, la virulence et l'adaptation à la niche écologique (Rowe-Magnus and Mazel, 2001; Kirkup et al., 2010).

La majorité des gènes aux fonctions cellulaires essentielles (réplication, transcription, traduction, biosynthèse) et de virulence (capsule, toxine, antigène de surface, adhésine) sont localisés sur le chromosome I généralement de plus grande taille. Le chromosome II, plus petit, contient une proportion plus importante de gènes codant des protéines hypothétiques (Heidelberg et al., 2000).

### **II.3 LES VIBRIOS PATHOGENES DE L'HUITRE**

La plupart des *Vibrio* colonisant les organismes marins sont des espèces considérées comme commensales mais quelques espèces sont devenues des pathogènes opportunistes. Ainsi, de nombreux vibrios se sont révélés être impliqués dans les phénomènes de mortalités d'huîtres *C. gigas* (Saulnier et al., 2010). La virulence de souches de *V. aestuarianus* (Garnier et al., 2007; Saulnier et al., 2009; Saulnier et al., 2010) et de *V. tasmaniensis* (Le Roux et al., 2002; Gay et al., 2004b) a été confirmée en infections expérimentales. Il en va de même pour *V. tubiashii* responsable de maladies dans les éclosiers chez *C. virginica* (Tubiash et al., 1965; Tubiash et al., 1970) et de *C. gigas* (Estes et al., 2004; Elston et al., 2008; Travers et al., 2014). Ainsi, les *Vibrio* peuvent affecter les larves, les juvéniles et les adultes (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Romalde et al., 2014).

### II.3.1 Les mortalités de larves

Diverses maladies de larves d'huîtres impliquent des *Vibrio* de l'espèce: *V. alginolyticus*, des *Vibrio* du Clade Splendidus, mais principalement de l'espèce *V. tubiashii* (Jeffries, 1982; Beaz-Hidalgo et al., 2010). *V. tubiashii* est responsable de la nécrose bacillaire qui se caractérise par une réduction de la motilité des larves, des exfoliations des cellules épithéliales du velum, la localisation de bactéries le long du manteau et de la coquille interne (Tubiash et al., 1965; Elston et al., 2008). Parmi ses facteurs de virulence, on retrouve une cytolysine VthA qui induit des effets cytolytiques (Kothary et al., 2001) et une métalloprotéase VtpA toxique pour les larves (Delston et al., 2003; Hasegawa et al., 2008; Hasegawa et al., 2009). De récentes études ont montré que les produits de sécrétion extracellulaires (ECPs) de cette souche étaient également toxiques pour les adultes (Travers et al., 2014) et qu'une métalloprotéase à zinc thermostable était la protéase majeure des ECPs. De plus, Mersni-Achour et al. (2013) ont montré une inhibition de capacités d'adhérence et de phagocytose des hémocytes en présence des ECPs de *V. tubiashii*. Ces auteurs ont également montré *in vitro* que les ECPs de cette souche dégradent le collagène, la fibronectine et l'actine.

### II.3.2 Les mortalités de juvéniles

Les naissains et les juvéniles de *C. gigas* sont particulièrement affectés par des *Vibrios* du clade Splendidus. Ce clade présente une diversité génétique importante et de nombreuses souches ont été isolées et caractérisées lors de mortalités estivales parmi lesquelles certaines se révèlent virulentes (Lacoste et al., 2001; Waechter et al., 2002; Gay et al., 2004a; Gay et al., 2004b; Saulnier et al., 2010). Ces souches sont généralement retrouvées dans des huîtres co-injectées par le virus OsHV-1.

*V. tasmaniensis* LGP32 (nommée alors Mel32) a été isolée par Le Roux et collaborateurs lors des épisodes de mortalités de 2004 (Gay et al., 2004a). Récemment, l'amélioration de la phylogénie moléculaire de *Vibrionaceae* par Sawabe et al. (2013) a permis de renommer la souche pathogène d'huître *V. splendidus* LGP32 du clade Splendidus en *V. tasmaniensis* LGP32. Les huîtres infectées expérimentalement avec *V. tasmaniensis* LGP32 présentent des fibres musculaires arrondies contenant des granules non-homogènes dans leur cytoplasme et entourées d'un halo translucide, la présence de granules non-homologues dans les cellules musculaires à morphologie normale, et une condensation des extrémités de l'intégralité des fibres musculaires (Gay et al., 2004b). Le génome de *V. tasmaniensis* LGP32 est aujourd'hui disponible et des gènes codant des facteurs de virulence potentiels ont pu être identifiés (Le Roux et al., 2009).

Des travaux récents de notre équipe ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif et qu'il utilise l'invasion des hémocytes d'huître comme une étape majeure du processus infectieux (Duperthuy et al., 2011). La porine OmpU, présente à la membrane externe de *V. tasmaniensis* LGP32, est essentielle pour la virulence du pathogène. Des expériences *in vivo* ont montré que les *V. tasmaniensis* LGP32 délétés du gène codant la porine OmpU sont rendus non virulents en infections expérimentales (Duperthuy et al., 2010). Ils deviennent incapables d'envahir les hémocytes d'huîtres (Duperthuy et al., 2011). A l'inverse, la souche sauvage *V. tasmaniensis* LGP32 envahit les hémocytes dans lesquels elle survit. Dans ce processus, OmpU sert d'adhésine/invasine nécessaire à la reconnaissance par la  $\beta$ -intégrine hémocytaire et à l'invasion de la cellule hôte. En outre, la protéine majoritaire du plasma d'huître, la superoxyde dismutase extracellulaire, *Cg*-EcSOD, est utilisée comme une opsonine promouvant la phagocytose OmpU-dépendante via sa séquence RGD. Finalement, les bactéries internalisées montrent des capacités de survie intracellulaire et d'échappement aux défenses de l'hôte en inhibant la formation de vacuoles acides et en limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS) (Duperthuy et al., 2011). Les travaux de Duperthuy et al. (2011) ont donc montré d'une part que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif qui manipule les mécanismes de défense de l'hôte pour entrer et survivre à l'intérieur des cellules immunitaires, et d'autre part que OmpU est un déterminant majeur de l'invasion des cellules hôtes chez les espèces de *Vibrio*. Elle est utilisée par *V. tasmaniensis* LGP32 pour adhérer et envahir les hémocytes d'huître après opsonisation par la protéine *Cg*-EcSOD du plasma d'huître (Figure 12). En outre, la porine OmpU de *V. tasmaniensis* LGP32 contribue à la résistance contre les AMPs de l'huître, *Cg*-Def and *Cg*-BPI (Duperthuy et al., 2010).

La recherche des facteurs de virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 a conduit Le Roux et coll. à montrer que *V. tasmaniensis* LGP32 produisait des produits de sécrétion extracellulaire (ECPs) toxiques pour les huîtres et dont la métalloprotéase sécrétée *Vsm* était le facteur principal de toxicité (Le Roux et al., 2007; Binesse et al., 2008). En effet, les ECPs produits à partir d'une souche délétée de la *Vsm* sont moins toxiques pour les huîtres. Cependant, l'injection de bactéries délétées pour cette métalloprotéase ne diminue pas les mortalités d'huître par injection (Le Roux et al., 2007). Les auteurs ont également testé les ECPs produites à partir d'une souche délétée de la protéase *PrtV/inhA* mais aucune différence au niveau des mortalités n'a été constatée. En revanche, les ECPs produites à partir d'un double mutant pour les métalloprotéases *Vsm* et *inhA* sont moins toxiques pour les huîtres que les ECPs du mutant  $\Delta vsm$ , suggérant un effet synergique des deux métalloprotéases. *In vitro*, la *Vsm* purifiée entraîne des effets cytotoxiques incluant une rétractation

des pseudopodes et un arrondissement des cellules de lignées Bge de *Biomphalaria glabrata* (Binesse et al., 2008).

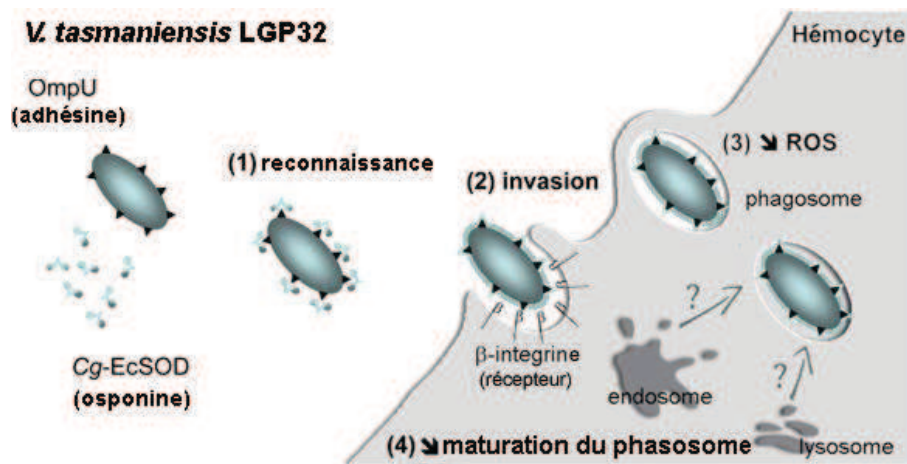


Figure 12. Modèle d'invasion des hémocytes de *C.gigas* par *V. tasmaniensis* LGP32. Le mécanisme d'invasion des hémocytes par *V. tasmaniensis* est dépendant de l'intégrine  $\beta$  hémocytaire et fait intervenir OmpU en tant qu'adhésine, et la protéine plasmatique Cg-EcSOD en tant qu'opsonine. Dans ce modèle (1) OmpU de *V. tasmaniensis* LGP32 est reconnu par la Cg-EcSOD qui va alors recouvrir la bactérie. (2) *V. tasmaniensis* LGP32 ainsi opsonisée est reconnue à la membrane des hémocytes par l'intégrine  $\beta$  qui signale l'internalisation de la bactérie. Une fois internalisée, *V. tasmaniensis* LGP32 inhibe (3) la production de ROS et (4) la formation de vacuoles acides par les hémocytes. D'après Duperthuy et al., 2011.

### II.3.3 Les mortalités d'adultes

Plusieurs épisodes de mortalités d'adultes ont été étudiés au cours des années passées. Elles sont principalement dues à des souches de *V. aestuarianus* (Gay et al., 2004a; Labreuche et al., 2006b; Garnier et al., 2007; Garnier et al., 2008; Saulnier et al., 2009; Saulnier et al., 2010). Plus récemment, les importantes mortalités d'adultes enregistrées sur la côte Atlantique ont identifié des *V. aestuarianus* comme principale espèce pathogène (Travers et al, communication personnelle). Les huîtres injectées par ce pathogène présentent des nécroses des fibres musculaires et une atrophie des diverticules digestifs (Garnier et al., 2007). Le génome de la souche 02/41 est en cours de séquençage par le génoscope. Tous les *V. aestuarianus* isolés jusqu'à récemment se sont révélés être virulents en infections expérimentales (Saulnier et al., 2010) mais la souche 02/41 est celle qui induit le plus fort taux de mortalité en peu de temps (De Decker and Saulnier, 2011). Tout récemment, des souches non virulentes de *V. aestuarianus* ont pu être isolées par Travers et al., qui présentent une mutation dans un système à deux composants contrôlant l'expression de gènes de virulence chez les vibrios (Travers et al., données non publiées).

Des travaux sur la souche *V. aestuarianus* 01/32 ont montré que ce pathogène semble être capable d'échapper aux défenses immunitaires en inhibant les fonctions du système immunitaire

comme les capacités d'adhésion et de phagocytose des hémocytes *in vivo* (Labreuche et al., 2006b). L'étude des ECPs a révélé que ces derniers étaient toxiques pour les huîtres en injection intramusculaire et qu'elles perturbaient les fonctions hémocytaires de l'huître (phagocytose et production de ROS) *in vitro* (Labreuche et al., 2006a). Dans ces ECPs, une zinc métalloprotease Vam se révèle être létale pour les huîtres en induisant de forts dommages aux hémocytes (agrégations, perte de pseudopodes) (Labreuche et al., 2010).

## II.4 FACTEURS DE VIRULENCE DES VIBRIO PATHOGENES

Bien que les notions même de pathogène et de virulence restent largement débattues au sein de la communauté scientifique, il apparaît important de clarifier les définitions de ces termes que nous considererons pour l'ensemble de ce manuscrit. Pour provoquer une maladie chez un hôte sain, un agent pathogène doit d'abord être transmis à l'hôte par contact direct ou indirect. Ensuite, il doit être capable (1) d'adhérer, de coloniser et d'envahir l'hôte, (2) de survivre et de se multiplier dans l'hôte (3) d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et (4) de causer des dommages chez l'hôte. Dans ce cas, **les facteurs favorisant la colonisation et l'invasion de l'hôte, et les facteurs entraînant directement des dommages à l'hôte sont considérés comme des facteurs de virulence.**

Grâce aux nombreux génomes de *Vibrio* séquencés, une grande variété de facteurs de virulence potentiels ont pu être identifiés et caractérisés chez ce genre (Johnson, 2013). On retrouve ainsi des facteurs impliqués dans d'adhésion et la colonisation, des facteurs cytotoxiques et des facteurs de résistance/échappement au système immunitaire.

### II.4.1 Les facteurs d'adhérence et de colonisation

Les **flagelles** sont des organelles assurant la mobilité de la bactérie qui peuvent être également impliqués dans la colonisation de l'hôte et dans l'adhésion des cellules de l'hôte (Josenhans and Suerbaum, 2002; Haiko and Westerlund-Wikstrom, 2013). Chez *V. cholerae*, la phosphorylation d'une protéine régulatrice du flagelle, FlrC, est nécessaire à la motilité et la colonisation. En effet, la délétion de ce gène diminue de 50 fois la colonisation de l'hôte (Correa et al., 2000). Chez *V. anguillarum*, des mutants du gène *flaA* présentent une diminution significative de la mortalité des poissons par baignade mais pas de perte de virulence par injection intrapéritonéale (Milton et al., 1996). D'autres auteurs ont montré que des mutants isogéniques non motiles de *V. anguillarum* ne perdaient pas leur capacité d'adhésion et qu'ils envahissaient moins les cellules épithéliales de poissons (Ormonde et al., 2000). On suppose dans ce modèle que la reconnaissance du flagelle par la cellule de l'hôte entraîne la phagocytose.

Les **pili** sont des appendices localisés à la surface de la paroi de nombreuses bactéries à Gram négatif qui ont pour rôle principal l'adhésion (Soto and Hultgren, 1999). Parmi les plus connus, on retrouve le pilus de type IV qui contribue à la virulence des pathogènes (adhésion, échappement immunitaire, motilité de surface et formation de microcolonies) (Craig et al., 2004; Pelicic, 2008). Des auteurs ont montré que la délétion du gène *pilA*, impliqué dans la formation du pilus de type IV de *V. vulnificus*, entraînait une diminution de la formation de biofilm, de l'adhérence aux cellules épithéliales et de la virulence chez des souris pré-traitées avec du dextran (Paranjpye and Strom, 2005). Chez *V. parahaemolyticus*, une délétion des composants du pilus MSHA (mannose-sensitive haemagglutinin) entraîne une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2 et une diminution des effets cytotoxiques (arrondissement des cellules et lyse cellulaire) (O'Boyle et al., 2013). La bactérie pathogène de l'homme, *V. cholerae*, utilise des TCP (toxin-coregulated pili) pour adhérer aux entérocytes et ainsi coloniser les intestins. Ces mêmes pili sont des récepteurs de bactériophages CTX dont le génome code la toxine cholérique (Li et al., 2008).

Les **protéines de la membrane externe** (ou porines) sont aussi impliquées dans l'adhésion et la pathogénicité (Lin et al., 2002; Galdiero et al., 2012). Chez le pathogène de l'huître *V. tasmaniensis* LGP32, il a été montré que la porine OmpU était nécessaire à la virulence en infection expérimentales, et à l'invasion des hémocytes (Duperthuy et al., 2010; Duperthuy et al., 2011). Des études ont montré que OmpU médiait les interactions hôte-*Vibrio*, qu'elle était impliquée dans la résistance aux peptides antimicrobiens (Mathur and Waldor, 2004; Mathur et al., 2007; Duperthuy et al., 2010), dans l'adhérence aux cellules de l'hôte (Goo et al., 2006) et dans la reconnaissance des pathogènes et des symbiotes (Nyholm et al., 2009).

La **capsule** bactérienne est une enveloppe externe composée de polysaccharides qui recouvre les lipopolysaccharides (LPS). Cette dernière est corrélée à la virulence de *V. cholerae* non-O1 et *V. vulnificus* (Yoshida et al., 1985; Simpson et al., 1987; Wright et al., 1990). La présence d'une capsule protège *V. vulnificus* de la phagocytose et de la reconnaissance par les protéines du complément (Genthner et al., 1999; Park et al., 2006). Chez *V. cholerae* non-O1, la forme « encapsulée » entraîne une augmentation de la virulence chez des souris (Johnson et al., 1992).

Les **lipopolysaccharides (LPS)** sont des composants majeurs de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ils sont constitués d'un lipide A, d'un polysaccharide central et d'une chaîne latérale O hydrophile (Chatterjee and Chaudhuri, 2003). Chez *Salmonella enterica*, *Helicobacter pylori*, *V. cholerae* et *V. fisheri*, Le LPS est connu pour jouer un rôle dans la colonisation de l'hôte (Moran et al., 2000; Nesper et al., 2001; Post et al., 2012; Coward et al., 2013). Hankins et al. (2011)

ont montré que *V. cholerae* O1 and O139 partageait la même structure asymétrique hexa-acétylée du lipide A. Il est composé d'un  $\beta$  1-6' dissaccharide glucosamide, avec des groupements phosphates non modifiés en 1- et 4-', qui est acétylé en position 2-, 3-, 2- et 3'. Le myristate (C14:0) et 3-hydroxylaurate (3-OH C12:0) sont reliés aux groupements hydroxyles des chaînes d'acide gras par des liaisons ester en position 2' et 3' (Figure 13). Comme chez *V. cholerae*, la présence de quelques chaînes d'acide gras acétylées secondaires est rapportée sur la structure du lipide A de *V. fischeri* (Phillips et al., 2011). Le LPS des *Vibrio*, hautement variable, joue un rôle dans la résistance à la réponse immunitaire de l'hôte (Chatterjee and Chaudhuri, 2006).

Les protéases peuvent être également impliquées dans la colonisation. Chez les *Vibrio*, on peut citer la métalloprotéase Pa de *V. anguillarum* qui semble être impliquée dans l'invasion de l'hôte (Norqvist et al., 1990) et la Vibriolysin de *V. cholerae*, métalloprotéase à zinc, impliquée dans la colonisation, l'invasion et la dissémination dans l'hôte (Iqbal et al., 2011).

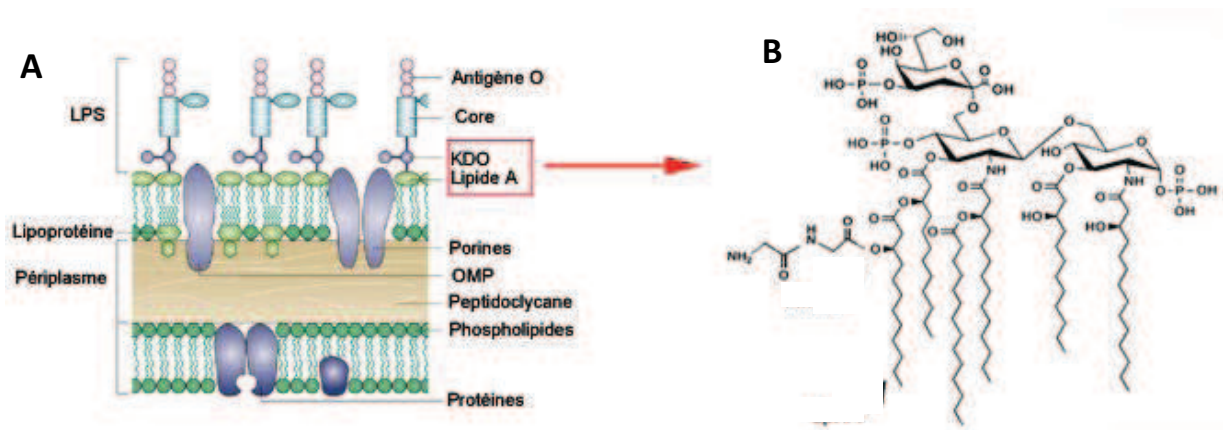


Figure 13. Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (A) et de la structure du lipide A chez les *Vibrio* (B).

KDO: 3-deoxy-D-manno-octulosonate, LPS: lipopolysaccharide, OMP : protéine de la membrane externe, LpxN : méthytransférase. Adapté de Lolis and Bucala, 2003; Hankins et al., 2011.

## II.4.2 Les facteurs induisant des dommages cellulaires

Les *Vibrio* sont connus pour leur capacité à produire des effecteurs capables d'induire des dommages aux cellules de leurs hôtes. Leur délivrance implique divers mécanismes de sécrétion. Je décrirai ici ces mécanismes avant de détailler les effecteurs eux-mêmes.

### II.4.2.1 Les systèmes de sécrétion

Les produits de sécrétion ou ECPs, pour « extracellular products » sont le produit du transport ou de la translocation d'effecteurs moléculaires bactériens tels que des toxines, des protéases, des phospholipases, etc... Ceux-ci sont exportés de l'intérieur de la cellule bactérienne

vers le milieu extérieur. La sécrétion est un mécanisme très important dans le fonctionnement de la bactérie et dans ses échanges avec l'environnement, y compris ses hôtes. Les produits de sécrétion jouent ainsi un rôle majeur dans de nombreux processus infectieux. Les bactéries ont développé différents mécanismes pour transporter des protéines à travers l'enveloppe cellulaire. Les mieux décrits mettent en jeu des appareils de sécrétion transmembranaires, complexes protéiques brièvement rappelés ci-dessous. Moins bien caractérisées mais suscitant un intérêt croissant, les vésicules de membranes externes véhiculent aussi bon nombre de produits de sécrétion de l'espace périplasmique vers l'extérieur de la cellule bactérienne.

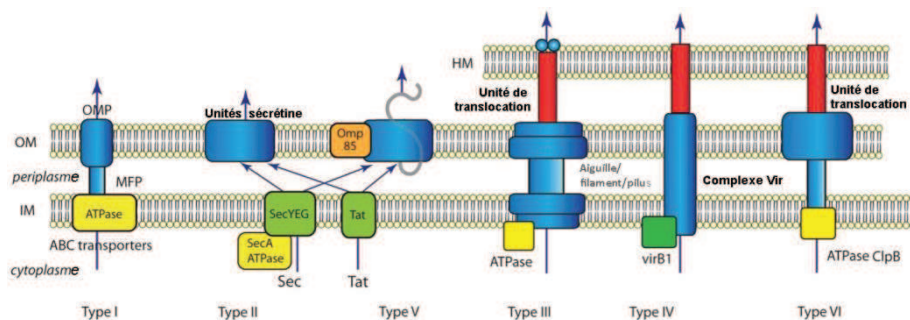
#### **II.4.2.1.1 Les transporteurs membranaires**

Chez les bactéries à Gram négatif, de nombreuses protéines sécrétées sont exportées au travers de la membrane interne et la membrane externe via des systèmes de sécrétion qui impliquent des complexes de protéines transmembranaires et périplasmiques appelés systèmes de sécrétion transmembranaires (TSS). Les TSS de type I, III, IV et VI (T1SS, T3SS, T4SS, et T6SS) transportent les protéines depuis le cytosol vers l'espace extracellulaire en une seule étape. D'autres protéines sont d'abord transportées dans l'espace périplasmique par les systèmes de sécrétion Sec ou Tat (two-arginine), puis transloquées au travers de la membrane externe via les systèmes de sécrétion de type II et V (T2SS et T5SS). Les systèmes de sécrétion Sec exportent à travers la membrane cytoplasmique des protéines non conformées, en utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Ces protéines seront repliées dans le périplasmique. Les systèmes de sécrétion de type Tat exportent à travers la membrane cytoplasmique des protéines conformées, en utilisant la force protomotrice comme source d'énergie. Les systèmes T3SS, T4SS et T6SS s'insèrent dans la membrane des cellules hôtes pour sécréter des effecteurs impliqués dans la virulence (Tseng et al., 2009) (Figure 14).

Des travaux sur *V. cholerae* ont montré le rôle majeur des toxines sécrétées dans la pathologie chez l'homme (Fullner and Mekalanos, 2000). Par ailleurs, cette même équipe a montré récemment l'importance du T6SS dans les effets cytopathologiques observés sur les macrophages humains (Ma et al., 2009a; Ma and Mekalanos, 2010). Chez *V. parahaemolyticus*, un système de sécrétion de type III (T3SS) (Zhou et al., 2009; Matsuda et al., 2012) est impliqué dans la cytotoxicité *in vitro* et un second (T2SS) est responsable de l'activité entérotoxique de cette bactérie (Zhou et al., 2012). Des gènes codant des TTSS sont retrouvés chez *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* et *V. tubiashii* (Henke and Bassler, 2004; Park et al., 2004; Dziejman et al., 2005). Chez *V. tasmaniensis* LGP32, on retrouve les systèmes de sécrétion T1SS qui est un transporteur ABC (ATP-binding



cassette), T2SS et T6SS. En revanche, aucun T3SS, T4SS ou T5SS n'a été identifié dans le génome de *V. tasmaniensis* LGP32 (Le Roux et al., 2009). LGP32 ne possède pas de système de sécrétion de type IV (T4SS) mais un pilus de type IV. Les systèmes de biogenèse des pili de type IV sont homologues aux systèmes de sécrétion de type II qui sont responsables du passage de la membrane externe pour les protéines comme les métalloprotéases Vsm et InhA/PrtV. De manière intéressante, bon nombre de ces effecteurs sécrétés des T6SS sont présents dans le génome de LGP32 séquencé par Frédérique Le Roux (Le Roux et al., 2009). Il existe une seule copie de T6SS chez *V. tasmaniensis* LGP32.



**Figure 14. Systèmes de sécrétion transmembranaire connus chez les bactéries Gram négatives.** HM: membrane de la cellule hôte; OM: membrane externe; IM: membrane interne; OMP: protéine de la membrane externe; MFP: protéine de fusion membranaire. Les ATPases et les protéines chaperonnes sont en jaune. D'après Tseng et al., 2009.

#### II.4.2.1.2 Les vésicules de membrane externe

Chez les bactéries à Gram négatif, les ECPs sont composés d'une fraction soluble correspondant aux protéines sécrétées par des transporteurs membranaires, et d'une fraction membranaire correspondant à des vésicules de membrane externe dites OMVs pour « Outer Membrane Vesicles ». Les OMVs sont produites par bourgeonnement membranaire durant toutes les phases de croissance. Sortes de liposomes naturels, elles sont composées d'une bicouche lipidique dont la composition est celle de la membrane externe. Ces vésicules encapsulent le contenu périplasmique. La production d'OMVs est un phénomène régulé qui dépend par exemple de la température. Il existe aussi un contrôle génétique de la production d'OMVs qui chez *E.coli* et *V. cholerae* passe par  $\sigma E$  (McBroom and Kuehn, 2007; Davis and Waldor, 2009). Une des stratégies des bactéries pour répondre aux stress membranaires est la modulation du gène *rpoE* codant le facteur alternatif  $\sigma E$  qui induit l'expression de facteurs de préservation ou restauration de l'intégrité membranaire en conditions de stress. Les OMVs sont impliquées dans la sécrétion et la délivrance de protéines par lyse, par fusion membranaire ou par internalisation des vésicules (endocytose). Elles sont également impliquées dans la défense et la résistance bactérienne face aux phages et aux

agents membranolytiques, dans l'acquisition de nutriments, dans la formation de biofilms et dans la pathogénicité (Kulp and Kuehn, 2010).

Chez les bactéries pathogènes, les OMVs peuvent être associées à des toxines et des protéases et peuvent interagir avec la cellule hôte (adhérence, entrée, fusion) afin de moduler le système immunitaire (Ellis and Kuehn, 2010).

Chez *V. cholerae*, les OMVs sont capables d'activer le système immunitaire inné par l'activation de la voie NF $\kappa$ B comme observé dans différentes lignées cellulaires humaines (Bielig et al., 2011a). Il a également été montré que les OMVs de *V. cholerae* modulaient la réponse proinflammatoire et qu'elles étaient capables d'activer les cellules dendritiques (Chatterjee and Chaudhuri, 2013). *V. anguillarum* sécrète des OMVs qui stimulent la réponse immunitaire de poisson (Hong et al., 2009). Etant donné que ces vésicules sont composées de la membrane externe bactérienne, il n'est pas étonnant d'observer une stimulation du système immunitaire en réponse à la reconnaissance des PAMPs (LPS, PG) associés aux OMVs. Des données toutes récentes montrent que les OMVs de *V. cholerae* transportent la protéase PrtV, la cytolysine VCC et la toxine cholérique CT (Chatterjee and Chaudhuri, 2011; Elluri et al., 2014; Rompikuntal et al., 2014) et que celles de *V. vulnificus* délivrent des OMVs associées à la cytolysin-hémolysin VvhA aux cellules épithéliales (Kim et al., 2010). Des auteurs ont montré que la délétion de la porine OmpA de *V. cholerae* entraînait une hypervésiculation et que les OMVs du mutant diminuaient la viabilité des amibes ce qui vient soutenir le rôle des OMVs dans la délivrance de facteurs toxiques (Valeru et al., 2014). Récemment, le protéome des OMVs de *V. cholerae* a été réalisé dans des conditions où le pilus TCP est activé. Il a été montré que la protéine DegP, associée aux OMVs, était nécessaire à la colonisation de l'intestin de souris et à la formation de biofilms (Altindis et al., 2014). Les OMVs apparaissent donc comme un nouveau mode de sécrétion de facteurs de virulence.

#### **II.4.2.2 Les hémolysines**

Les hémolysines sont des enzymes extracellulaires, produites par les bactéries à Gram négatif et positif, qui détruisent les membranes plasmiques des cellules cibles. Parmi ces enzymes, on retrouve des enzymes formant des pores dans les membranes au niveau des bicouches de phospholipides (PFT - pore forming toxin) (Braun and Focareta, 1991; Welch, 1991) et d'autres qui hydrolysent les lipides. Les systèmes de sécrétion de type I délivrent des hémolysines (Thomas et al., 2014).

Les hémolysines sont largement répandues au sein des *Vibrio* pathogènes (Zhang and Austin, 2005). En effet, chez plusieurs espèces de *Vibrio*, on retrouve des cytolysines impliquées dans la lyse de plusieurs types cellulaires incluant les cellules de vertébrés, les érythrocytes ou les cellules du système immunitaire.

Chez les souches de *V. cholerae* El Tor O1 et non-O1, on retrouve l'hémolysine sécrétée HlyA, également connue sous le nom de VCC, qui entraîne une diarrhée chez des souris (Ichinose et al., 1987; Yamamoto et al., 1990b). Des hémolysines présentant les mêmes similitudes sont caractérisées chez d'autres espèces de *Vibrio* incluant *V. anguillarum*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. tubiashii* et *V. vulnificus*. La souche *V. parahaemolyticus* produit également des hémolysines thermostables directes (TDH), des hémolysines thermolabiles (TLH) et des hémolysines thermostables ( $\delta$ -VPH). Certaines d'entre-elles sont associées à la virulence de la bactérie. En effet, elles peuvent induire des dommages cytotoxiques, hémolytiques et entérotoxiques. L'hémolysine de *V. vulnificus*, VVH, lyse les érythrocytes de nombreuses espèces animales en formant des pores à la membrane cytoplasmique (Yamamoto et al., 1990a).

#### **II.4.2.3 Les phospholipases**

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides contribuant à la virulence de nombreux pathogènes bactériens (Songer, 1997). A ce titre, il existe une certaine redondance entre phospholipases et hémolysines. Chez *V. anguillarum*, le gène *plp* codant une phospholipase A2 est capable de lyser les cellules de poisson mais n'est pas nécessaire à la virulence (Li et al., 2013b). Chez *V. harveyi*, l'hémolysine VHH est une phospholipase B pour laquelle le changement d'un résidu (Ser153) entraîne une perte des capacités hémolytiques et de l'activité phospholipase, et de la virulence (Sun et al., 2007). *V. mimicus* produit une phospholipase A, PhIA, toxique pour les cellules de poisson après 2h d'exposition (Lee et al., 2002b). Chez *V. damsela*, on retrouve une phospholipase D qui lyse les erythrocytes (Kreger et al., 1987).

#### **II.4.2.4 Les protéases**

Les protéases sont considérées comme des facteurs de virulence importants chez les bactéries pathogènes au cours de leur processus infectieux (Goguen et al., 1995; Lantz, 1997; Lebrun et al., 2009; Frees et al., 2013). Elles peuvent induire des dommages tissulaires de manière directe ou indirecte, altérer les défenses de l'hôte et moduler le système immunitaire. La production d'enzymes extracellulaires telles que les protéases par des *Vibrio* pathogènes est largement observée (Shinoda and Miyoshi, 2011). Parmi les protéases bactériennes, on retrouve majoritairement des

métalloprotéases à zinc et des protéases à sérine qui ont été identifiées pour leurs rôles au cours du processus infectieux.

Chez *V. cholerae*, la protéase hémagglutinine (HA/P) (Wu et al., 1996) et la métalloprotéase PrtV (Vaitkevicius et al., 2008; Edwin et al., 2014) sont cytotoxiques pour les cellules épithéliales. La protéase HA est impliquée dans la maturation de la sous-unité A de la toxine cholérique (CT) (Booth et al., 1984) comme la sérine protéase VesB sécrétée par le système de sécrétion de type II (Sandkvist et al., 1993; Sikora et al., 2011). Certaines protéases de la famille des chymotrypsines sont ancrées à la membrane par leur glycosylphosphatidylinositol, un domaine transmembranaire C-terminal ou par un signal d'ancrage en N-terminal (Szabo and Bugge, 2011). Une nouvelle sérine protéase a pu être identifiée à partir d'une souche de *V. cholerae* délétée des métalloprotéases HA/P et PrtV. Cette dernière est impliquée dans la réponse hémorragique au niveau de l'intestin grêle distal du lapin (Syngkon et al., 2010).

Chez *V. parahaemolyticus*, on retrouve un homologue de PrtV mais cette enzyme possède une faible activité hémolytique (Lee et al., 1995). On retrouve également une protéase à sérine sécrétée (Ishihara et al., 2002) similaire à la protéase A de *V. metschnikovii* cytotoxique (Kwon et al., 1995). Cette protéase altère la croissance des cultures cellulaires, lyse les érythrocytes et induit une hémorragie des tissus et la mort des souris après injection (Lee et al., 2002a).

Chez *V. vulnificus*, alors que la protéase VVP entraîne des dommages tissulaires et des lésions hémorragiques (Shinoda and Miyoshi, 2011), la protéase VPM est cytotoxique pour les cellules de branchie du poisson et conduit à une hémorragie au niveau de la cavité péritonéale après infections expérimentales (Luan et al., 2007). Par ailleurs, la métalloprotéase VvpE est associée à la virulence (Ha et al., 2014). Cette bactérie sécrète également une sérine protéase VssA qui est similaire à une sérine protéase toxique de *V. parahaemolyticus* (Wang et al., 2008).

Parmi les autres espèces de *Vibrio*, *V. anguillarum* produit la métalloprotéase à zinc EmpA impliquée dans la pathogénicité et présentant des activités protéolytique et cytotoxique (Norqvist et al., 1990; Yang et al., 2007). *V. alginolyticus* produit deux protéases à sérine alcaline (Rui et al., 2008): la sérine protéase alcaline A (Deane et al., 1989) et une autre considérée comme une toxine létale pour les poissons et des crevettes (Lee et al., 1997; Balebona et al., 1998).

Comme détaillé dans le chapitre II.3 « Les Vibrios pathogènes de l'huître », de nombreuses protéases ont enfin été caractérisées chez les vibrios pathogènes d'huître dont *V. tubiashi*, *V.*

*aestuarianus*, et *V. tasmaniensis*. Elles jouent un rôle majeur dans la toxicité de leurs produits de sécrétion.

### **II.4.3 Résistance aux AMPs**

Les peptides antimicrobiens sont des éléments clés du système immunitaire exprimés, en particulier dans les phagosomes et les épithéliums. Vis-à-vis de ces effecteurs, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance parmi lesquels les pompes à efflux, qui permettent de les expulser de la cellule bactérienne, la sécrétion de protéases qui permettent de les dégrader, et la modification de la paroi bactérienne pour réduire l'interaction avec les AMPs (Yeaman and Yount, 2003; Otto, 2009).

#### **II.4.3.1 Modification de la membrane externe**

Etant donné que les interactions électrostatiques jouent un rôle crucial dans l'interaction des AMPs cationiques avec les membranes bactériennes, les bactéries ont développé des stratégies pour neutraliser les charges négatives des molécules de surface cellulaire avec des composants contenant des amines. Ainsi, pour résister aux AMPs, les bactéries à Gram négatif sont capables de diminuer la charge négative de leur membrane externe en transférant un phosphoethanolamine ou un aminoarabinose sur les groupes phosphates du lipide A du LPS (Needham and Trent, 2013).

Chez *V. cholerae*, une acetyltransférase, LpxN ou MsbB, contribue fortement à la résistance des souches El Tor contre une large gamme de peptides antimicrobiens incluant la Polymyxine B et la cathélicidine LL-37 en transférant une chaîne d'acides gras secondaire sur le lipide A penta-acylé (Matson et al., 2010; Hankins et al., 2011) (Figure 13). La modification du lipide A par une diglycine qui vient se greffer sur la chaîne d'acides gras secondaires est nécessaire à la résistance aux AMPs chez ce pathogène. Cette modification augmente de 100 fois la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la Polymyxine B sur *V. cholerae*. A ce jour, aucune étude n'a montré une éventuelle modification du LPS des *Vibrio* suite à une exposition à des doses sub-léthales d'AMPs cationiques. On ignore donc si la modification du lipide A est un mécanisme régulé.

#### **II.4.3.2 Induction de la réponse au stress de l'enveloppe**

La détection de stress membranaire, induit par les AMPs par exemple, est une étape importante pour réparer les dommages membranaires avant qu'ils ne soient irréversibles. Une des stratégies des bactéries pour répondre au stress membranaire repose sur l'expression du gène *rpoE*

codant le facteur alternatif  $\sigma E$  qui contrôle l'expression de facteurs qui préservent ou restaurent l'intégrité membranaire en conditions stressantes.

Chez *V. cholerae*,  $\sigma E$  joue un rôle dans la réponse au stress membranaire et dans la résistance aux AMPs. En effet, une déficience de  $\sigma E$  entraîne une forte sensibilité au peptide antimicrobien P2, un AMP dérivé de la BPI humaine. Chez *V. cholerae*, la porine OmpU contrôle  $\sigma E$  et contribue à la résistance aux AMPs (Mathur and Waldor, 2004; Mathur et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus pour la porine OmpU du pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 contre les AMPs de l'huître *Cg-Defm* et *Cg-BPI* (Duperthuy et al., 2010). Toutefois la résistance aux AMPs conférée par OmpU reste très inférieure à celle due à la modification de la membrane externe.

#### **II.4.3.3 Efflux des AMPs**

L'utilisation de pompes à efflux dans la résistance aux peptides antimicrobiens est maintenant démontrée chez diverses espèces bactériennes (Pidcock, 2006; Nikaido and Pages, 2012).

Chez *V. cholerae*, 4 pompes à efflux de type RND ont été décrites comme impliquées dans la résistance aux AMPs *in vitro* : VexAB, VexD, VexK et VexH (Bina et al., 2006; Bina et al., 2008). VexAB est la principale pompe impliquée dans la résistance aux AMPs. La CMI de la PmB diminue 4 fois avec le mutant délété de *vexB*. De plus, la CMI de la PmB contre le mutant *vexB* est comparable aux CMI obtenues avec des mutants délétés de tous les systèmes d'efflux RND, indiquant que VexAB est bien impliquée dans la résistance à la PmB. VexD, VexK et VexH participent à la résistance aux acides biliaries, aux détergents et aux antibiotiques, respectivement.

Chez *V. parahaemolyticus*, l'expression de diverses protéines membranaires est modulée en présence d'AMPs. Ainsi, la protéine TolC, qui participe à diverses pompes à efflux, est surexprimée en présence de pleurocidine, un AMP de poisson (Shen et al., 2010). Malheureusement, son rôle dans la résistance n'a pas été étudiée. Chez *V. vulnificus*, le gène *trkA* codant une pompe impliquée dans l'acquisition de  $K^+$  est impliquée dans la résistance à la PmB (Chen et al., 2004).

#### **II.4.3.4 Immunosuppression de la production d'AMPs**

Les *Vibrio* peuvent également réprimer la production d'AMPs. Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour faciliter l'invasion des tissus de l'hôte. *V. cholerae* est ainsi capable de réprimer l'expression de la cathélicidine LL-37 dans les cellules épithéliales de l'intestin (Chakraborty et al., 2008). De même, le pathogène de corail *V. coralliilyticus* réprime quant à lui l'expression de la

darmicorine, un AMP de corail, lors de son entrée dans les cellules de son hôte (Vidal-Dupiol et al., 2011).

### III. LA RESISTANCE/ECHAPPEMENT A LA PHAGOCYTOSE CHEZ LES BACTERIES PATHOGENES INTRACELLULAIRES

Au cours de l'évolution, un certain nombre de bactéries pathogènes ont développé des stratégies d'échappement à l'activité microbicide de la phagocytose. Certaines, pathogènes intracellulaires stricts ou facultatifs, sont même devenues spécialistes de ce mode d'infection, utilisant les phagocytes professionnels comme niche répliquative et parfois même comme un véritable cheval de Troie. Ainsi, on retrouve des bactéries qui interfèrent avec la capacité des phagocytes à les internaliser ou qui altèrent directement la phagocytose des macrophages et des neutrophiles (Rosenberger and Finlay, 2003; Thi et al., 2012).

Parmi les nombreuses bactéries intracellulaires, il est possible de citer entre autres les bactéries du genre *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Brucella*, *Coxiella*, *Legionella*, *Listeria*, *Shigella* et *Rickettsia*. (Diacovich and Gorvel, 2010) (Figure 15). Une fois internalisées, ces bactéries sont capables de survivre et de se répliquer dans les cellules de l'hôte. Pour cela, les bactéries peuvent soit établir une niche répliquative dans une vacuole, soit s'échapper dans le cytosol.

Etant donné l'importance de la phagocytose dans l'élimination de pathogènes, il n'est pas surprenant de trouver des pathogènes extracellulaires qui échappent à la reconnaissance des phagocytes (Kenneth, 2009). La stratégie la plus commune est l'inhibition de l'attachement. En effet, de nombreuses bactéries synthétisent des capsules polysaccharidiques pour empêcher la reconnaissance par les opsonines. D'autres bactéries expriment à leur surface des protéines inhibant la liaison avec les récepteurs (Flannagan et al., 2009; Flannagan et al., 2012). Quelques études ont montré que certains pathogènes comme *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. listonella* étaient capables d'échapper à la phagocytose des hémocytes de l'huître (Canesi et al., 2002). Chez *V. vulnificus*, il a été montré que la présence d'une capsule protégeait la bactérie de la phagocytose par des lignées cellulaires de type Hela et de la reconnaissance par les protéines du complément qui peuvent servir d'opsonine (Genthner et al., 1999; Park et al., 2006).



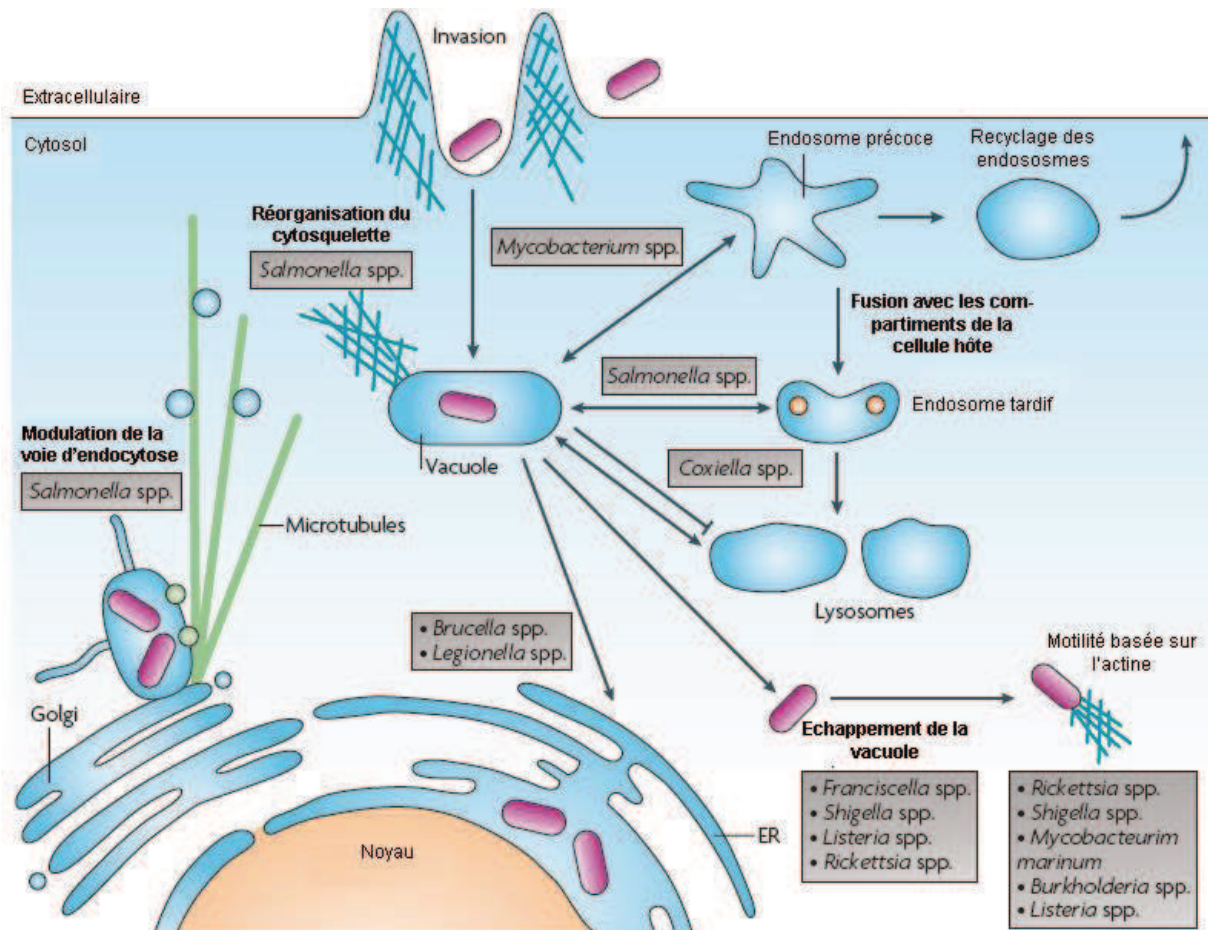


Figure 15. Les pathogènes intracellulaires.

La maturation du phagosome inclut de multiples interactions entre les compartiments de l'endocytose. Le phagosome fusionne avec les lysosomes pour former la phagolysosome, où se déroule la digestion des particules phagocytées. Les pathogènes ont développé différentes stratégies pour empêcher la dégradation dans le phagolysosome. Ainsi, on distingue la lyse de la membrane du phagosome suivi de l'évasion dans le cytosol avec l'évitement de l'autophagie; un retard de la maturation du phagosome facilitant le développement de la niche replicative; une déviation de la voie d'endocytose; et une survie dans l'environnement hostile du phagolysosome. Adapté de Diacovich and Gorvel, 2010.

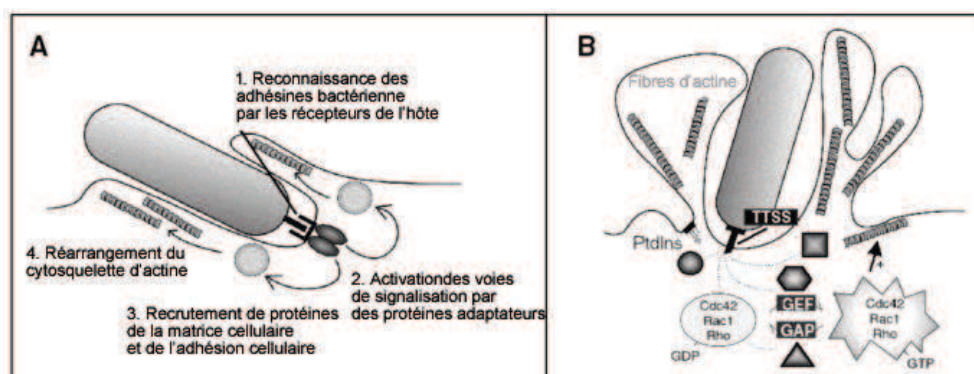
### III.1 ENTREE DANS LES CELLULES DE L'HOTE

Parmi les pathogènes intracellulaires, certaines bactéries sont internalisées par les phagocytes professionnels comme *Mycobacterium* (mécanisme passif) et d'autres envahissent des cellules non phagocytaires comme c'est le cas pour *Shigella* et *Listeria* (mécanisme actif) dans les cellules épithéliales.

Certains pathogènes intracellulaires, comme *Yersina*, *Listeria* et *Salmonella*, induisent leur propre internalisation dans les cellules non phagocytaires en détournant les voies de signalisation de l'hôte et utilisent les mécanismes d'invasion de type « zipper » ou « trigger » (Figure 16).

Le mécanisme « zipper » est semblable au processus de phagocytose. Il est initié par une ou plusieurs protéines de surface bactérienne (comprenant adhésines et invasines) qui se lient à des récepteurs membranaires spécifiques. Pour exemple, la bactérie à Gram négatif *Yersinia pseudotuberculosis* exprime deux adhésines, invasine et YadA, qui se lient aux intégrines  $\beta 1$  à la surface des cellules M situées dans l'épithélium intestinal de l'hôte (Isberg and Barnes, 2001). De même, la bactérie à Gram positif *Listeria monocytogenes* utilise deux internalines, InlA et InlB, qui se lient respectivement aux E-cadhérines des cellules épithéliales et aux récepteurs (Met) de facteurs de croissance des hépatocytes (HGF) (Lecuit et al., 2000; Khelef et al., 2006).

Le mécanisme de type « trigger » est utilisé par des bactéries à Gram négatif comme *Shigella flexneri* et des espèces de *Salmonella* (Cossart and Sansonetti, 2004). Une des caractéristiques de ce mécanisme est une réorganisation importante du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique (Cossart and Sansonetti, 2004). Dans ce processus, la mise en jeu de récepteurs membranaires de la cellule hôte pour l'adhésion des bactéries n'est pas obligatoire, en revanche il fait intervenir dans la plupart des cas des systèmes de sécrétion de type III (T3SS). Ces derniers injectent des protéines bactériennes dans le cytosol qui détournent les facteurs cellulaires de l'hôte pour induire le processus d'internalisation des bactéries par remodelage de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine. Pour exemple, on peut citer les protéines SipB et SipC de *Salmonella* et IpaB et IpaC chez *Shigella* nécessaires à la formation du T3SS (Galan, 2001; Sansonetti, 2001). Dans le cas de *Salmonella*, le remodelage de l'actine est dépendant des protéines SopE qui mime le facteur d'échange pour les Rho GTPases (Hardt et al., 1998); et SipA qui stabilise les filaments d'actine au point de contact entre la cellule de l'hôte et la bactérie (Zhou et al., 1999).



**Figure 16. Mécanismes d'entrée des bactéries dans les cellules de l'hôte.** (A) Mécanisme zipper: L'interaction entre les adhésines bactériennes et les molécules de surface de la cellule hôte active les voies de signalisation impliquées dans les réarrangements du cytosquelette d'actine. (B) Mécanisme trigger: La bactérie utilise un système de sécrétion de type III pour injecter des effecteurs qui vont moduler les facteurs de l'hôte impliqués dans la polymérisation de l'actine. D'après Alonso and Garcia-del Portillo, 2004.

Une fois internalisées, les bactéries se retrouvent localisées dans une vacuole appelée phagosome chez les phagocytes professionnels ou similaire au phagosome dans les cellules non-phagocytaires envahies (Haas, 2007). Certains pathogènes, comme *Legionella pneumophila* ou *Mycobacterium tuberculosis*, peuvent survivre dans cette vacuole en inhibant la fusion phagosome/lysosome ou en modifiant l'environnement à l'intérieur du phagosome (Flannagan et al., 2009). On parle alors de bactéries **intravacuolaires**. D'autres bactéries sont dites **cytosoliques**, comme *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium Marinum*, car elles sont capables de s'échapper du phagosome et de se multiplier dans le cytosol de la cellule hôte (Gaillard et al., 1991; Stamm et al., 2003).

## III.2 SURVIE ET MULTIPLICATION DANS LA CELLULE

### III.2.1 Pathogènes cytosoliques

L'échappement du phagosome est une étape essentielle pour la survie des pathogènes cytosoliques. Toutes utilisent des effecteurs moléculaires pour s'échapper du phagosome et se retrouver dans le cytosol où elles survivent et se multiplient (Hybiske and Stephens, 2008; Ray et al., 2009).

Ainsi, la bactérie à Gram positif *L. monocytogenes*, qui est phagocytée par les cellules non-phagocytaires et les phagocytes professionnels inhibe la maturation du phagosome (Hamon et al., 2006). Elle utilise une listeriolysine O (LLO), activée entre autre par l'acidification, pour créer des pores à la membrane du phagosome, ce qui inhibe la fusion phagosome/lysosome. Ce pathogène exprime également deux phospholipases de type C (PI-PLC et PC-PLC) entraînant la rupture de la membrane du phagosome et permettant à la bactérie de s'échapper de la vacuole (Portnoy et al., 2002).

L'échappement de la vacuole par la bactérie à Gram négatif *Shigella flexnerii* fait, quant à lui, intervenir le système de sécrétion de type III et les protéines IpaB, IpaC et IpaD, et plus particulièrement IpaC qui perturbe les membranes phospholipidiques après son insertion dans la membrane de liposomes (Schroeder and Hilbi, 2008). Un autre effecteur du T3SS, IpaH<sub>7,8</sub>, participe à l'échappement du phagosome mais son mécanisme d'action reste inconnu (Fernandez-Prada et al., 2000).

Enfin, des études récentes ont montré que *M. marinum* et *M. tuberculosis*, des pathogènes capables de survivre dans les phagosomes, étaient également capables de s'échapper du phagosome (Stamm et al., 2003; van der Wel et al., 2007; Simeone et al., 2012).

### **III.2.2 Pathogènes intravacuolaires**

De nombreuses bactéries intracellulaires survivent et se multiplient à l'intérieur de vacuoles. Ce mode de vie confère de nombreux avantages face aux défenses cellulaires de l'hôte mais il impose aussi d'importantes contraintes (Kumar and Valdivia, 2009).

#### **III.2.2.1 Altération de la maturation du phagosome**

Etant donné l'importance de l'acidification dans l'activité microbicide du phagosome, on retrouve de nombreux pathogènes intracellulaires qui ont développé des moyens d'éviter ou de retarder la maturation du phagosome, facilitant le développement de la niche répliquative (Luzio et al., 2007; Kinchen and Ravichandran, 2008).

Ainsi, on retrouve des bactéries qui inhibent la maturation du phagosome comme *M. tuberculosis* (Vergne et al., 2004; Soldati and Neyrolles, 2012), *Chlamydia trachomatis* (Belland et al., 2003) et *S. enterica* serovar Typhimurium (Garcia-del Portillo et al., 2008). Les vacuoles contenant *M. tuberculosis* et *M. marinum* présentent les caractéristiques du phagosome précoce et ne fusionnent pas avec les endosomes et les lysosomes (Chua et al., 2004). Chez *M. tuberculosis*, la délétion de la sérine protéase Rv3671c entraîne une diminution de la résistance au pH acide, un défaut du maintien du pH intrabactérien en présence d'acide *in vitro* et dans les macrophages activés. De plus, la croissance de ce mutant est fortement atténuée chez la souris (Vandal et al., 2008). *Salmonella*, quant à elle, inhibe la fusion avec les lysosomes et se maintient dans un compartiment similaire aux endosomes tardifs (Knodler and Steele-Mortimer, 2003). Pour cela, elle utilise la protéine SopE du T3SS de type 1 qui joue un rôle dans la formation de la vacuole contenant la bactérie et la protéine SipC du T3SS de type 2 qui inhibe la fusion avec les endosomes.

D'autres bactéries créent une niche répliquative acide comme *Coxiella burnetii* (Voth and Heinzen, 2007) et d'autres détournent la machinerie des compartiments intracellulaires comme *Legionella pneumophila* (Bruggemann et al., 2006) et les espèces de *Brucella* (Rittig et al., 2001). *Brucella* dévie la voie d'endocytose par fusion du phagosome avec le réticulum endoplasmique. Pour cela, elle modifie la composition lipidique et protéique de la vacuole pour faciliter la fusion avec les membranes du réticulum endoplasmique (Arellano-Reynoso et al., 2005).

*Legionella*, quant à elle, utilise le système de sécrétion de type IV pour sécréter des effecteurs qui vont lui permettre d'intercepter les vésicules exportées à partir du réticulum endoplasmique (Franco et al., 2009).

### III.2.2.2 Résistance aux ROS/RNS

En réponse à l'internalisation du pathogène, les cellules immunitaires de l'hôte produisent des espèces réactives toxiques pour la bactérie. La résistance au stress oxydant est donc essentielle à la survie intravacuolaire.

Ainsi, les pathogènes ont développé des mécanismes pour détoxifier les ROS et les RNS comme *S. enterica* serovar Typhimurium et *M. tuberculosis*. Beaucoup de bactéries résistent au stress oxydant grâce à des enzymes dites « scavengers » qui piègent et dégradent les ROS. La détoxification par des enzymes qui convertissent les ROS en des espèces moins toxiques est largement documentée pour les catalases, les superoxydes dismutases et les peroxidases (Figure 17).

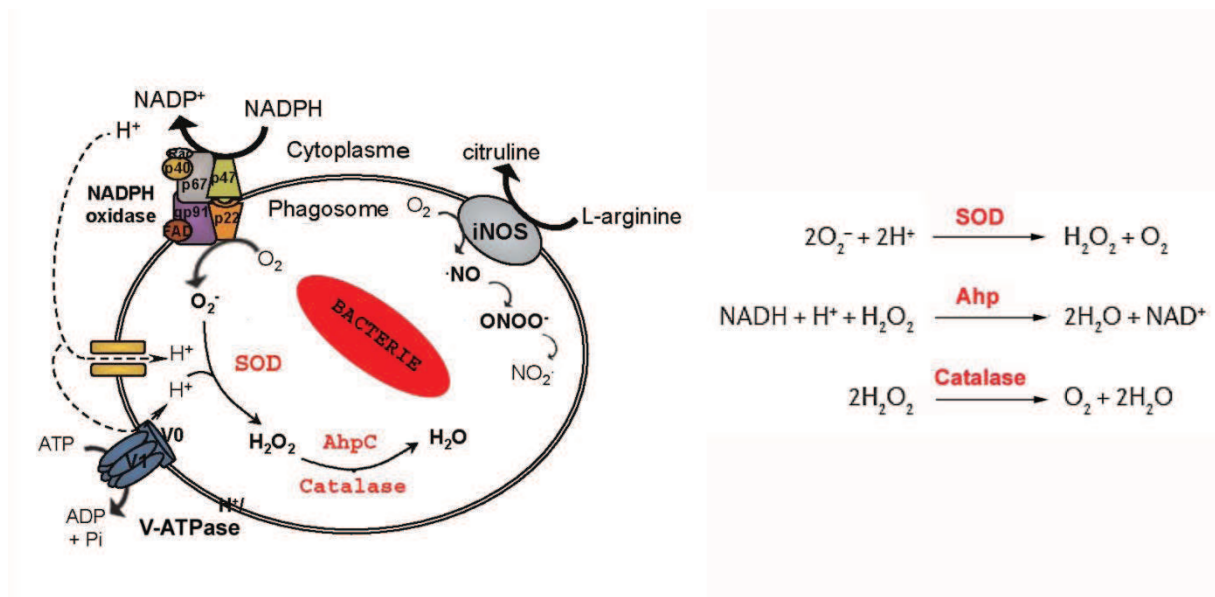


Figure 17. Schéma simplifié de la résistance des bactéries aux ROS et aux RNS dans les phagosomes et réactions enzymatiques catalysées par les enzymes SOD, catalase et Ahp.

La dismutation de l'ion hyperoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) est catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), ce qui a pour conséquence la synthèse de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de dioxygène (O<sub>2</sub>). Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peut être éliminé par la catalase ou l'alkylhydroperoxyde reductase (Ahp). L'Ahp utilisant le NADH+H<sup>+</sup> comme cofacteur. Deux molécules d'eau sont alors formées ainsi que du NAD<sup>+</sup>. La catalase utilise deux molécules de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour former de l'O<sub>2</sub> et deux molécules d'eau. SOD : superoxyde dismutase. AhpC : hydroxylperoxydase. Adapté de Forrellad et al., 2013; Imlay, 2013.

### III.2.2.2.1 Régulation de la réponse anti-oxydante

Deux systèmes de défense sont induits suite à un stress oxydant (Imlay, 2013). L'activation du système OxyR se fait par l'intermédiaire de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En réagissant avec cette molécule, OxyR se bloque dans une conformation qui lui permet d'agir comme un facteur de transcription pour les membres du régulon OxyR tel que *katG*, codant la catalase G, et *ahpCF*, codant une réductase peroxyrédoxine (Aslund et al., 1999; Choi et al., 2001). SoxRS est un facteur de transcription homodimère qui est oxydé par des composés redox auto-oxydables. Une fois activé, SoxR induit la transcription de Sox qui agit comme un second facteur de transcription qui se fixe sur les membres du régulon SoxRS tel que *sodA*, qui code une superoxyde dismutase (Greenberg et al., 1990; Tsaneva and Weiss, 1990; Pomposiello et al., 2001).

Ce système de réponse au stress antioxydant est retrouvé chez des pathogènes intracellulaires. Chez *Shigella*, la délétion des systèmes OxyR et SoxRS rend les bactéries plus sensibles au peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou aux ions superoxydes ( $O_2^-$ ) mais elle n'affecte pas la survie des bactéries dans les macrophages (Daugherty et al., 2012). Une autre étude chez *Salmonella* montre que la délétion de *soxRS* et *ramA* affecte la survie intracellulaire des bactéries mais pas la réplication *in vivo* (van der Straaten et al., 2004). Enfin, chez *M. tuberculosis*, il a été montré que *ahpC* pouvait également être régulée par *oxyR* (Springer et al., 2001).

OxyR est notamment présent chez *V. cholerae* où il joue un rôle primordial pour les défenses contre le stress oxydant (Wang et al., 2012b). Chez *V. harveyi*, la présence de ménadione induit l'expression de gènes du régulon SoxRS (*sod*) et OxyR (*katG* et *ahpC*) (Vattanaviboon et al., 2003). Chez *V. vulnificus*, il a été montré qu'une exposition au froid des bactéries induisait l'expression de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante, *oxyR* and *katG*, suggérant que la bactérie subit un stress oxydant après un choc thermique (Limthammahisorn et al., 2008, 2009). Récemment, une deuxième protéine *oxyR2* a été découverte chez *V. vulnificus*. Lorsque cette dernière est mutée, la cytotoxicité est réduite durant l'infection, indiquant son rôle important dans la pathogénicité (Kim et al., 2014). Il a également été montré qu'une lysine décarboxylase était régulée par *cadC* en réponse à un stress acide et par SoxR en réponse à un stress oxydant (Kim et al., 2006). De plus, l'augmentation du niveau de SOD par l'induction de la MnSOD par SoxR en présence de superoxyde serait essentielle à la virulence (Kang et al., 2007). Le stress oxydant de *V. vulnificus* se déclenche lorsque la bactérie est exposée à un pH acide et la MnSOD est induite par SoxR en conditions acides (Kim et al., 2005). La mutation de *oxyR* chez *V. cholerae* entraîne un défaut de colonisation chez la souris,

suggérant que *oxyR* est un élément clé de la réponse anti-oxydante. Ainsi, cette bactérie est capable de « piéger » des ROS de son environnement pour faciliter sa croissance (Wang et al., 2012b).

### III.2.2.2.2 Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) bactériennes éliminent l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) pour former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). On trouve 3 gènes codant des SOD au sein du génome d'*E.coli* : deux SOD cytoplasmiques utilisant comme cofacteur le manganèse (SodA ou MnSOD) ou le fer (SodB ou FeSOD) et une SOD à cuivre/zinc périplasmique (SodC ou Cu/ZnSOD) (Fee, 1991; Imlay and Imlay, 1996). Comme l'anion superoxyde ne passe pas au travers des membranes, ces diverses localisations subcellulaires permettent de protéger chaque compartiment de la cellule contre l' $O_2^-$ , où il se trouve (Imlay, 2013).

Chez *Salmonella*, de nombreuses protéines sont impliquées dans la résistance aux ROS (Linehan and Holden, 2003), incluant plus particulièrement, deux superoxydes dismutases, SodCI et SodCII, qui détoxifient les ROS. La délétion de *sodC*, un gène codant une SOD à cuivre/zinc périplasmique réduit la survie intracellulaire dans des macrophages murins activés et la virulence après une injection intrapéritonéale chez les souris (De Groot et al., 1997). De nombreuses espèces de *Mycobacterium* possèdent des SOD (Bartos et al., 2004). *M. tuberculosis* produit les superoxydes dismutases SodA qui utilisent le fer comme cofacteur et SodC qui utilise le cuivre et le zinc. La délétion de *sodC* ne réduit pas la survie intracellulaire dans des macrophages de souris (Dussurget et al., 2001) mais rend les mutants plus sensibles aux ions peroxydes et à la dégradation par les macrophages (Piddington et al., 2001). Ceci peut s'expliquer par un effet de compensation avec les autres SOD présentes chez la bactérie. On retrouve également des SOD à manganèse chez *M. leprae* et *M. smegmatis* (Bartos et al., 2004).

Des SOD à manganèse ont été caractérisées chez les *vibrios* (Kimoto et al., 2001). Une étude de Ju-Sim Kim de 2005 a montré l'implication d'une SOD à manganèse dans la résistance à l'acidité chez *V. vulnificus* (Kim et al., 2005). Chez *V. shiloi*, une SOD protège la bactérie du stress oxydant causé par une forte concentration en oxygène produite par les zooxanthelles qui sont des algues symbiotiques du corail (Banin et al., 2003). Chez les *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*, une superoxyde dismutase à manganèse, SodA, a également été caractérisée (Shyu et al., 1999; Shyu and Lin, 1999). *V. cholerae* possède 3 superoxydes dismutases (SodA/B/C) (Davies et al., 2011). Chez cette bactérie, la SOD à cuivre/zinc pourrait avoir un rôle protecteur contre les ROS produits par les phagocytes (Gabbianelli et al., 2004). Chez *V. vulnificus*, la délétion des 3 SOD (CuZnSOD, MnSOD,

and FeSOD) a montré que chacune contribuait à la survie des bactéries au stress oxydant des cellules hôtes (Kang et al., 2007).

### III.2.2.2.3 Les peroxyrédoxines ou alkylperoxydereductase (Ahp)

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré par la dégradation de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> via les SOD bactériennes ou massivement synthétisé dans le phagosome lors de la phagocytose reste très toxique que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour la cellule bactérienne. Chez *E. coli*, deux types d'enzymes réduisant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (non toxique) sont particulièrement bien décrites : les **peroxyrédoxines ou alkylperoxydereductase (Ahp)** et les **catalases**. Ce sont les seules enzymes pour lesquelles la fonction de piégeage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été démontrée de manière incontestable (Mishra and Imlay, 2012). Ahp appartient à la superfamille des peroxydases à thiol (ou Tsa). Chez *E. coli*, c'est en réalité un système de deux protéines, AhpC et AhpF qui adoptent des états multimériques. Ce système est semblable au système Tsa/thioredoxine des eucaryotes. Ce complexe utilise le NADH comme donneur d'électron pour réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en molécule d'eau.

Chez *M. tuberculosis*, il a été montré que AhpC jouait un rôle dans la réponse anti-oxydante induite par de la peroxy-nitrite (ONOO) et qu'elle était impliquée dans la survie intracellulaire de la bactérie dans des macrophages. En revanche, aucun effet n'est observé chez des macrophages activés par du LPS ou la cytokine INF $\gamma$  (Master et al., 2002). Ce gène *ahpC* est réprimé chez les mycobactéries virulentes en conditions anaérobiques dans les macrophages mais est activé dans l'organisme (Springer et al., 2001). Chez *Legionella pneumophila*, le gène *ahpC* est surexprimé en intracellulaire mais sa délétion n'affecte pas la croissance bactérienne dans les macrophages (Rankin et al., 2002).

Chez *V. harveyi*, une exposition à des doses sub-létales de peroxyde d'hydrogène induit l'expression de gènes de *ahpC* (Vattanaviboon and Mongkolsuk, 2001). Chez *V. vulnificus*, il a été montré que la délétion de la *ahpC1* diminuait la cytotoxicité *in vitro* sur des cellules épithéliales et que la virulence était atténuée *in vivo* chez la souris (Baek et al., 2009). Enfin, chez *V. parahaemolyticus*, il a été montré que des mutants délétés des deux gènes codant la AhpC étaient moins résistants au tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) et que seul le gène *ahpC2* conférait une protection contre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wang et al., 2013). Enfin, chez *V. cholerae*, la délétion du gène *ahpC* ne modifie pas la colonisation de l'hôte (Davies et al., 2011).



#### III.2.2.2.4 Les catalases

Deux familles de catalases sont décrites chez les bactéries selon la nature de leur cofacteur : les catalases à hème, utilisant le fer, et les catalases à manganèse. Ces dernières sont nettement moins répandues que les catalases à hème. Toutes deux agissent en deux étapes et utilisent respectivement le fer  $Fe^{3+}$  et le manganèse  $Mn^{2+}$  comme donneurs d'électrons (Mishra and Imlay, 2012). Le rôle de la catalase, dont le turn-over est plus rapide que celui des Ahp, serait prédominant lors d'exposition à de fortes concentrations de  $H_2O_2$ , lorsque la cellule n'est plus en mesure de fournir le NADH nécessaire à l'Ahp (Seaver and Imlay, 2001a, b). Les catalases à hème identifiées chez *E. coli* sont la catalase HPI codée par *katG* et la catalase HPII codée par *katE*. Une autre catalase est codée par *katF* (Milano et al., 1996). Les catalases HPI sont localisées dans l'espace périplasmique et à la membrane cytoplasmique. En revanche, les HPII sont localisées dans le cytoplasme de la bactérie (Heimberger and Eisenstark, 1988).

Dans le genre *Mycobacterium*, on retrouve trois types de catalases : la catalase thermolabile KatG (ou T-catalase), la catalase thermostable KatE (ou M-catalase) et la A-catalase décrite chez *M. avium* et *M. intracellulaire* (Bartos et al., 2004). Chez *M. bovis*, la catalase KatG joue un rôle dans la virulence de la bactérie (Wilson et al., 1995). Chez *M. tuberculosis*, le gène *katG* est nécessaire à la résistance à l' $H_2O_2$  et à la virulence chez des souris (Ng et al., 2004).

Chez *Salmonella*, on retrouve 3 gènes codant des catalases (KatE, KatG, and KatN). L'inactivation de ces gènes augmente la sensibilité à l' $H_2O_2$  et altère les capacités de survie des bactéries internalisées par les macrophages et la virulence *in vivo* (Hebrard et al., 2009).

Chez *V. cholerae* 2 catalases/péroxydases (KatB/PerA) ont été décrites (Wang et al., 2012b).

#### III.2.2.2.5 Autres mécanismes

Il existe d'autres mécanismes impliqués dans la résistance aux ROS/RNS. En voici quelques exemples. *Salmonella* utilise une glucose 6-phosphate déhydrogénase pour synthétiser du NADPH qui sera utilisé par des réductases impliquées dans la production de protéines antioxydantes comme la glutathione reductase, la thioredoxine réductase et des méthionines sulphydryl réductases (Lundberg et al., 1999). Récemment, il a été montré que le gène *sspJ* était impliqué dans la résistance au ROS *in vitro*, dans la virulence chez la souris et dans la survie intracellulaire chez des macrophages (van der Straaten et al., 2001).

Les bactéries peuvent également produire des “scavengers”. En effet, les peptides methionine sulfoxide réductases (MsrA) de *E. coli* et *M. tuberculosis* protègent les bactéries des dommages liés au stress oxydant (St John et al., 2001). *S. enterica* transloque des protéines bactériennes dans le cytosol du macrophage immédiatement après avoir été phagocyté. Ces protéines interfèrent avec la délivrance de ROS et de RNS dans la vacuole de phagocytose (Vazquez-Torres et al., 2000; Chakravorty et al., 2002). *Francisella* crée un phénotype qui stimule moins la production de RNS (Cowley et al., 1996). Les bactéries peuvent aussi inhiber les ROS/RNS. En effet, la protéine YopH de *Yersinia* semble inhiber la production de ROS (Bliska and Black, 1995). *Bordetella pertussis* inhibe le « burst » respiratoire en produisant la toxine adénylase cyclase et augmente le taux de cAMP.

### III.2.2.3 La résistance aux métaux

Les métaux comme le cuivre, le zinc, le fer et le manganèse sont des éléments nécessaires à la vie, essentiels au fonctionnement de nombreuses enzymes. Cependant, à fortes doses, les métaux tels que le cuivre et le zinc, peuvent être toxiques pour les bactéries. Les concentrations élevées auxquelles sont confrontés les pathogènes intracellulaires peuvent alors devenir critiques. Ainsi, les bactéries possèdent différents mécanismes pour maintenir leur homéostasie (pour revues voir Hood and Skaar, 2012; Porcheron et al., 2013) (Figure 18).

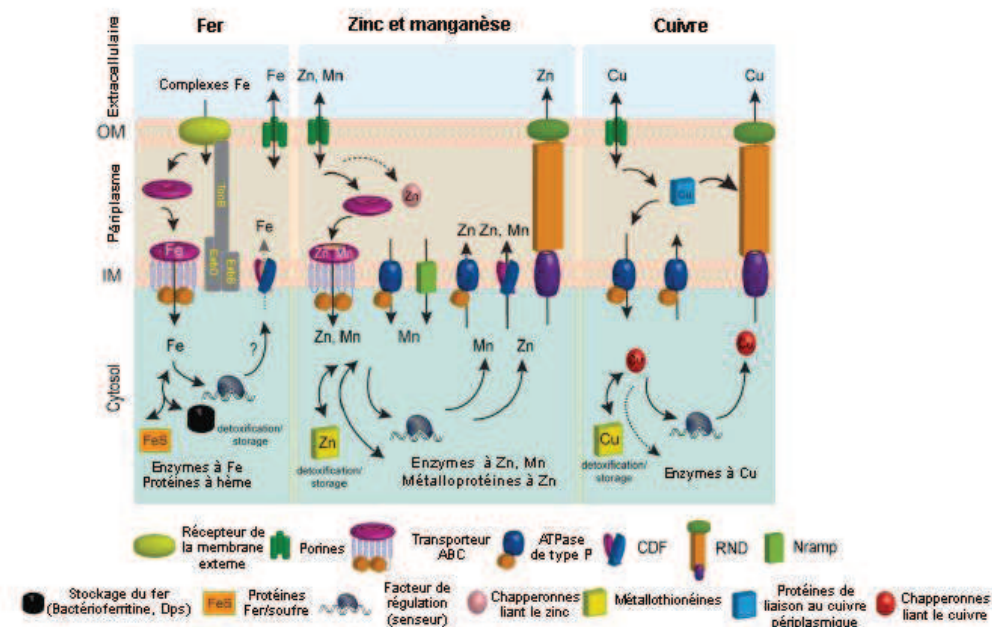


Figure 18. Modèle schématique de l'homéostasie du cuivre, du zinc, du fer et du manganèse chez les bactéries à Gram négatif.

IM : membrane interne, OM : membrane externe. D'après Ma et al., 2009b.

### III.2.2.3.1 L'homéostasie du cuivre chez les bactéries

Nous avons évoqué plus haut dans ce rappel bibliographique le rôle essentiel du cuivre au cours de la phagocytose. Les principaux systèmes impliqués dans l'homéostasie des bactéries à Gram négatif pour le cuivre sont les ATPases comme CopA, les systèmes RDN (résistance-nodulation-cell division) comme CusCFBA et les « multi-copper oxydases » périplasmiques comme CueO (Rademacher and Masepohl, 2012). Ces effecteurs sont régulés au niveau transcriptionnel par des systèmes à un ou deux composants capables de répondre aux concentrations en cuivre (Ma et al., 2009b) (Figure 19).

#### III.2.2.3.1.1 Les systèmes régulateurs de résistance au cuivre

Chez les bactéries exposées à de fortes concentrations en cuivre, l'homéostasie du cuivre est contrôlée à différents niveaux. Le cuivre dans ses différents états d'oxydation,  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$ , est capable de traverser la membrane externe et de rentrer dans le périplasme probablement grâce à des porines. En revanche, seul  $\text{Cu}^+$  est capable de traverser la membrane interne pour enrichir le cytoplasme. Chez *E. coli*, un des éléments capables de réduire la perméabilité des membranes au cuivre est ComC, une protéine de la membrane externe (Mermod et al., 2012).

Une fois dans la cellule, l'efflux du cuivre est largement contrôlé par le **système régulateur Cue (Cu-efflux)**. Le système *cue* est basé sur une protéine régulatrice activée par le cuivre, le **système à un composant CueR**, appartenant à la famille des protéines MerR. CueR comporte 3 domaines : un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison aux métaux (Changela et al., 2003). CueR active la transcription de deux gènes : *copA* et *cueO* (Samanovic et al., 2012; Outten et al., 2001; Stoyanov et al., 2001), qui codent respectivement pour CopA, une ATPase de type P localisée à la membrane interne et impliquée dans l'export de cuivre  $\text{Cu}^+$ , et CueO, une multicopper oxydase périplasmique (nommée aussi CuiD chez *Salmonella*) qui assure la conversion du  $\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ , moins toxique pour la cellule. CueR contrôle également sa propre transcription. Comme pour CopA, l'expression d'ATPases de type P par des régulateurs à un composant comme CueR existe chez de nombreuses bactéries à Gram négatif.

A l'inverse de CueR, des répresseurs de la réponse au cuivre contrôlent négativement l'expression des ATPases de type P lors de concentration limitante en cuivre (pour revue voir Rademacher and Masepohl, 2012). On peut notamment citer CopY chez *Enterococcus hirae* et CsoR chez *M. tuberculosis*. Ainsi, chez *M. tuberculosis*, l'ATPase de type P CtpV est réprimée par CsoR (Liu

et al., 2007). CsoR est aussi retrouvé chez de nombreuses bactéries à Gram positif incluant *L. monocytogenes* (Liu et al., 2007).

Le contrôle de l'efflux du cuivre peut également être effectué par des **systèmes à deux composants comme CusRS** de *E. coli* qui répond à la concentration périplasmique en  $\text{Cu}^+$  (Munson et al., 2000; Yamamoto and Ishihama, 2005). Chez *E. coli*, CusRS contrôle l'expression de l'**opéron cus (Cu-sensing)** en activant l'expression de *cusCFBA* après une forte exposition en cuivre. Celui-ci code un transporteur permettant l'efflux du cuivre vers l'espace extracellulaire. CusS, situé à la membrane cytoplasmique, est capable de détecter le cuivre périplasmique. Après avoir lié le  $\text{Cu}^+$ , CusS active le régulateur transcriptionnel CusR par transfert de phosphate qui à son tour active la transcription de *CusCFBA* et de l'opéron CusRS lui-même (Gudipaty et al., 2012). Chez *Klebsiella pneumoniae*, le système *cus* est suractivé en conditions anaérobiques (Zulficar and Shakoori, 2012). CueR est activé à des concentrations en cuivre de  $10^{-21}$  M (Changela et al., 2003).

#### III.2.2.3.1.2 Les systèmes d'efflux de cuivre

##### a) Les ATPases de type P<sub>1B</sub>

Bon nombre de bactéries utilisent des ATPases de type P, une famille de transporteurs activés par l'hydrolyse de l'ATP comme principal mécanisme de contrôle face à des concentrations en cuivre excessives (Arguello et al., 2011). Parmi les plus étudiées, on peut citer **CopA** chez *E. coli* (Rensing et al., 2000) et CtpV et CtpC pour *M. tuberculosis* (Neyrolles et al., 2013).

Chez *E. coli* et *Salmonella*, la mutation de *copA* rend ces deux bactéries plus sensibles au cuivre (Outten et al., 2001; Espariz et al., 2007). Un mutant déficient pour le transporteur CopA chez *E. coli* est également plus sensible à la dégradation par les macrophages (White et al., 2009). Chez la bactérie à Gram positif *L. monocytogenes*, la délétion de *copA* entraîne une forte sensibilité au cuivre mais la virulence n'est pas atténuée (Corbett et al., 2011).

Chez *M. tuberculosis*, le gène codant pour CtpV, un transporteur de cuivre, est induit suite à une exposition au cuivre et le mutant délété de cette ATPase de type P est fortement sensible au cuivre (Ward et al., 2010). L'expression de *ctpV* est aussi induite lors d'une infection pulmonaire par *M. tuberculosis* chez la souris, suggérant l'importance de cette ATPase dans la virulence (Ward et al., 2010). L'importance d'un autre transporteur de cuivre, MctB, dans la virulence a également été montrée (Wolschendorf et al., 2011).

## b) Les systèmes d'efflux de type RND

De nombreuses bactéries utilisent des systèmes d'efflux de type RND (résistance-nodulation-division cellulaire) pour contrôler leur concentration en cuivre et zinc intracellulaire (Nies, 2003). Le système **CusABC** d'*E.coli* correspond à ce modèle. Il s'agit d'un complexe composé d'une protéine localisée à la membrane interne et impliquée dans la résistance aux métaux lourds (CusA), d'une protéine de fusion membranaire (CusB) et d'un facteur de membrane externe (CusC). Le substrat est un ion ou un groupe de métaux lourds. Ce complexe forme ainsi un canal à travers l'espace périplasmique. Il peut exporter le cuivre depuis le cytoplasme ou le périplasma via l'intermédiaire de CusF. La protéine chaperonne CusF peut en effet lier le cuivre périplasmique et le délivrer aux systèmes CusABC pour être exporté (Franke et al., 2003; Loftin et al., 2005; Mealman et al., 2012). Le système CusCFBA est très important pour la résistance des bactéries à de fortes concentrations en cuivre en conditions anaérobiques. Néanmoins, pour que la tolérance au cuivre soit complète, il faut également CopA et CueO (Rensing and Grass, 2003).

### *III.2.2.3.1.3 L'oxydation du cuivre*

Le  $\text{Cu}^+$  étant plus toxique que le  $\text{Cu}^{2+}$  en conditions anaérobiques (Macomber and Imlay, 2009), les bactéries utilisent des multi-copper oxydases capables d'oxyder le cuivre toxique en sa forme moins toxique. Chez *E. coli*, c'est CueO (cuprous oxidase) qui assure cette fonction. La structure de CueO est similaire à celle des « **multi-copper oxydases** » qui oxydent leur substrat en utilisant des équivalents ionisés de molécules d'oxygène (Outten et al., 2001). La présence d'oxygène est en effet indispensable pour l'activité de ces oxydases qui sont inactives en conditions anaérobiques. Le site actif de CueO peut contenir jusqu'à 2 atomes de cuivre (Roberts et al., 2002). Chez *E. coli* et *S. enterica* serovar Typhimurium, il a été montré que des mutants *cueO* étaient très sensibles au cuivre et que CueO contribuait à la virulence de *S. enterica* serovar Typhimurium lors d'infection de souris (Achard et al., 2010). La mise en évidence d'une forte activité de CueO *in vitro* laisse penser qu'il puisse jouer un rôle dans la résistance au cuivre *in vivo* (Singh et al., 2004).

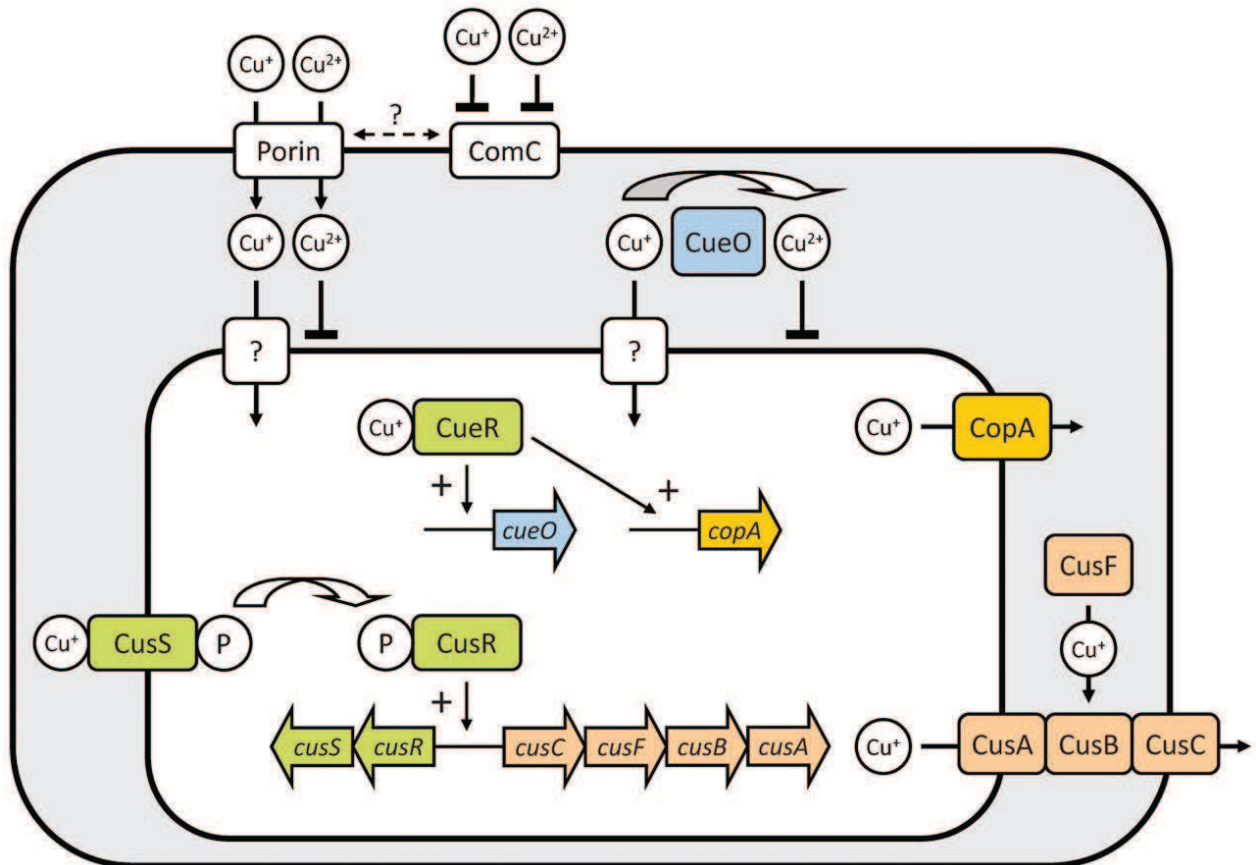


Figure 19. Homéostasie du cuivre chez *E. coli*.

Les ions  $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$  traverse la membrane externe via des porines pour se retrouver dans le périplasma (gris). Les ions  $\text{Cu}^+$  sont capables de traverser la membrane interne. L'export de cuivre du cytosol vers le périplasma fait intervenir l'ATPase CopA. L'export du  $\text{Cu}^+$  du cytosol vers le milieu extérieur se fait par le transporteur CusABC. L'oxydation du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  dans le périplasma se fait par une oxydase à cuivre CueO. En présence de  $\text{Cu}^+$ , la protéine CueR active la transcription de *cueO* et *copA*, et CusR la transcription de *cusRS* et *cusCFBA*. D'après Rademacher and Masepohl, 2012.

### III.2.2.3.2 L'homéostasie du zinc chez les bactéries

Les principaux systèmes impliqués dans l'acquisition du zinc à la membrane interne des bactéries à Gram négatif sont les transporteurs de type ABC. Concernant ceux impliqués dans l'efflux de zinc, on retrouve, comme pour le cuivre, des ATPases de type I<sub>B</sub>, des transporteurs de type CDF (Cation Diffusion Facilitator), RND (Resistance Nodulation Division) et MDF (Membrane Diffusion Facilitator). Certains de ces transporteurs sont régulés au niveau transcriptionnel par des protéines capables de répondre à la concentration en zinc (Ma et al., 2009b) (Figure 20).

#### III.2.2.3.2.1 Les systèmes régulateurs du zinc

Comme le cuivre, l'homéostasie du zinc est contrôlée à différents niveaux. Chez les bactéries à Gram négatif, le zinc est retrouvé sous la forme  $\text{Zn}^{2+}$  dans le périplasma et le cytoplasme.

Une fois dans la cellule, l'efflux du zinc est contrôlé par la protéine **ZntR**, appartenant à la famille des protéines MerR (décrite plus haut). La protéine ZntR possède la même structure et la même fonction que CueR ; ce sont toutes les deux des facteurs de transcription. Chez des bactéries *E. coli* exposées à de fortes concentrations en zinc, l'expression de l'ATPase ZntA est contrôlée par l'intermédiaire de ZntR (Wang et al., 2012a).

Par ailleurs, la régulation des systèmes impliqués dans l'influx du zinc est régulée par **Zur**, appartenant à la famille des protéines Fur, et **SoxR**, appartenant à la famille MerR. L'expression des gènes *znuABC* se fait par l'intermédiaire de Zur et SoxR chez *E. coli* et *Yersinia pestis*, respectivement (Li et al., 2009; Warner and Levy, 2012). Chez *S. enterica* serovar Typhimurium, il a été montré que la délétion de *zur* entraînait une diminution de la virulence par injection intrapéritonéale des bactéries mutantes chez des souris. En revanche, aucun effet n'a été observé concernant l'attachement à des cellules épithéliales ou la survie dans des macrophages (Campoy et al., 2002). Les facteurs de transcription ZntR et Zur sont activés par des concentrations en zinc allant jusqu'à  $10^{-15}$  M.

#### III.2.2.3.2.2 Import de zinc

Parmi les systèmes d'import du zinc chez *E. coli*, on retrouve le transporteur de type ABC, **ZnuABC**, qui transporte le zinc du périplasme vers le cytosol. Ce dernier est constitué d'une protéine périplasmique liant le zinc, ZnuA, une protéine transmembranaire ZnuB et une sous-unité utilisant l'hydrolyse de l'ATPase ZnuC (Hantke, 2005). Chez *M. tuberculosis*, aucun système d'influx de zinc n'a été identifié à ce jour. En revanche, il possède la protéine Zur qui régule la transcription de 3 gènes potentiellement impliqués dans l'import de zinc (Maciag et al., 2007). Chez *S. enterica* serovar Typhimurium, il a été montré que la délétion de *znuC* entraînait une diminution de la virulence chez des souris par injection intrapéritonéale ou ingestion des bactéries mutantes. En revanche, aucun effet n'a été observé concernant l'attachement à des cellules épithéliales ou la survie dans des macrophages (Campoy et al., 2002). Chez *Salmonella enterica*, il a été montré que *znuA* était fortement exprimé en condition intracellulaire et que la délétion de *znuA* entraînait un défaut de multiplication dans des cellules épithéliales et une diminution de la virulence chez la souris (Ammendola et al., 2007). Enfin, on retrouve la protéine périplasmique liant le zinc, ZinT, qui participe à l'acquisition du zinc via ZnuABC chez *S. enterica* serovar Typhimurium; et la zinc perméase **ZupT** appartenant à la famille ZIP qui est exprimée de manière constitutive chez *E. coli* (Grass et al., 2005a; Gabbianelli et al., 2011).

### III.2.2.3.2.3 Export de zinc

Chez *E. coli*, l'export de zinc extracellulaire dans le cytoplasme se fait principalement via l'ATPase de type P, **ZntA**, et le système d'efflux de type CDF, **ZitB** (Binet and Poole, 2000; Grass et al., 2001; Grass et al., 2005b; Cui et al., 2008; Wang and Fierke, 2013). Chez *M. tuberculosis*, l'export de zinc se fait par une ATPase nommée CptV (Botella et al., 2011). La délétion du gène *zntA* et de *ctpC* chez *E. coli* et *M. tuberculosis*, respectivement, s'accompagne d'une diminution de la survie dans les macrophages (Botella et al., 2011). Des auteurs ont montré que l'ATPase CtpC exportait de préférence le  $Mn^{2+}$  que le  $Zn^{2+}$  (Padilla-Benavides et al., 2013).

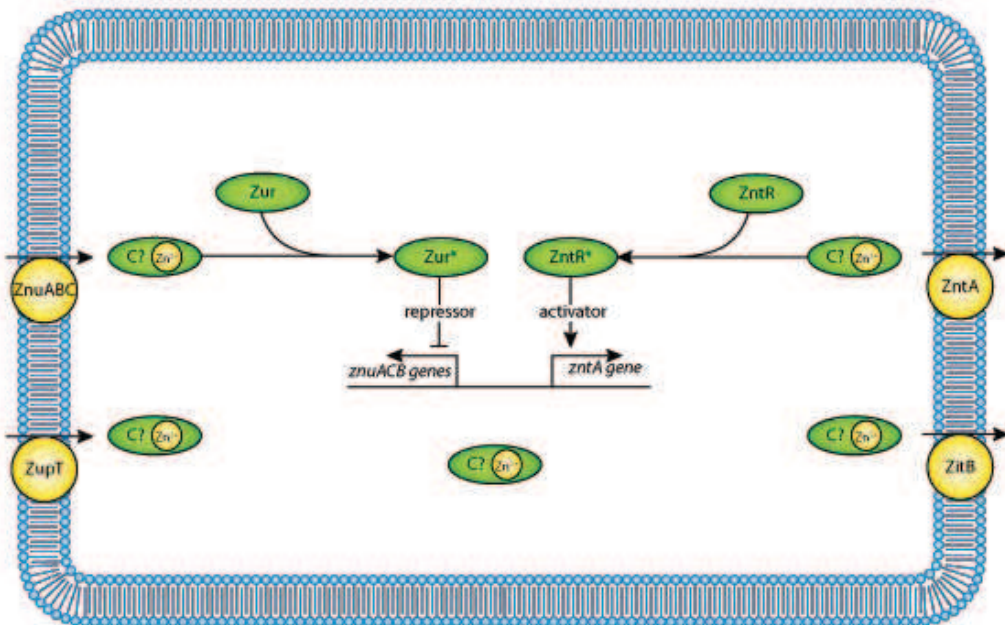


Figure 20. Homéostasie du zinc chez *E. coli*.

Le  $Zn^{2+}$  extracellulaire entre dans le cytoplasme via ZnuABC et ZupT. L'export de zinc se fait par ZntA et ZitB. Une protéine chaperonne C est probablement impliquée dans le trafic intracellulaire de  $Zn^{2+}$ . En présence de  $Zn^{2+}$ , la protéine Zur réprime la transcription de *znuABC* et ZntR et active la transcription de *zntA*. D'après Cui et al., 2008.

### III.2.2.3.3 L'homéostasie du fer et du manganèse chez les bactéries

Les bactéries intracellulaires requièrent la présence de fer et de manganèse pour le bon fonctionnement de leurs enzymes comme celles impliquées dans la réponse anti-oxydante, les Mn-SOD et des Fe-SOD. Ainsi, on retrouve de nombreux transporteurs de type ABC à la membrane interne, des transporteurs de sidérophores à la membrane externe et des systèmes à 3 composants dépendant de TonB.



### III.2.2.3.3.1 Les systèmes de régulation du fer et du manganèse

Chez les bactéries, le fer est présent sous deux états d'oxydation  $Fe^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ . Ces derniers sont capables de traverser la membrane externe et la membrane interne pour se retrouver dans le cytosol de la bactérie. Chez *E. coli*, l'homéostasie du fer est contrôlée par le régulateur de transcription **Fur** (Chen et al., 2007b). Chez *S. enterica* serovar Typhimurium, il a été montré que la délétion de *fur* entraînait une diminution de la virulence chez des souris par injection intrapéritonéale ou par ingestion des bactéries mutantes. En revanche, aucun effet n'a été observé concernant l'attachement à des cellules épithéliales ou la survie dans des macrophages (Campoy et al., 2002). On peut également retrouver d'autres régulateurs de la synthèse et du transport de certains sidérophores. On peut citer le régulateur de transcription YbtA qui régule les gènes codant la yersiniabactine (Perry and Fetherston, 2011).

La régulation de l'efflux de manganèse se fait par des régulateurs de transcription **DtxR** de la famille MntR (Ma et al., 2009b). DtxR réprime l'expression des systèmes d'efflux MntH et SitABCD suite à l'exposition de la bactérie à de fortes concentrations en manganèse chez *E. coli* et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium respectivement (Patzner and Hantke, 2001; Ikeda et al., 2005). Chez *S. enterica* serovar Typhimurium et *Shigella*, OxyR régule également MntH en conditions oxydantes (Modi et al., 2011). Fur et MtnR sont activés par le fer à  $10^{-6}$  M et le Mn à  $10^{-5}$  M, respectivement.

### III.2.2.3.3.2 L'influx et l'efflux de fer et de manganèse

Parmi les systèmes d'influx du manganèse chez les entérobactéries, on retrouve principalement des transporteurs appartenant à la famille **NRAMP** et des transporteurs de type ABC (Goswami et al., 2001; Forbes and Gros, 2003). Concernant l'efflux de manganèse, la seule protéine connue a été identifiée chez *E. coli*, il s'agit de MntP (Waters et al., 2011). Chez *S. enterica* serovar Typhimurium, il a été montré que *sitA* codant un composant du transporteur SitABC et *mntH* sont surexprimés après internalisation dans des macrophages (Zaharik et al., 2004). De plus, la délétion des gènes *sitABC* et du gène *mntH* codant un homologue de NRAMP entraîne une diminution de la survie intracellulaire dans des macrophages *Nramp*<sup>-/-</sup> (Boyer et al., 2002).

Concernant le fer et son importance pour les bactéries, une multitude de mécanismes d'acquisition ont pu être identifiés. On retrouve majoritairement des transporteurs de types ABC pour le  $Fe^{3+}$  et le  $Fe^{2+}$  mais également des sidérophores en grande quantité (aérobactine, yersiniabactine, entérobactine, mycobactines) capables de se lier au fer et l'importer via des récepteurs membranaires dédiés à la membrane bactérienne (Braun, 2001; Botella et al., 2012).

Tous ces systèmes d'efflux ou d'influx de métaux peuvent participer à la survie intravacuolaire. En effet, les macrophages peuvent à la fois charger les phagosomes en cuivre et zinc pour y exercer une activité toxique mais également les priver de fer et de manganèse pour limiter leur prolifération. L'homéostasie des métaux est ainsi déterminante pour la capacité de survie des pathogènes intracellulaires.



**CHAPITRE II**

**RESULTATS**



## SECTION A

**V. tasmaniensis LGP32 sécrète des OMVs**  
**qui le protègent**  
**contre les peptides antimicrobiens**  
**et délivrent des facteurs de virulence aux**  
**cellules immunitaires de l'hôte**

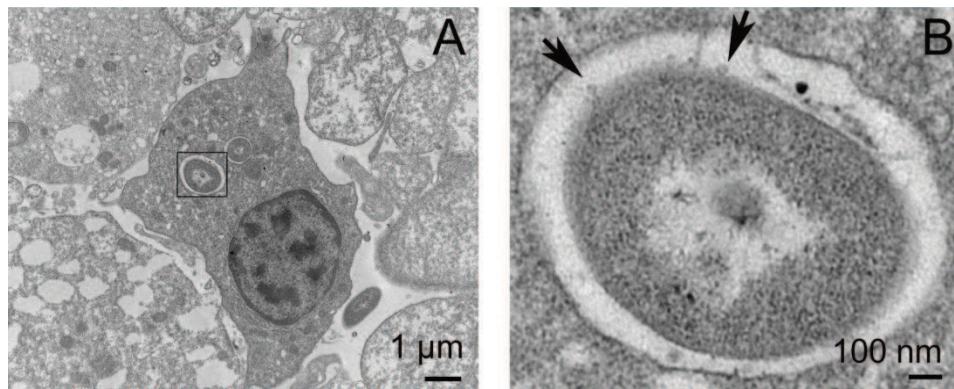


## CHAPITRE II: RESULTATS

### Section A.

#### ***V. tasmaniensis* LGP32 sécrète des OMVs qui le protègent contre les peptides antimicrobiens et délivrent des facteurs de virulence aux cellules immunitaires de l'huître.**

Afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le processus infectieux de *V. tasmaniensis* LGP32, nous avons réalisé des observations ultrastructurales du *Vibrio* dans les hémocytes. De manière très intéressante, nous avons observé la présence de petites vésicules produites par les vibrios LGP32 à l'intérieur du phagosome (Figure 21), laissant envisager qu'elles pourraient jouer un rôle dans la sécrétion d'effecteurs moléculaires bactériens impliqués dans la survie intracellulaire et/ou la virulence.



**Figure 21. Contact *in vitro* des hémocytes de l'huître *C. gigas* avec *V. tasmaniensis* LGP32 après 30 minutes à une MOI (rapport bactéries/hémocytes) de 50:1. (A) Hémocyte contenant des *Vibrio*. (B). Agrandissement de LGP32 intracellulaire. Les flèches indiquent des vésicules qui se détachent de la membrane externe du *Vibrio*.**

La production de vésicules de membrane externe (OMVs) est aujourd'hui rapportée chez de nombreuses espèces de bactéries à Gram négatif. Plusieurs études ont montré l'implication de ces vésicules dans la sécrétion et la délivrance de facteurs de virulence chez des bactéries pathogènes telles que des toxines, des hémolysines ou des métalloprotéases (Ellis and Kuehn, 2010). Toutefois, l'association de facteurs de virulence aux OMVs des *Vibrio* reste peu étudiée.



Nous nous sommes donc intéressés au rôle des OMVs dans la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32. Des travaux précédents avaient montré que les produits de sécrétion extracellulaire (ECPs) étaient toxiques pour les huîtres et qu'une métalloprotéase sécrétée, la Vsm, en était le principal facteur de toxicité (Le Roux et al., 2007; Binesse et al., 2008). La fraction vésiculaire des ECPs n'avait jamais été étudiée jusqu'à présent. Nous avons donc isolé les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 et réalisé une analyse protéomique globale afin d'identifier des facteurs de virulence potentiels impliqués dans la pathologie et les effets cytopathiques observés. Un focus particulier a été fait sur les protéases encapsulées et leur rôle dans la virulence de LGP32 chez l'huître.

Nous avons également étudié la participation des OMVs dans la résistance de LGP32 aux AMPs, ce qui apparaissait comme essentiel à la survie de *V. tasmaniensis* LGP32 dans les phagosomes des hémocytes de l'huître *C. gigas*. En effet, les travaux antérieurs de l'équipe avaient montré que des AMPs sont non seulement exprimés par de nombreux épithelia de l'huître mais aussi, et essentiellement, par les hémocytes (Schmitt et al., 2012c). De manière intéressante, *V. tasmaniensis* LGP32 résiste à des concentrations élevées de ces AMPs, allant jusqu'à 20 $\mu$ M. Au delà des AMPs produits par l'huître elle-même, Fleury et collaborateurs ont montré que des AMPs étaient aussi produits par des bactéries de la flore commensale de l'huître, notamment par des souches de *Pseudoalteromonas* présentes dans l'hémolymphe des huîtres (Defer et al., 2009). Ainsi, au-delà de la survie intrahémocytaire, la résistance aux AMPs peut être essentielle à la colonisation des tissus épithéliaux de l'huître et de son hémolymphe. Afin de déterminer le rôle potentiel des OMVs dans la résistance aux AMPs, nous avons réalisé des tests antimicrobiens avec la PmB avec ou sans OMVs. Dans un second temps, nous avons suivi le devenir de cet AMPs en présence d'OMVs.

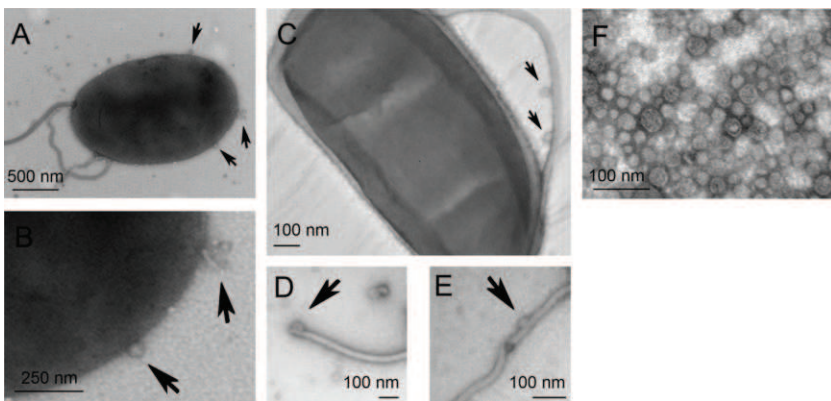
#### **Publication 1 :**

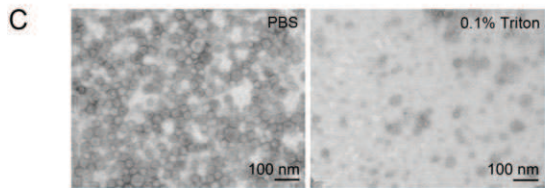
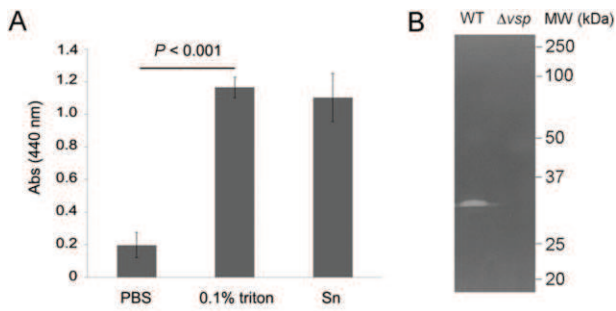
Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication n°1 :

Audrey Sophie Vanhove, Marylise Duperthuy, Guillaume M. Charrière, Frédérique Le Roux, David Goudenège, Benjamin Gourbal, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Yohann Couté, Sun Nyunt Wai, Delphine Destoumieux-Garzón, 2014, "**Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells**" *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.12535 (Epub ahead of print).









```

Vsp  MNVNHTMSPVRKAVLGLLAPLIYTSVMA1TENSVESAPNVGVSPIYVNGS  50
VesA  MRK---WLWLLLLL1TRVSAVE-----ISPIYVNGT  28
      : ** * * : * : * * * : : * * * * * :

```

```

Vsp  NASVTDPPSMASLFIDRIDYDGVYSTGSGCATILDPSHVLTA1AIYIGD  100
VesA  NANVANYPSFASLAIYISPYQ--YSSGTYCGATVLSRYILTA1AIYGN  76
      ** * : : * : * * * * * * : * : * : * * * * * : : * * * * * * :

```

```

Vsp  EEQQLFTVVVPQIEDTSQFPKGNIQKARVSEVYYPDSYSD1EISDFLR1NI1  150
VesA  SYTMLYTVVVPQLEDESQFPNGNVQLARAAEFYYPDNYVDSSAVYWP1NI1  126
      * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * : : * * :

```

```

Vsp  AILKLESALNVDSINDVVKRPSNETYR1NAASDFVAVGHGNTR1TGFDGTTL  200
VesA  AIKLES1DLNVS1NFVGLN1SSINNSY-DENGTYKAIGHGYVNGNVAGGTR  175
      ** : * * * * * * * : : * : : * : : * : : * * * * * : : * *

```

```

Vsp  LQKVTLAYVDNTTCKNAFTGKDNPNPPLTGKQICFTGDFNIFTSLY1GSTC  250
VesA  LLETTLTFVPPFATCS-AYYGAN----LGP1GHVCFTG--PQIGSYRNSTC  217
      * : * : * * : * * * * : * : * : * * * * : * * * *

```

```

Vsp  QGD1SGGPVYWKDGS1SDYRQVIGITSFGPATCGGNSV-VTSVFTEIYD1RDWI  299
VesA  SGD1SGGPVYWD1SGGYVQIGITSFGPSTCGNPALP1TVSVFTEVSDY1YSWI  267
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

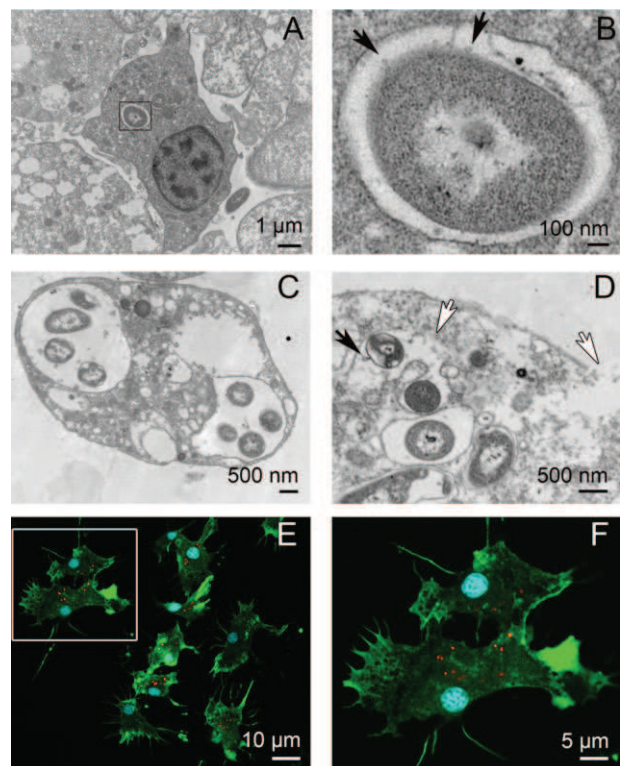
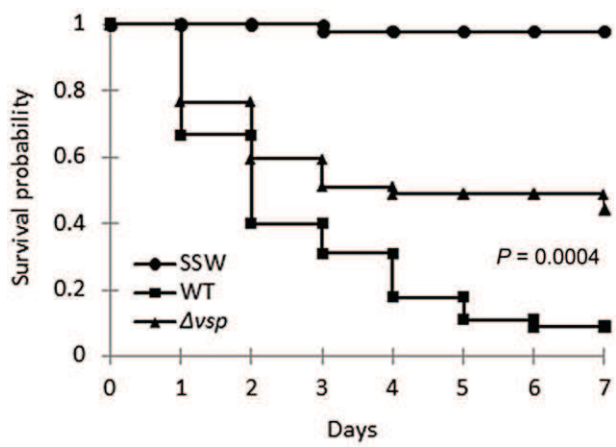
Vsp  DSVIAGTETAKFVSTHAK--RSAYGLKKKPV1TSSGSSGGSVS1FSLLGML  347
VesA  LRV1MNGLET1PKYYV1TESNGVRQLVAGGTT1TVSVSESS1GGGV1SLLI1APFL  317
      * : * * * * : * : * : * : * * * * * * * * * * : : *

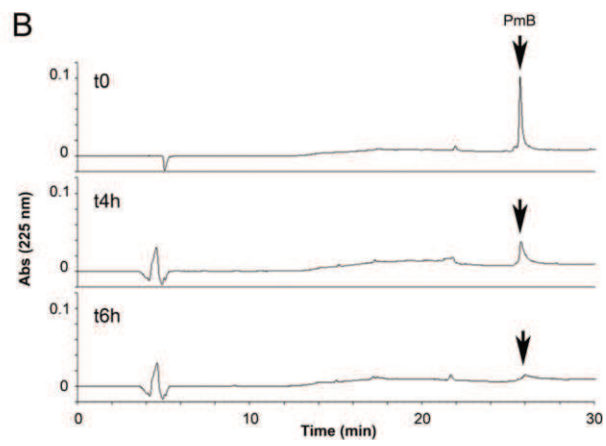
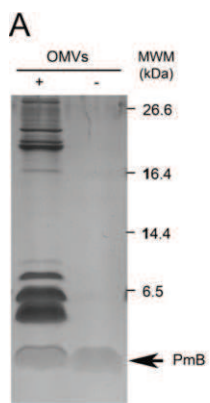
```

```

Vsp  MLFAGERTFNRFRK  361
VesA  GMLMI1RRNN-LKI  330
      : : * * : :

```













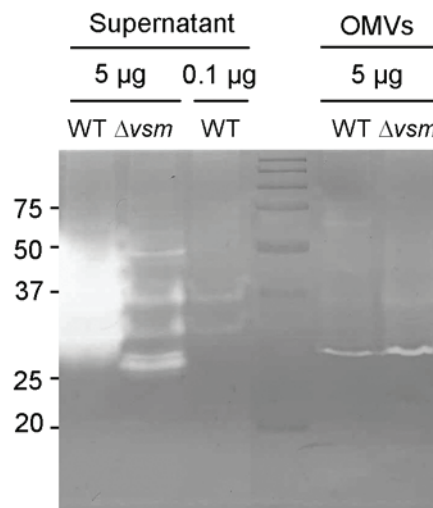




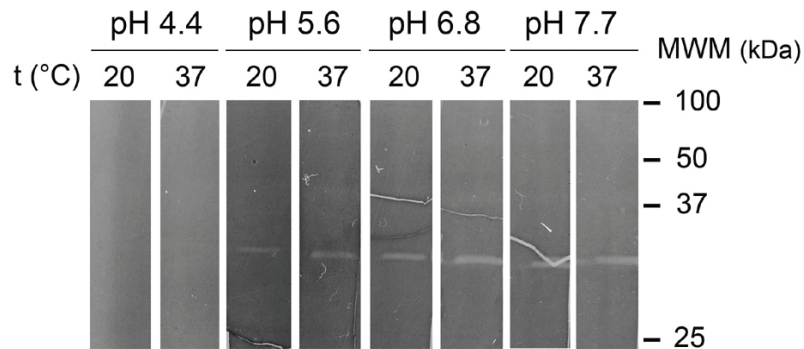






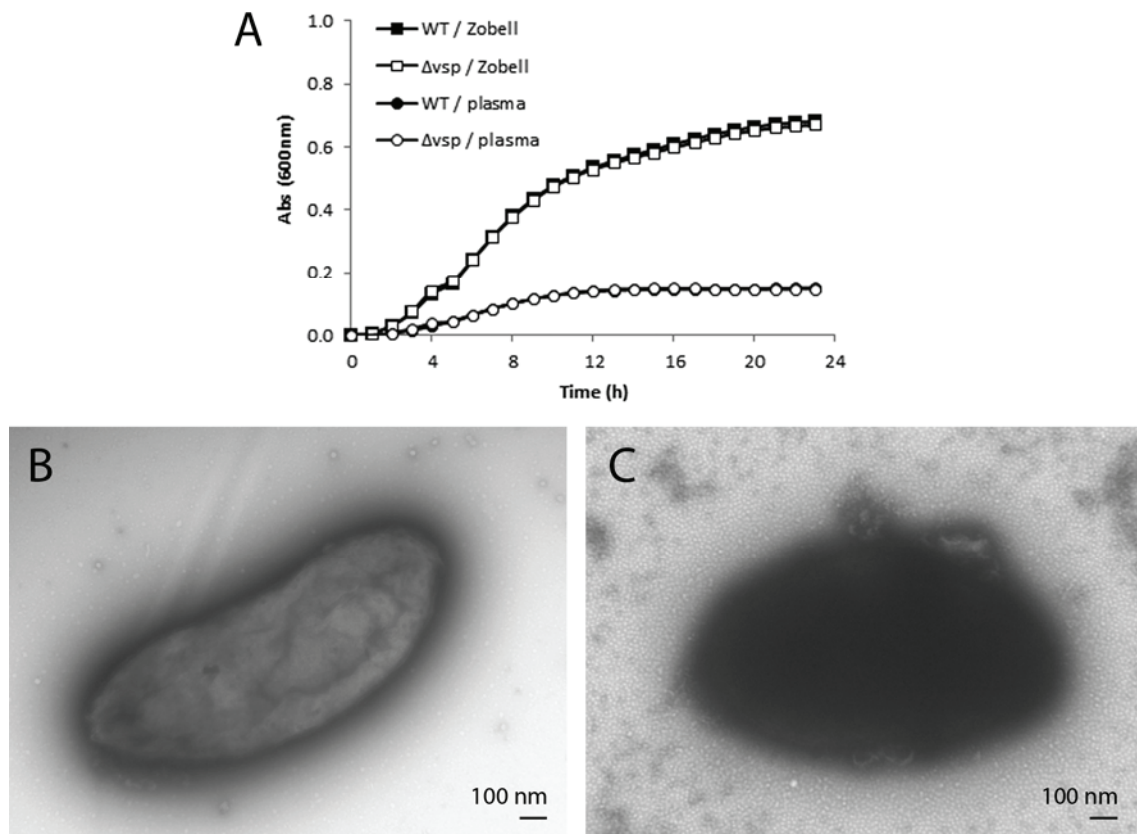


**Figure S1.** The major protease of OMVs is not the major extracellular metalloprotease Vsm. Characterization of the protease activity associated to OMVs. Zymography showing gelatin hydrolysis by OMVs (pellets, 5  $\mu$ g) or ultracentrifuge supernatants (5 or 0.1  $\mu$ g) from the wild-type and  $\Delta vsm$ LGP32. Molecular masses (kDa) are shown on the left. The active band of wild-type OMVs is maintained in the  $\Delta vsm$  mutant. No band at the same molecular mass is visible in ultracentrifuge supernatants of the WT and  $\Delta vsm$  mutant.



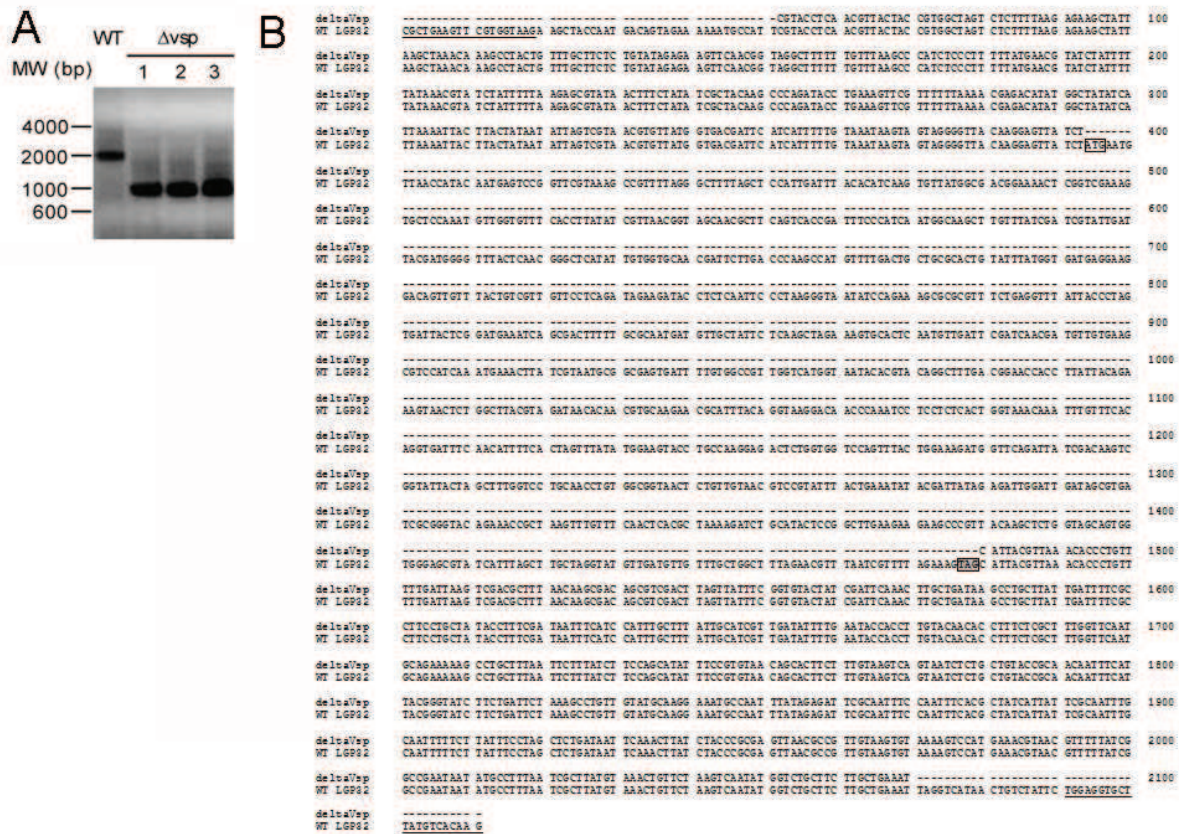
**Figure S2.** Vsp activity is stable in a pH range of 5.6 to 7.7. Zymography showing gelatin hydrolysis by OMVs from the wild-type LGP32 (10 $\mu$ g) at 20 $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C in 50 mM citrate buffer pH 4.4 or 50mM phosphate buffer pH 5.6, 6.8 and 7.7. Molecular masses are shown on the right.





**Figure S3.** Effect of plasma on LGP32 growth and OMV production.

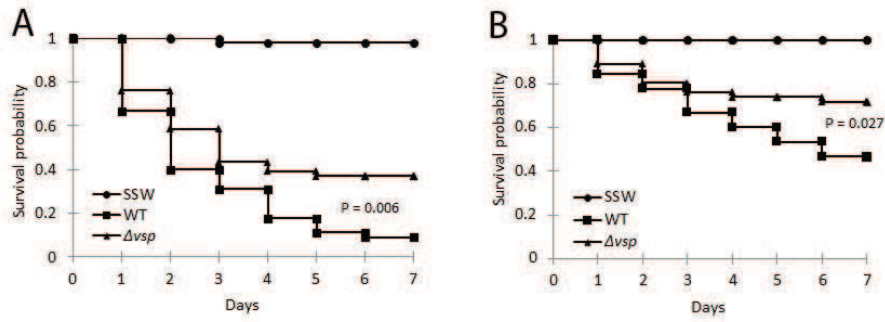
(A) Growth curves of wild-type (WT) LGP32 (black) and its isogenic  $\Delta vsp$  mutant (white) were obtained in Zobell medium (squares) and oyster plasma (circles) at a temperature of 20°C. Culture turbidity was monitored at 600 nm every 1h. The *vsp* deletion did not impair growth of LGP32 in Zobell medium nor in plasma. (B-C) Transmission electron microscopy of negatively-stained wild-type LGP32 cultures in Zobell medium (B) and filtered oyster plasma (C). While only few OMVs were released in Zobell medium (A), a massive release of OMVs was observed in plasma (B).



**Figure S4.** Control of *vsp* gene deletion.

A. PCR amplification of the DNA region flanking the *vsp* gene. DNA extracted from the wild-type (WT) and the three  $\Delta vsp$  mutants (1,2,3) was amplified using the VS\_II0815-Fw2 and VS\_II0815-Rv2 external primers (Table S3). The molecular weight marker is displayed on the left. The expected size for the wild-type and  $\Delta vsp$  amplicon are 2111 bp and 1025 bp, respectively.

B. Control of *vsp* deletion by sequencing. The PCR-amplified fragments obtained from the  $\Delta vsp1$ , 2 and 3 mutants were sequenced. Sequences were aligned with that of wild-type LGP32 using ClustalW. Gaps corresponding to the deletion are indicated by dashes. The VS\_II0815-Fw2 and VS\_II0815-Rv2 primers used for sequencing are underlined. The ATG and stop codons of the *vsp* open-reading frame are displayed in white and grey boxes, respectively.



**Figure S5.** Attenuated virulence of two additional  $\Delta vsp$  mutants is in oyster experimental infections. Kaplan-Meier survival curves were generated from 45 juvenile (A) or adult (B) oysters injected with wild-type (square) or  $\Delta vsp$  (triangle) LGP32 ( $4 \times 10^7$  CFU per juvenile oyster or  $2 \times 10^8$  CFU per adult oyster). An injection of sterile seawater (SSW) was used as control (circle). Two  $\Delta vsp$  mutants obtained independently were used in experimental infections (A) and (B). Oysters (15 per seawater tank) were monitored for 7 days after infection.

**Table S1.** List of proteins associated to *V. splendidus* LGP32 OMVs.

Protein identification was carried out by comparing experimentally generated monoisotopic peaks of peptides with computer-generated fingerprints using the Mascot program. Mascot was run on protein sequences deduced from four sequenced *V. splendidus* LGP32 genome (Le Roux et al., 2009). Only proteins identified by more than 3 peptides in two independent OMV preparations are displayed. OMV prep #1 was crude while OMV prep #2 was purified by density gradient. Only proteins found in both preparations are displayed. P, M, N, and L stand for protease, murein hydrolase, nuclease, and lipase, respectively. OM and IM stand for outer and inner membrane, respectively. The Vsp line is displayed in boldface.

Accession	Gene	Function	Localisation	Signal Peptide	Activity	OMV prep #1 (crude)		OMV prep #2 (purified on density gradient)		
						Coverage	Peptides	Coverage	Peptides	
<b>Enzyme activity</b>										
VS_0358	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Sec exported	yes		16.0	3	40.1	7	
VS_0372	<i>surA</i>	Parvulin-like peptidyl-prolyl isomerase, SurA	Sec exported	yes		37.5	13	29.1	8	
VS_0426	<i>degQ</i>	Protease degQ	Periplasmic	yes	P	31.4	9	13.1	4	
VS_0436		Hemolysin	OM (lipo)	yes		24.9	4	19.9	3	
VS_0757	<i>ushA</i>	5'-nucleotidase	OM (lipo)	yes	N	59.0	30	63.9	31	
VS_0885	<i>mtlB</i>	Putative membrane-bound lytic murein transglycosylase B	Sec exported	yes	M	12.6	3	24.0	5	
VS_0937	<i>sppA</i>	Protease IV (Endopeptidase IV)	IM		P	8.3	4	12.1	6	
VS_1051		Putative exonuclease	OM	yes	N	31.9	8	9.6	4	
VS_1058		Putative peptidase M60-like family protein	OM (lipo)	yes	P	3.1	3	3.5	3	
VS_1100		Putative ATP-dependent Zn protease	Sec exported	yes	P	30.0	6	26.3	4	
VS_1267	<i>vsm</i>	Extracellular zinc metalloprotease (M4 family)	Extracellular	yes	P	37.4	19	31.6	14	
VS_1417	<i>prc</i>	Carboxy-terminal protease (S41 family)	Sec exported	yes	P	32.5	16	12.8	6	
VS_1921		Putative Iron-regulated protein with peptidase M75 domain	OM (lipo)	yes	P	16.2	4	16.2	4	
VS_2380	<i>mliC</i>	Putative C-type lysozyme inhibitor (MliC)	OM (lipo)	yes		45.6	3	51.8	4	
VS_2523		Serine protease	OM	yes	P	17.5	10	13.1	6	
VS_2563		Putative lysozyme-like protein	Unknown		M	34.2	6	22.4	3	
VS_2565		Putative M16 family zinc peptidase (M16 family)	OM (lipo)	yes	P	24.6	18	10.5	7	
VS_2790	<i>CpdB</i>	Bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase	OM (lipo)	yes	N	62.4	28	44.2	17	
VS_3081	<i>ggt</i>	Gamma-glutamyltranspeptidase	Periplasmic	yes		23.7	11	20.8	9	
VS_3140	<i>dsbA</i>	Thiol:disulfide interchange protein, DsbA	Periplasmic	yes		34.0	7	24.3	4	
VS_II0262		Putative pyruvate/2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dihydrolipoamide dehydrogenase component	OM (lipo)	yes		38.3	3	50.8	4	
VS_II0416		Hemolysin	OM (lipo)	yes		52.3	4	52.3	4	
VS_II0492	<i>pepDB</i>	Putative dipeptidase B	Sec exported	yes	P	9.2	3	10.7	3	
VS_II0598	<i>napA</i>	Periplasmic nitrate reductase	Periplasmic	yes		14.9	10	4.5	3	
VS_II0716		Putative ATP-dependent Zn	OM (lipo)	yes	P	57.4	12	39.1	8	

		protease							
VS_II0771	<i>oma1</i>	Zn-dependent peptidase (M48 family)	OM (lipo)	yes	P	35.9	6	17.9	3
VS_II0774		Putative extracellular triacylglycerol lipase	OM (lipo)	yes	L	41.5	20	41.9	21
<b>VS_II0815</b>	<b><i>vsp</i></b>	<b>SI family secreted trypsin-like serine protease</b>	<b>IM</b>	<b>yes</b>	<b>P</b>	<b>16.0</b>	<b>4</b>	<b>16.0</b>	<b>4</b>
VS_II0870		Putative alkaline phosphatase	Sec exported	yes		25.0	9	18.1	7
VS_II0879	<i>aslA</i>	Putative arylsulfatase A	Periplasmic	yes		45.5	21	42.9	19
VS_II1298	<i>nepU</i>	Putativelycosidase	OM (lipo)	yes		26.9	13	4.9	3
VS_II1485		Putative zinc protease (M16 family)	OM (lipo)	yes	P	21.6	15	14.1	11
VS_II1486		Putative zinc protease	OM (lipo)	yes	P	4.6	3	10.1	6

#### Transport/Conjugation

VS_0075	<i>dppA</i>	Putative dipeptide ABC transporter, periplasmic binding protein / Cytochrome C	Periplasmic	yes		60.3	25	63.5	23
VS_0213	<i>wza</i>	Capsular polysaccharide export protein, Wza	OM (lipo)	yes		26.8	7	29.4	7
VS_0297		Putative ABC-type Fe3+-hydroxamate transport system component	OM	yes		18.7	4	13.1	3
VS_0355		Putative TRAP transporter solute receptor (TAXI family)	Sec exported	yes		65.9	14	67.1	14
VS_0373	<i>lptD</i>	Outer membrane lipid A transporter lptD	OM	yes		35.5	22	33.4	21
VS_0418	<i>tolC</i>	Outer membrane channel protein, TolC	OM	yes		71.9	25	72.8	23
VS_0633	<i>yrbS/acp</i>	Sodium/proton-dependent alanine carrier protein	IM			6.2	4	10.5	6
VS_0685	<i>ompK</i>	Outer membrane protein K	OM	yes		53.8	12	38.5	9
VS_0766		Putative oligogalacturonate-specific porin, KdgM	OM	yes		22.8	4	16.5	3
VS_0861		Putative long-chain fatty acid transport protein	OM	yes		67.0	20	59.5	17
VS_0990	<i>oppA</i>	Periplasmic oligopeptide-binding protein	Periplasmic	yes		58.9	28	50.0	18
VS_1055	<i>argT</i>	Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein precursor, abc transporter	Periplasmic	yes		77.3	16	75.4	15
VS_1068		Putative porin	OM	yes		72.4	22	65.5	21
VS_1116	<i>tolB</i>	Translocation protein tolB	Sec exported	yes		58.1	25	39.7	14
VS_1118	<i>ybgF</i>	Putative tol-pal system protein YbgF	OM	yes		60.4	13	36.6	9
VS_1121	<i>viuA</i>	TonB-dependent Vibriobactin receptor	OM			64.1	33	61.2	34
VS_1300		Putative outer membrane efflux protein TolC	OM	yes		12.3	4	18.3	6
VS_1393		putative Type I secretion outer membrane protein, TolC	OM	yes		44.1	18	62.7	22
VS_1403	<i>aapJ</i>	General L-amino acid-binding periplasmic protein aapJ	Periplasmic	yes		57.0	17	57.0	16
VS_1521	<i>sypC</i>	Putative Periplasmic protein SypC involved in polysaccharide export	OM	yes		9.2	5	9.9	6
VS_1627		Beta-barrel outer membrane protein (OmpA-like)	OM	yes		21.3	3	28.4	4
VS_1633	<i>cirA / irgA</i>	Iron-regulated outer membrane virulence protein	OM	yes		49.4	25	45.3	26
VS_1774		Beta-barrel outer membrane protein (OmpA-like)	OM	yes		29.9	4	29.9	4
VS_1799		Beta-barrel outer membrane protein (OmpA-like)	OM	yes		17.8	3	14.4	3
VS_1820		Beta-barrel outer membrane protein (OmpA-like)	OM	yes		41.6	8	41.2	8
VS_1843		Putative Type I secretion outer membrane protein, TolC	OM	yes		64.9	21	62.6	19

VS_2109	<i>blc</i>	Bacterial lipocalin blc precursor (outer membrane lipoprotein)	OM (lipo)	yes	31.3	5	31.3	5
VS_2116	<i>iutA</i>	TonB-dependent Ferric aerobactin receptor	OM	yes	48.1	28	34.9	20
VS_2212		TRAP-type C4-dicarboxylate transport system, periplasmic component	Periplasmic	yes	45.8	13	34.8	8
VS_2285	<i>chiP</i>	Putative chitoporin	OM	yes	41.4	12	42.4	12
VS_2343	<i>ompH / skp</i>	Outer membrane chaperone Skp (OmpH)	Periplasmic	yes	29.7	5	20.3	3
VS_2395	<i>btuA</i>	Putative tonB dependent receptor	OM	yes	45.5	25	18.3	9
VS_2443	<i>cpaC</i>	Putative type II/IV secretion system secretin RcpA/CpaC, associated with Flp pilus assembly	Sec exported	yes	22.1	9	24.0	7
VS_2494	<i>ompU</i>	Outer membrane protein, OmpU	OM	yes	51.4	18	51.4	18
VS_2518	<i>fbpA</i>	Iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein	Periplasmic	yes	37.9	9	32.4	7
VS_2998	<i>btuB</i>	Outer membrane vitamin b12 receptor	OM	yes	49.3	22	48.1	21
VS_3101	<i>sufI</i>	Putative Mn2+ multicopper oxidase	Periplasmic	yes	10.8	4		
VS_II0158	<i>lamB</i>	Putative maltoporin	OM	yes	39.9	14	23.5	8
VS_II0159	<i>malM</i>	Putative maltose operon periplasmic protein	OM (lipo)	yes	55.9	11	30.7	5
VS_II0220	<i>malE</i>	Maltose-binding periplasmic protein	Periplasmic	yes	42.3	11	11.7	3
VS_II0310	<i>ompC</i>	Outer membrane protein OmpC	OM	yes	88.2	31	32.4	7
VS_II0361	<i>ompN</i>	Outer membrane protein OmpN	OM	yes	39.8	12	50.0	12
VS_II0395	<i>ompA</i>	Outer membrane protein OmpA	OM	yes	53.0	18	57.2	16
VS_II0501	<i>tonB</i>	Putative ferrioxamine B receptor	OM	yes	44.7	19	35.4	16
VS_II0529	<i>vctA</i>	Putative enterobactin receptor VctA	OM	yes	24.3	12	22.7	10
VS_II0677	<i>fhuA</i>	Putative TonB dependent ferrichrome-iron receptor	OM	yes	63.6	42	50.3	32
VS_II0738	<i>traF</i>	putative TraF-related protein	OM	yes	47.6	14	30.7	9
VS_II0751	<i>hutA</i>	Putative TonB-dependent heme and hemoglobin receptor HutA	OM	yes	73.3	56	69.0	46
VS_II0773		Long-chain fatty acid transport protein	OM (lipo)	yes	26.6	8	23.7	7
VS_II0860		Putative outer membrane efflux protein	OM	yes	18.1	6	18.7	7
VS_II0866		Putative permease	OM	yes	22.7	6	22.4	5
VS_II0987	<i>vasD</i>	Putative Type VI secretion lipoprotein/VasD	OM (lipo)	yes	48.0	8	25.7	4
VS_II1127	<i>pvuA (fecA)</i>	Fe(3+) dicitrate transport protein FecA	OM	yes	78.1	44	76.3	43
VS_II1128	<i>psuA</i>	Putative ferric siderophore receptor PsuA	OM	yes	67.2	44	65.4	36

#### Cell motility

VS_0803	<i>flgD</i>	Flagellar hook capping protein FlgD	Extracellular		29.2	6	16.8	3
VS_0804	<i>flgE</i>	Flagellar hook protein flgE	Extracellular		24.0	5	30.0	7
VS_0810	<i>flgK</i>	Flagellar hook-associated protein FlgK	Extracellular		10.8	5	19.0	8
VS_0812	<i>flaA</i>	Flagellin core protein A	Extracellular		49.9	13	78.9	24
VS_0813	<i>flaB</i>	Polar flagellin B	Extracellular		45.2	11	81.6	35
VS_0814	<i>flaC</i>	Flagellin C	Extracellular		33.2	9	87.5	33
VS_0816	<i>flaH / fliD</i>	Flagellar hook-associated protein FlaH	Extracellular		5.7	3	5.9	3

VS_0828	<i>fliK</i>	Polar flagellar hook-length control protein FliK	Extracellular		26.4	10	9.6	3
VS_2293	<i>flaD</i>	Polar flagellin B/D, FlaD	Extracellular		46.7	12	86.5	36
<b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>								
VS_0078		Putative Sporulation/cell division region protein	Periplasmic	yes	11.5	3	11.5	3
VS_0209	<i>wbfD</i>	Putative WbfD protein	OM (lipo)	yes	23.4	4	14.2	3
VS_0212	<i>wbfB</i>	Putative WbfB protein	OM	yes	43.5	23	24.8	12
VS_0439	<i>lppC/lpoA</i>	Putative lipoprotein LpoA, activator of penicillin binding protein 1A	OM (lipo)	yes	65.1	31	54.3	21
VS_0559	<i>yfiO/BamD</i>	Outer membrane protein assembly complex subunit YfiO (YaeT complex)	OM (lipo)	yes	29.4	8	27.8	8
VS_0622	<i>yfgL/BamD/BamB</i>	Outer membrane protein assembly complex subunit YfgL (YaeT complex)	OM (lipo)	yes	45.1	12	29.3	8
VS_0690		Putative lipoprotein	OM (lipo)	yes	52.1	7	70.1	8
VS_0717	<i>lptE</i>	Luciferase, Rare lipoprotein B involved in LPS assembly (LptE superfamily)	OM (lipo)	yes	76.5	13	46.2	8
VS_1078	<i>slyB</i>	Putative outer membrane lipoprotein SlyB	Sec exported	yes	28.7	4	21.3	3
VS_1209		Outer membrane yesprotein (OmpA_C-like superfamily)	OM (lipo)	yes	50.5	6	36.5	6
VS_1776	<i>mipA</i>	MltA-interacting protein MipA	OM	yes	11.8	4	13.5	4
VS_1844		Putative outer membrane protein, OmpA family	OM (lipo)	yes	53.5	8	37.7	6
VS_2222	<i>slp</i>	Putative Starvation lipoprotein Slp paralog	OM (lipo)	yes	67.4	8	28.9	4
VS_2304	<i>bamC</i>	Outer membrane protein assembly factor BamC	OM (lipo)	yes	36.2	10	27.6	8
VS_2344	<i>yaeT</i>	Outer membrane protein assembly complex subunit YaeT (YaeT complex)	OM	yes	42.1	26	39.0	25
VS_2477	<i>nlpI</i>	Lipoprotein, NlpI	OM (lipo)	yes	21.2	6	26.5	7
VS_3040		Membrane protein	OM (lipo)	yes	18.8	7	15.9	6
VS_II0199	<i>lpp</i>	Major outer membrane lipoprotein precursor (Murein-lipoprotein)	OM (lipo)	yes	33.6	7	33.6	8
<b>Energy/Respiration</b>								
VS_2589	<i>cymA</i>	Putative exported protein, putative porin (CymA protein precursor)	OM	yes	20.0	6	18.3	6
VS_II0747	<i>damX</i>	Putative cytochrome C biogenesis protein CcdA / DamX-related protein	OM (lipo)	yes	50.8	8	58.7	9
<b>Translation</b>								
VS_3141		Translation elongation factor activity	OM	yes	36.8	9	18.9	6
<b>Proteins of unknown functions</b>								
VS_0240		Uncharacterized low-complexity protein	Sec exported	yes	54.6	5	54.6	5
VS_0788		Conserved lipoprotein of unknown function	Unknown		32.7	3	30.0	3
VS_0927		Putative iron-regulated protein	OM (lipo)	yes	30.8	9	22.5	5
VS_1146		Conserved lipoprotein of unknown function	OM (lipo)	yes	37.5	3	37.5	3

VS_1427		Large exoproteins involved in heme utilization or adhesion	Sec exported	yes	51.1	25	45.5	18
VS_1828		Conserved exported protein of unknown function	Sec exported	yes	47.8	7	47.8	7
VS_2070		Conserved exported protein of unknown function	Sec exported	yes	23.8	5	16.2	3
VS_2076	<i>ycfM</i>	Outer membrane lipoprotein YcfM	OM (lipo)	yes	54.0	9	55.1	10
VS_2077	<i>ycfL</i>	Periplasmic lipoprotein YcfL	OM (lipo)	yes	41.2	5	37.4	4
VS_2078	<i>ybbK</i>	Conserved lipoprotein with TPR repeats	OM (lipo)	yes	36.5	11	26.7	8
VS_2315		Conserved protein of unknown function	Sec exported	yes	37.5	14	29.2	11
VS_2372		Conserved lipoprotein of unknown function	OM (lipo)	yes	55.4	6	55.4	6
VS_II0865		Conserved protein of unknown function	Sec exported	yes	32.9	3	31.1	3
VS_II0989		Conserved protein of unknown function	OM	yes	32.5	5	20.7	4
VS_II1101		Putative uncharacterized protein	OM (lipo)	yes	41.5	19	56.4	25



**Table S2.** Molecular functions associated to OMV proteins.

Two independent OMV preparations were compared: OMV prep #1 was crude while the OMV prep #2 was purified on density gradient. The numbers of proteins assigned to a given molecular function are similar in both preparations. The molecular functions associated to the 132 proteins common to OMV prep #1 and #2 (detailed in Table S1) are shown on the right column.

Molecular function	OMV prep #1 (crude)		OMV prep #2 (purified on density gradient)		Proteins common to OMV #1 and #2	
	number of proteins	%	number of proteins	%	number of proteins	%
Enzyme activity	56	29.8	49	27.7	33	25.0
Transport/Conjugation	75	39.9	61	34.5	54	40.9
Cell motility	10	5.3	10	5.6	9	6.8
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	18	9.6	25	14.1	18	13.6
Energy/Respiration	3	1.6	4	2.3	2	1.5
Stress response	2	1.1	0	0	0	0
Translation	3	1.6	4	2.3	1	0.8
Proteins of unknown functions	21	11.2	24	13.6	15	11.4
<b>Total proteins</b>	<b>188</b>		<b>177</b>		<b>132</b>	

**Table S3.** Strains, plasmids and oligonucleotides.

	Description/sequence	Reference
<b>Bacterial strain</b>		
LGP32	<i>V. tasmaniensis</i> ( <i>Splendidus</i> clade)	(Gay et al., 2004)
$\Delta vsm$	LGP32 $\Delta vsm$ (VS_1267, M4 metalloprotease)	(Le Roux et al., 2007)
$\Delta vsp$	LGP32 $\Delta vsp$ (VS_II0815, intravesicular serine protease)	This study
$\pi 3813$	<i>E. coli</i> , <i>lacIQ</i> , <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA462</i> , <i>zei298::Tn10</i> [Tc <sup>R</sup> ] $\Delta thyA::(erm-pir116)$ [Erm <sup>R</sup> ]	(Le Roux et al., 2007)
$\beta 3914$	<i>E. coli</i> (F <sup>-</sup> ) RP4-2-Tc::Mu $\Delta dapA::(erm-pir)$ [Km <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> ] <i>zei298::Tn10</i>	(Le Roux et al., 2007)
<b>Plasmids</b>		
pSW7848	<i>oriV</i> <sub>R6Ky</sub> ; <i>oriT</i> <sub>RP4</sub> ; <i>araC</i> -P <sub>BAD</sub> <i>CcdB</i>	(Le Roux et al., 2007)
<b>Oligonucleotides</b>		
281112-1	5'-ATGAATGTTAACCATAACAATGAGTCC-3'	This study
281112-2	5'-ACAGGGTGTTTAACGTAATGAGATAACTCCTTGTAACCCC-3'	This study
281112-3	5'-GGGGTTACAAGGAGTTATCTCATTACGTTAAACACCCTGT-3'	This study
281112-4	5'-TGGACTTTTACACTTACAACGG-3'	This study
VS_II0815-Fw2	5'- CGCTGAAGTTCGTGGTAAG -3'	This study
VS_II0815-Rv2	5'- TTGTGACATAAGCACCTCCA -3'	This study

## Principaux résultats

Nous avons tout d'abord montré que **LGP32 produit des OMVs quelle que soit sa phase de croissance et son stade extracellulaire ou intracellulaire**. Le détachement des OMVs a été observé au niveau des membranes bactériennes et des flagelles, le plus grand nombre d'OMVs étant sous forme libre dans le milieu. Les interactions hémocytes/OMVs ont montré que les OMVs extracellulaires sont efficacement internalisées par les hémocytes.

De manière intéressante, nous avons observé de nombreuses vésicules dont la taille est compatible avec celle des OMVs (30-50 nm) au sein des vacuoles de phagocytose contenant les vibrios, suggérant que leur relargage intravacuolaire pourrait jouer un rôle dans le processus infectieux. Trente minutes après invasion, les vibrios sont apparus intacts dans ces vacuoles et ont induit de nombreux dommages aux hémocytes d'huître dont la perte d'intégrité des ultrastructures cytoplasmiques et, dans une moindre mesure, la rupture des membranes. Néanmoins les vibrios sont restés systématiquement confinés au sein de larges vacuoles suggérant un **mode de vie intravacuolaire**.

L'analyse protéomique des OMVs a permis d'identifier 132 protéines parmi lesquelles **88.6% sont des protéines de la membrane externe ou du périplasma**, ce qui est cohérent avec l'origine des OMVs décrite dans la littérature. Parmi les fonctions moléculaires associées aux OMVs, on retrouve des protéines liées au transport (40,9%) ou impliquées dans la biogénèse de la membrane/paroi (13,6%), des protéines à activité enzymatique (25%), des protéines impliquées dans l'énergie et la respiration (1,5%), une protéine impliquée dans la traduction (0,8%). Enfin, 11,4% des protéines ont une fonction est inconnue. Parmi les hydrolases, on retrouve des protéases, des sulfatases, des phospholipases, des nucléases et des lipases.

Nous avons montré que **des protéases, représentant 45,5% des hydrolases des OMVs, sont encapsulées dans les vésicules** et que la gélatinase/caséine majoritaire des OMVs est une sérine protéase que nous avons nommée Vsp pour « vesicular serine protease ». Nous avons en effet pu montrer qu'elle est strictement sécrétée par voie vésiculaire. Les OMVs apparaissent donc comme un système de sécrétion à part entière.

Afin d'étudier le rôle de Vsp dans la virulence de LGP32 chez *C. gigas in vivo*, nous avons construit trois mutants  $\Delta vsp$  validés par des approches génomiques et protéomiques. Nous avons ensuite réalisé des infections expérimentales chez des huîtres juvéniles avec les mutants  $\Delta vsp$  et la

souche sauvage. Les résultats ont montré qu'une injection intramusculaire des souches  $\Delta vsp$  induisait une diminution de la mortalité après 7 jours d'infection, soit 55,7% de mortalités pour  $\Delta vsp$  contre 91,2% pour la souche sauvage. Nous avons donc montré que **la sérine protéase Vsp est nécessaire à la virulence de LGP32 *in vivo***.

Enfin, nous avons mis en évidence le **rôle des OMVs dans la résistance de LGP32 à la polymyxine B (PmB) et à d'autres peptides membranolytiques**. Tout d'abord, nous avons démontré à l'aide de tests antimicrobiens que la présence d'OMVs (50  $\mu\text{g/ml}$ ) entraînait un décalage de la CMI de plus de 16 fois (effet dose dépendant). Un décalage de plus de 4 fois a également été observé avec un cyclolipoptide bactérien présent dans l'hémolyse des huitres (voir données supplémentaires). Cette résistance est indépendante de la sérine protéase Vsp.

Nous avons ensuite montré que la PmB, comme les AMPs d'huitre ne sont pas dégradés par les protéases intravésiculaires mais sont titrés par les OMVs. Nous avons donc caractérisé un autre système impliqué dans la résistance aux AMPs chez *V. tasmaniensis* LGP32 : la **titration par les OMVs**. Ceci indique que les OMVs pourraient protéger les membranes de LGP32 de l'action délétère des AMPs en créant un écran membranaire protecteur dans lequel sont piégés les AMPs. La vésiculation étant un mécanisme régulé par le stress de l'enveloppe, il se pourrait également que la libération des OMVs soit pour les bactéries un moyen d'éliminer les peptides qui s'insèrent dans leurs membranes

En conclusion, cette étude a permis de montrer que *Vibrio tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intravacuolaire qui produit des vésicules de membrane externe qui le protègent contre les peptides antimicrobiens et délivrent des facteurs de virulence aux cellules immunitaires de l'huître.

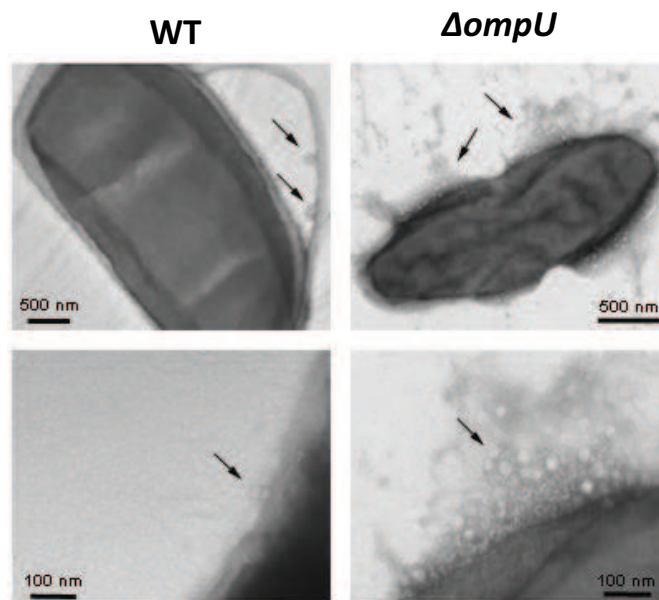
## Données supplémentaires

### Hypervésiculation des bactéries et stress membranaire

Plusieurs études ont montré que les bactéries augmentaient la production de vésicules en réponse à un stress membranaire comme des antibiotiques ou des peptides antimicrobiens (Manning and Kuehn, 2013). Il est supposé que ce mécanisme vise à éliminer les composés membranolytiques qui s'insèrent dans la membrane externe des bactéries. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré dans cet article I que LGP32 sécrète de nombreuses vésicules quand il est exposé au plasma (Fig. S3, Article I). Il serait intéressant de vérifier si comme chez *E. coli* cette hypervésiculation peut être induite par les AMPs eux-mêmes.

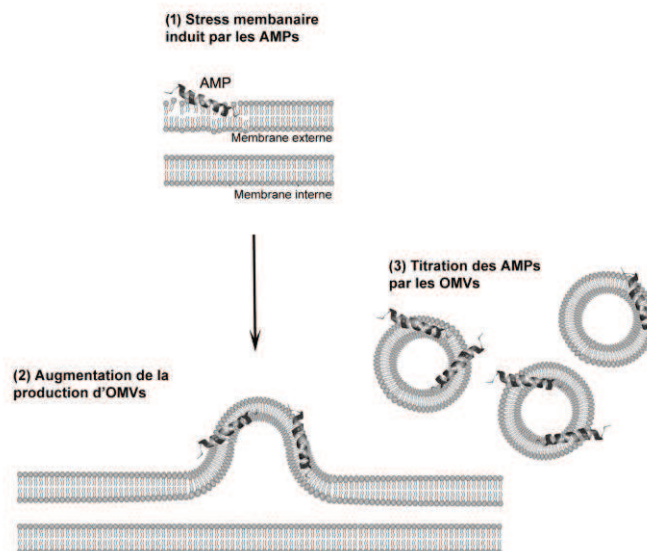
Nous avons par ailleurs étudié l'effet de la mutation de la porine OmpU sur le relargage des OMVs par *V. tasmaniensis* LGP32. Nos observations en microscopie électronique ont montré que la perte de OmpU entraînait une hypervésiculation de la bactérie. Ainsi, des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance surproduisent fortement les OMVs en l'absence de OmpU (Figure 22) (Destoumieux-Garzón et al., 2014). Une hypothèse est que OmpU contrôle la production d'OMVs par sa fonction régulatrice sur la voie  $\sigma E$  (Davis and Waldor, 2009). En effet,  $\sigma E$  contrôle la production d'OMVs dans d'autres espèces bactériennes, notamment chez *E. coli* et *V. cholerae* (Guillier et al., 2006).

Comme chez LGP32, la délétion de protéines de la membrane externe chez d'autres bactéries entraîne également une hypervésiculation des souches bactériennes. Ceci a été montré pour la porine OmpA de *V. cholerae* (Song et al., 2008) et des protéines impliquées dans la biogénèse des membranes chez *E. coli* (McBroom et al., 2006). Ainsi chez *V. cholerae*, il a été montré que dans des conditions induisant le stress de l'enveloppe, le petit ARN régulateur VrrA est exprimé de manière  $\sigma E$ -dépendante pour réprimer l'expression de OmpA, ce qui réduit le stress de l'enveloppe en promouvant le relargage des OMVs (Song et al., 2008).



**Figure 22.** Cultures en phase exponentielle de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 sauvage et du mutant  $\Delta ompU$  observées en microscopie électronique à transmission. Une hypervésiculation du mutant  $\Delta ompU$  est observée. Les flèches indiquent les OMVs.

Une revue bibliographique sur le rôle des OMVs dans la résistance des vibrios aux peptides antimicrobiens a été écrite sur la base de ces résultats (Destoumieux-Garzón et al., 2014). Un modèle de titration des AMPs par les OMVs a été proposé (Figure 23).



**Figure 23.** Modèle proposé pour la titration des AMPs par les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32.

Les OMVs produites en absence d'AMPs sont suffisantes pour titrer la PmB et confèrent une protection dose-dépendante contre la PmB. Bien que les bases moléculaires de la liaison de la PmB aux OMVs restent inconnues, on peut supposer que la titration se fait par l'insertion de la PmB dans les membranes des OMVs. La production d'OMVs est fortement induite en présence de plasma d'huître. Les OMVs formeraient ainsi une barrière membranaire protectrice contre les AMPs à activité membranaire.

Au-delà de la PmB, nous avons pu montrer que les OMVs de LGP32 (50µg/ml) décalaient la CMI de la tachyplésine, un peptide antimicrobien de limule, d'un facteur 4 (0,78µM à 3,12µM) et celle du cyclopeptide CLP954 (généreusement fourni par le Dr. Yannick Fleury, UBO Quimper) produit par *Pseudomonas alteromonas* (Desriac, 2013) de plus de 4 fois également (2,7 µM à >10µM). Ce dernier résultat est particulièrement important car CLP950 est produit par des souches isolées de l'hémolymphe des huîtres et il est un des rares AMPs isolés d'huître à présenter une forte activité sur LGP32. Nous n'avons pas pu réaliser ces mêmes expériences avec les AMPs de l'huître elle-même car leur CMI en absence d'OMVs est trop élevée pour pouvoir observer un décalage vers des valeurs encore plus hautes lorsque des OMVs sont ajoutées au milieu.

### **Interactions entre OMVs et AMPs de l'huître**

Nous avons montré dans l'article I que la PmB, utilisée comme AMP de référence, n'était pas dégradée mais titrée par les OMVs. Dans le cadre de cette thèse, nous avons également étudié les interactions des OMVs avec les AMPs de l'huître. Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que LGP32 résistait à de fortes concentrations en AMPs de l'huître (Duperthuy et al., 2010), notamment la *Cg*-BPI, capable de déstabiliser les membranes des microorganismes, et la *Cg*-Def, qui inhibe la biosynthèse du peptidoglycane. De même, aucune activité n'avait pu être relevée pour un peptide riche en proline, *Cg*-Prp (Gueguen et al., 2009). Ces diverses familles de peptides et protéines antimicrobiens sont produits par les hémocytes, *Cg*-BPI étant stockée au sein de larges granules cytoplasmiques (Schmitt et al., 2012c).

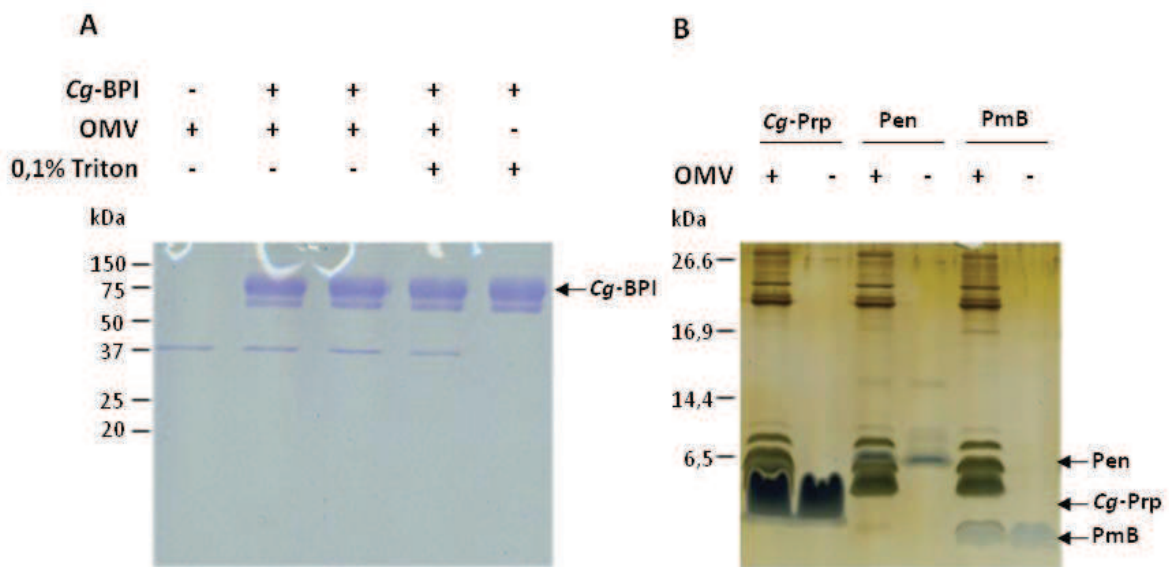
Lors de la dégradation intracellulaire de micro-organismes, les granules hémocytaires peuvent venir fusionner avec le phagosome pour y déverser des enzymes lysosomiales et des AMPs. Nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel des OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 dans la résistance aux AMPs d'huître et d'autres invertébrés marins.

D'une part, nous avons regardé si comme pour le Triton, les propriétés membranolytiques de *Cg*-BPI montrées précédemment par Gonzalez et al. (2007) pouvaient induire un relargage du contenu protéasique intravésiculaire des OMVs. Ceci n'a pas pu être mis en évidence aux concentrations de *Cg*-BPI testées (5 µM). Les mêmes résultats négatifs ont été obtenus avec la PmB, et cela même à des concentrations très élevées (400 µM).

D'autre part, parce que *Cg*-BPI se lie au LPS des bactéries à Gram négatif (Gonzalez et al., 2007) et à la membrane de LGP32 (données non publiées), nous avons émis l'hypothèse que lors de

son insertion dans la bicouche lipidique qui délimite les OMVs, *Cg*-BPI pouvait être dégradée par les protéases encapsulées dans les OMVs. L'analyse en gel SDS-PAGE 12% (Figure 24A) a montré la *Cg*-BPI n'était pas dégradée par les protéases intravésiculaires. Nous avons également testé d'autres peptides comme le *Cg*-Prp de l'huître et la pénécidine de la crevette mais aucune dégradation n'a été observée (Figure 24B).

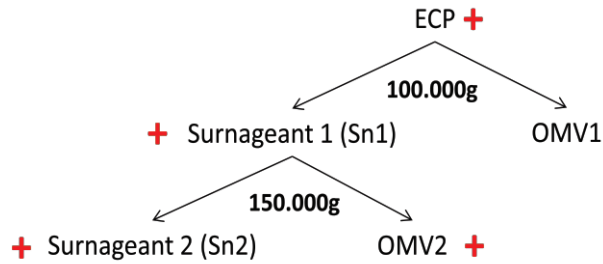
Ainsi, il n'existe à ce jour aucune évidence de lyse des OMVs par les AMPs ni de dégradation des AMPs par les protéases intravésiculaire.



**Figure 24. Profils SDS-PAGE 12% des contacts entre les AMPs et les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32. (A) *Cg*-BPI (1,82μM) et OMVs (50μg/ml) ; (B) *Cg*-Prp (1mM), pénécidine (0,6μM), polymyxine B (36μM) et OMVs (200μg/ml). Aucun des AMPs testés ne présente d'évidence de dégradation protéolytique après 4h à 20°C sous agitation dans un tampon Sodium phosphate pH 7.3. Pen : Pénécidine. PmB : PolymyxineB. 10μl/piste.**

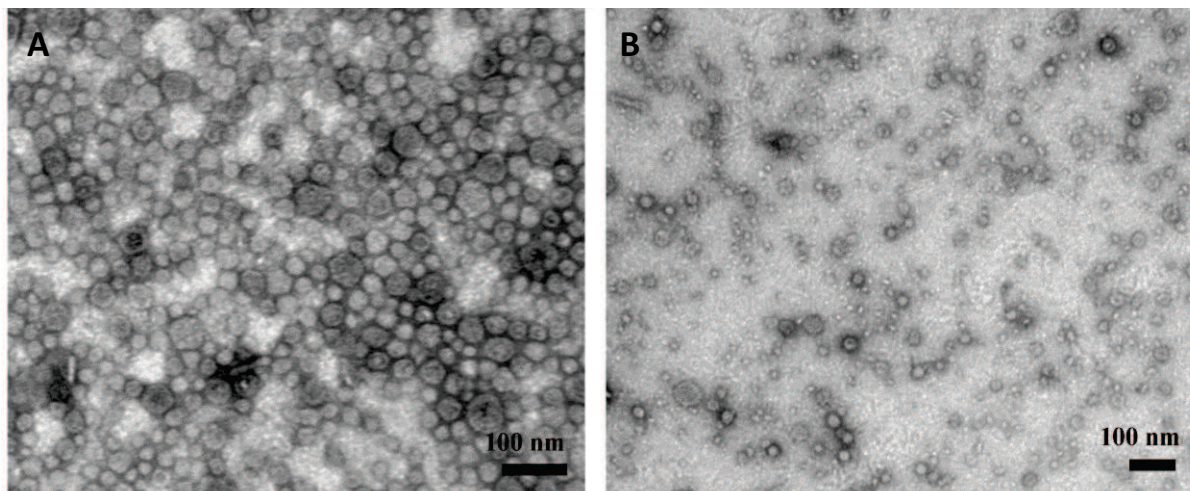
### Existence de différentes populations d'OMVs

Nous nous sommes demandé s'il existait plusieurs populations d'OMVs. Pour cela, nous avons fait deux ultracentrifugations successives : l'une à 100.000 g (comme dans notre protocole habituel) et l'autre à 150.000 g (Figure 25).



**Figure 25. Schéma des ultracentrifugations différentielles réalisées et activité protéase associée. Les fractions présentant une activité protéase sont représentées en rouge.**

L'observation des 2 culots obtenus après ultracentrifugation différentielle a été faite en microscopie électronique à transmission. Nous avons observé la présence d'OMVs dans les 2 échantillons (Figure 26). A 100.000g, les vésicules mesurent 30 à 50 nm, tandis qu'à 150.000g, elles sont inférieures à 30nm. Il existe donc diverses populations d'OMVs.



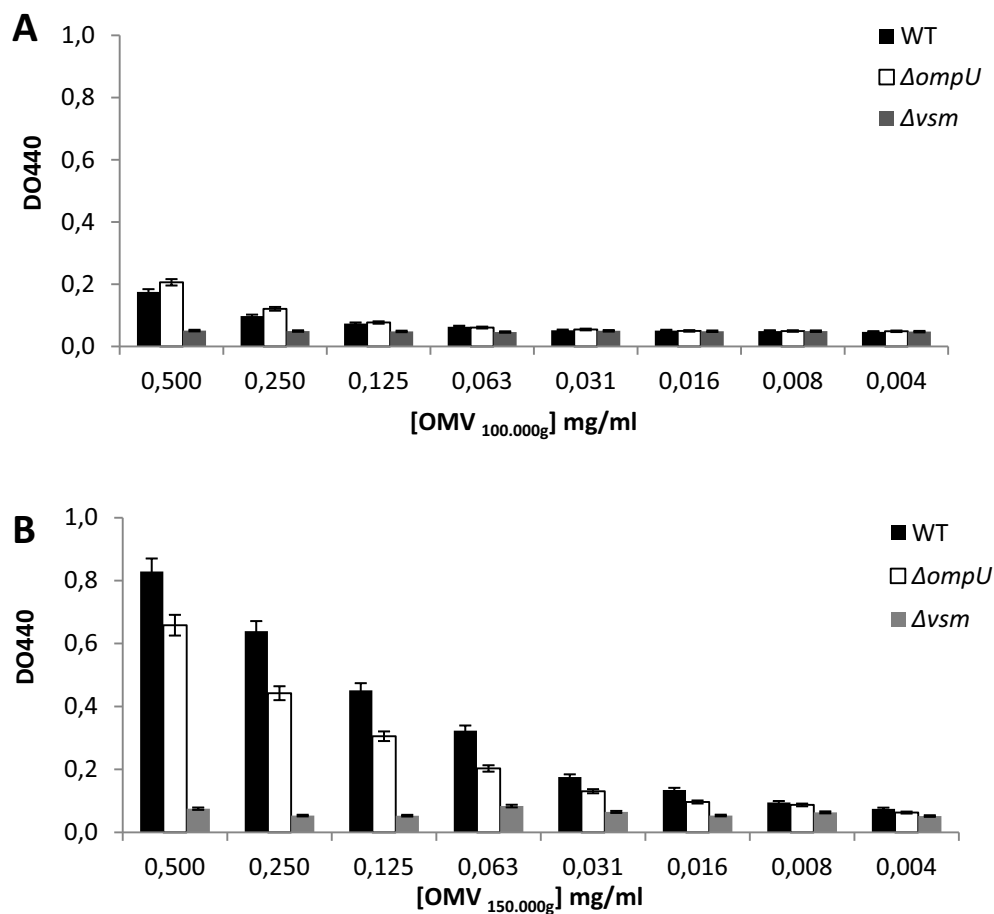
**Figure 26. Culots issus d'une ultracentrifugation différentielle des ECPs de *V. tasmaniensis* LGP32 à 100.000g (A) et 150.000g (B) observés en microscopie électronique à transmission.**

S'est alors immédiatement posée la question des facteurs de virulence potentiellement associées à cette population d'OMVs de petite taille. Etant donnée la mise en évidence de la Vsp dans les vésicules de 30-50 nm (article I), dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur les protéases associées aux OMVs, isolées par ultracentrifugation des ECPs à 150.000g. Nous avons ainsi réalisé des tests d'activité protéasique à l'aide d'azocaséine sur les OMVs des souches *V. tasmaniensis* sauvage et des mutants  $\Delta ompU$  et  $\Delta vsm$  (Figure 27). En effet, les OMVs des souches WT présentaient une activité protéasique à l'inverse de la souche délétée de la Vsm. Cette activité protéasique a été dosée en absence de traitement au Triton. Il s'agit donc dans ce cas d'une



association extravésiculaire de la Vsm aux OMVs. Parce que les OMVs des souches WT et  $\Delta ompU$  présentent toutes deux cette activité protéasique, l'association OMVs/Vsm est indépendante de la porine OmpU.

Bien qu'on ne puisse pas éliminer l'hypothèse d'une association spécifique de la Vsm aux vésicules de petite taille, il est vraisemblable que ces résultats résultent d'une précipitation de la Vsm (protéine majoritaire des ECPs) à 150.000g.



**Figure 27.** Activité protéase associée aux OMVs isolées à 100.000g (A) ou 150.000g (B) de *V. tasmaniensis* LGP32 sauvage (WT) et des mutants  $\Delta ompU$  et  $\Delta vsm$ .

Mesure de la formation de produits de réactions colorés à 440nm suite à la digestion protéolytique de l'azocaséine par les protéases pendant 1h à 20°C. Conformément à nos résultats antérieurs (article I), lorsque les ECPs des souches sauvage et mutante  $\Delta ompU$  sont ultracentrifugées à 100.000g, le culot (OMV1) ne présente pas d'activité protéase. Après une étape d'ultracentrifugation plus rapide (150.000g) du surnageant (Sn1), le culot (OMV2) présente une activité protéase. Celle-ci est dépendante de *vsm* et indépendante de *ompU*.

Afin de déterminer si des protéases autres que Vsm sont associées à des vésicules de petites tailles, il serait maintenant intéressant de réaliser des analyses protéomiques comparatives comme effectué dans l'article I sur les plus grosses OMVs. Une telle étude permettrait également d'obtenir des informations sur l'association à ces OMVs de facteurs de virulence potentiels autres que les protéases.

### **Présence d'acides nucléiques dans les OMVs**

Au-delà des protéines, nous nous sommes posé la question des autres composants encapsulés dans les OMVs de LGP32. En particulier nous nous sommes demandé si des acides nucléiques pouvaient être encapsulés dans les OMVs. Pour cela, nous avons incubé les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 (266µg) avec du SybrGreen I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) dilué au 1/375 dans un tampon sodium phosphate pH 7.3 pendant 15min en chambre noire. Les OMVs marquées ont ensuite été analysées par cytométrie en flux sur un appareillage FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) équipé avec un laser à argon (488 nm, 15 mW). Les résultats montrent que 2 populations d'OMVs dont la taille reste à déterminer sont marquées au SybrGreen (Figure 28). Comme chez LGP32, l'encapsulation d'acides nucléiques a déjà été démontrée chez plusieurs bactéries (Renelli et al., 2004; Rumbo et al., 2011). Il n'en reste pas moins que la présence d'ADN dans les vésicules est difficile à expliquer étant donné le mode de biogénèse des OMVs (Deatherage et al., 2009; Kulp and Kuehn, 2010). Il est possible que lors d'événements de conjugaison, le passage du matériel nucléaire dans l'espace périplasmique favorise l'encapsulation d'ADN dans les OMVs. Certains auteurs voient d'ailleurs dans les OMVs un nouveau mécanisme pour le transfert horizontal de gènes (Yaron et al., 2000; Rumbo et al., 2011). Ce champ de recherche reste à ce jour inexploré chez les vibrios.

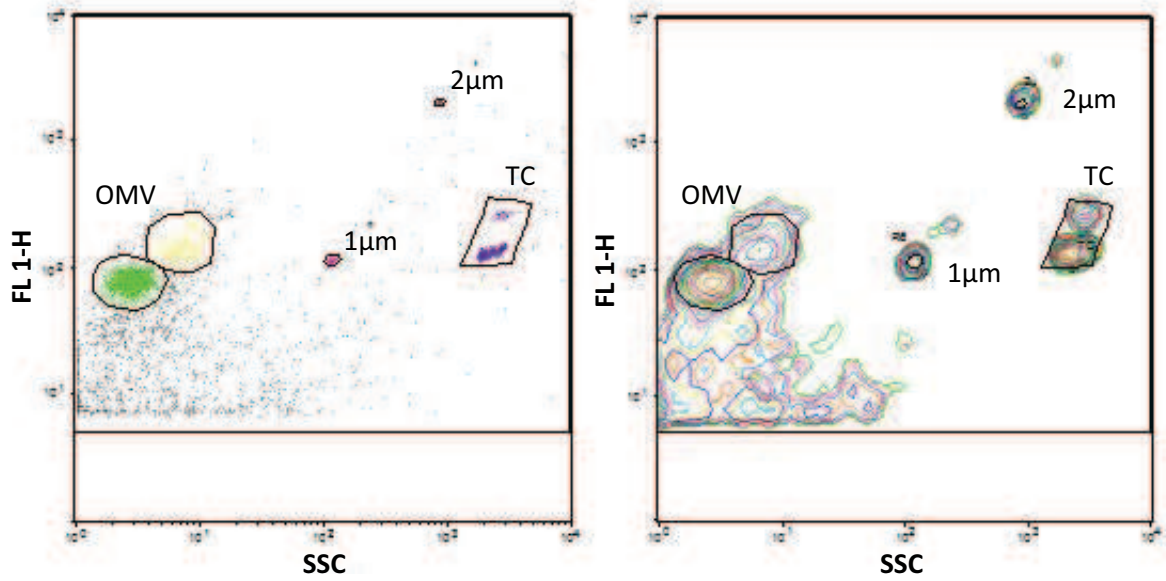


Figure 28. Cytogrammes des OMVs (266µg) de *V. tasmaniensis* LGP32 marquées au SybrGreen I en tampon sodium phosphate pH7.3 pendant 15 min en chambre noire.

L'axe des abscisses représente l'intensité de fluorescence des OMVs marquées au SyberGreen (filtre 530/30nm-FL 1). L'ordonnée indique la granulosité relative (side scatter-SSC) des OMVs. Des billes de calibration de taille de 2 et 1 µm sont utilisées ainsi que des TruCount (TC) pour déterminer le volume analysé.

## **SECTION B**

**Fonctions de survie et mécanismes de**  
**virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 :**  
**une analyse du transcriptome**  
**intrahémocytaire de LGP32**



## Section B.

### Fonctions de survie et mécanismes de virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 : une analyse du transcriptome intrahémocytaire de LGP32

Les travaux précédents de l'équipe avaient montré que *V. tasmaniensis* LGP32 était un pathogène intracellulaire facultatif capable d'envahir les hémocytes dans lesquels il survit, altérant leurs fonctions de défense (Duperthuy et al., 2011). En effet, ce pathogène inhibe la formation de vacuoles acides, indicatrices de la maturation du phagosome, et sa phagocytose par les hémocytes s'accompagne d'une production d'espèces oxygénées réactives inférieure à celle observée pour la souche contrôle *V. tasmaniensis* LMG20 012T, non virulente, incapable de survivre dans les hémocytes. En accord avec ces résultats initiaux, nos observations en microscopie électronique (article I) ont montré qu'au sein des vacuoles de phagocytose, LGP32 ne présentait pas de décollement des membranes ou de lyse bactérienne caractéristiques d'une dégradation par des enzymes lysosomales ou des peptides antimicrobiens (Vanhove et al., 2014). Nous avons par contre observé des dommages importants chez les hémocytes envahis par plusieurs *Vibrio* tels qu'un lessivage du contenu cytosolique et par endroit des dommages membranaires. Les vacuoles de phagocytose sont aussi apparues très distendues (Vanhove et al., 2014) (Figure 29).

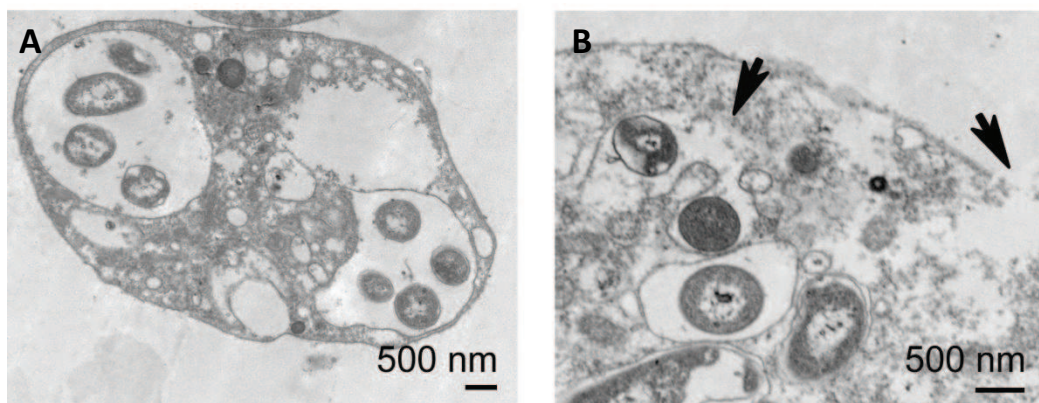


Figure 29. Cytoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 vis à vis des hémocytes de l'huître *C. gigas* après 30 minutes de contact *Vibrio*/hémocyte.

La MOI utilisée dans cette expérience (rapport bactéries/hémocytes) est de 50:1. On observe plusieurs bactéries, intactes, au sein de larges vacuoles distendues. Les organismes intracellulaires ont disparu et de nombreuses vésicules occupent le cytoplasme. Par endroit, la membrane du phagosome et la membrane cytoplasmique perdent leur intégrité (flèches).

Ces observations nous ont amenés à nous intéresser aux mécanismes de survie intracellulaire de LGP32 et de cytotoxicité vis-à-vis de hémocytes de l'huître. Nous avons d'abord étudié le lien survie-cytotoxicité en décrivant la dynamique de l'interaction *Vibrio*/hémocyte et en regardant si la cytotoxicité est dépendante de l'invasion hémocytaire. Pour identifier les effecteurs moléculaires bactériens potentiellement impliqués dans la cytotoxicité et la survie intracellulaire, nous avons réalisé le transcriptome intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32 et entrepris une analyse fonctionnelle des gènes appartenant aux grandes fonctions surexprimées. Ceci a été fait grâce à la construction de mutants et leur caractérisation phénotypique.

#### **Publication 2 :**

Les résultats de ces travaux sont présentés dans la publication n°2 :

Audrey S. Vanhove, Tristan Rubio, An Ngoc Nguyen, Astrid Lemire, David Roche, Julie Nicod, Agnès Vergnes, Aurore Poirier, Elena Disconzi, Evelyne Bachère, Frédérique Le Roux, Annick Jacq, Guillaume M. Charrière, Delphine Destoumieux-Garzón, “ **Determinants of *Vibrio* survival inside professional phagocytes: Essential role of copper homeostasis and antioxidant response in *Vibrio tasmaniensis* LGP32.**” (en préparation).

## Determinants of *Vibrio* survival inside professional phagocytes: Essential role of copper homeostasis and antioxidant response in *Vibrio tasmaniensis* LGP32.

Audrey S. Vanhove<sup>1</sup>, Tristan Rubio<sup>1\*</sup>, An Ngoc Nguyen<sup>2\*</sup>, Astrid Lemire<sup>3, 4, 5</sup>, David Roche<sup>6, 7</sup>, Julie Nicod<sup>1</sup>, Agnès Vergnes<sup>1</sup>, Aurore Poirier<sup>1</sup>, Elena Disconzi<sup>2</sup>, Evelyne Bachère<sup>1</sup>, Frédérique Le Roux<sup>3</sup>, Annick Jacq<sup>2</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>1#</sup>, and Delphine Destoumieux-Garzón<sup>1#\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory Ecology of coastal marine systems, CNRS, Ifremer, Université de Montpellier, IRD, UMR 5119. Place Eugène Bataillon. 34095 Montpellier, France.

<sup>2</sup>Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS, Université Paris-Sud, UMR 8621, 91405 Orsay Cedex, France.

<sup>3</sup>Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff Cedex, France.

<sup>4</sup>Ifremer, Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, F-29280 Plouzané, France.

<sup>5</sup>CNRS UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, CS 90074, F-29688, Roscoff Cedex, France.

<sup>6</sup>Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Génétique (IG), Génoscope

<sup>7</sup>CNRS UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatiques en Génétique et Métabolisme (LABGeM), 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, 91057 Evry cedex, France

<sup>\*,#</sup> Authors with equal contribution

\* Corresponding author

Laboratory Ecology of coastal marine systems,  
UMR 5119, CNRS, Ifremer, Université de Montpellier, IRD.  
CC80. Place Eugène Bataillon,  
34095 Montpellier, France.  
[ddestoum@univ-montp2.fr](mailto:ddestoum@univ-montp2.fr)

Tel. +33 467 14 46 25

Fax. +33 467 14 46 22



## Summary

A significant number of waterborne bacterial pathogens belong to the *Vibrio* genus. While they have long been considered extracellular pathogens, the recent literature has shown that several vibrios have evolved the capacity to invade host cells. *Vibrio tasmaniensis* LGP32, which belongs to the Splendidus clade, is a bacterial pathogen for *Crassostrea gigas* oysters. We recently showed that the capacity of LGP32 to invade oyster phagocytes, the hemocytes, is a major determinant for its virulence. In the present work, we investigated LGP32 capacity to survive inside oyster hemocytes. We showed that LGP32 induces a phagocytosis-dependent cytolysis of hemocytes which correlates with its capacity to survive inside hemocytes. To investigate LGP32 intracellular survival strategies, we compared the intracellular and extracellular transcriptomes of LGP32 one hour after entry into hemocytes. The results of the RNA sequencing highlighted a profound metabolic shift as well as an up-regulation of antioxidant and copper detoxification genes. To determine how far those highly upregulated genes were involved in the resistance of LGP32 to intracellular killing, we constructed isogenic deletion mutants for two overexpressed antioxidants, SOD and Ahp, and, two overexpressed copper efflux transporters, CopA and CusAB. Mutants were phenotyped for intracellular survival, cytotoxicity and virulence in oyster experimental infections. Our data revealed that resistance to reactive oxygen species and copper efflux are two important functions required for LGP32 intracellular survival, cytotoxic effects and virulence.

## Introduction

While vibrios have long been considered extracellular organisms, an increasing number of studies show that some of them have evolved the capacity to invade host cells, sometimes as part of a pathogenic process. Thus, invasion of epithelial cells has been shown for the human pathogen *Vibrio parahaemolyticus* (Zhang et al., 2012; de Souza Santos and Orth, 2014) as well as for the animal pathogens *Vibrio shiloi* (Rosenberg and Falkovitz, 2004) or *Vibrio anguillarum* (Ormonde et al., 2000). More strikingly, *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* adopt intracellular stages in phagocytes from the environment, the amoebae (Abd et al., 2005; Abd et al., 2007; Abd et al., 2010). Similarly, live vibrios have been found inside professional phagocytes from animal species. In vertebrates, *V. cholerae* survives inside human macrophages (Ma et al., 2009). In invertebrates, *V. tasmaniensis* LGP32 (previously assigned to *V. splendidus*) survives inside hemocytes, the immune cells of the oyster (Duperthuy et al., 2011). As the intracellular stage is often associated with the expression of key virulence factors (Ma et al., 2009; Zhang et al., 2012), understanding the capacity of vibrios to resist phagocyte killing has become a priority to decipher essential pathogenic processes.

Survival in professional phagocytes requires evading or resisting to the multiple stresses that the host cell uses to kill phagocytosed microorganisms (Flannagan et al., 2009). Indeed, professional immune cells use the NADPH oxidase to produce potent reactive oxygen species to which microorganisms are exposed as soon as they come in contact with the host phagocyte membrane. Phagocytes also produce a series of hydrolytic enzymes and antimicrobial peptides, which are delivered into the phagolysosome during its maturation. In addition to these direct defense effectors, phagocytes create an acidic environment by accumulating protons in the lumen of the phagosome. This environment hostile to the phagocytosed bacteria is also optimal for the activity of the hydrolytic enzymes. Finally, metal homeostasis plays an essential role in the control of phagocytosed bacteria (Soldati and Neyrolles, 2012), as phagocytes have the ability to modulate the intraphagosomal concentration of metals, by depriving microorganisms from essential metals like iron or by accumulating toxic concentrations of zinc and copper (Hood and Skaar, 2012).

Previous work from our group has shown that the invasion of oyster hemocytes by *V. tasmaniensis* LGP32 is correlated with the *Vibrio* pathogenicity (Duperthuy et al., 2011). We also found that in the first hours following phagocytosis, LGP32 creates damages to the host cell without escaping the phagocytic vacuole (Vanhove et al., 2014). To our knowledge, this is the only model described to date in which invasion of professional phagocytes by vibrios has been so clearly associated to the expression of the disease *in vivo*. In the present study, we took advantage of this host-pathogen

interaction in which vibrios behave as facultative intravacuolar pathogens (Vanhove et al., 2014) to explore the *Vibrio* intracellular life.

Here, we first characterized the cytopathic processes associated with LGP32 survival in oyster hemocytes. We then identified by comparative transcriptomics the bacterial genes differentially expressed inside hemocytes. Genes highly over-expressed in the intracellular condition were further validated genetically using specific deletion mutants and their corresponding complemented strains. They were characterized for their role in intracellular survival, cytotoxicity to host immune cells and virulence in experimental infections. Our data show that copper homeostasis and the antioxidant response are key determinants of LGP32 intracellular survival and cytotoxicity within oyster phagocytes. LGP32 mutants impaired in copper homeostasis were shown to be attenuated terms of virulence in oyster experimental infections.

## Results

### **LGP32 requires phagocytosis to replicate and induce hemocyte lysis**

By using GFP-expressing strains we assessed whether *V. tasmaniensis* LGP32 or LMG20 012T (our non pathogenic control) were able to grow after phagocytosis by hemocytes. When hemocytes monolayers were exposed to LGP32, a fluorescence signal indicative of bacterial growth increased over the time-course of the experiment (Fig.1A). On the contrary, no significant increase in fluorescence was measured for hemocytes exposed to LMG20 012T, and no growth of any of the bacteria were observed in the absence of hemocytes (Fig. 1A). This indicates that hemocytes are required to support the growth LGP32. To get insights into the cellular aspects of LGP32 growth within hemocytes, we performed epifluorescence microscopy over five hours in similar conditions. Both LGP32 and LMG20 012T were avidly phagocytosed by oyster hemocytes after 1h of contact with only few extracellular vibrios being visible outside the hemocytes, which attested of the efficient removal of extracellular bacteria by sterile sea water (SSW) washes. After 3h, most LGP32 were intravacuolar but some bacteria-containing hemocytes had lost adherence: they started to harbor alterations and were found in the culture supernatant together with extracellular vibrios. After 5h, most of the LGP32 were extracellular; no more hemocytes containing GFP-expressing LGP32 were visible on the monolayers while several of them, were present in the culture supernatant (Fig.1B). Contrary to LGP32, GFP-expressing LMG20 012T were observed within the hemocyte monolayer all over the time-course, being almost absent from the extracellular medium. This indicates that LGP32 entry into hemocytes results in a loss of hemocyte adherence and integrity leading to the release of intracellular LGP32 by hemocyte lysis occurring mainly 5 hours after phagocytosis. To quantify LGP32

cytotoxic damages towards hemocytes, we developed a cytotoxicity assay based on the fluorescence of the cell-impermeant Sytox green DNA dye. In agreement with our epifluorescence microscopy data, five to seven hours after exposure to LGP32, hemocyte monolayers showed a massive increase of Sytox green fluorescence, indicative of hemocyte membrane permeabilisation and/or cell lysis (Fig. 1C). Such cytotoxic effects were not observed when hemocytes were exposed to LMG20 012T. Importantly, inhibition of phagocytosis by cytochalasin D prevented LGP32-induced hemocyte damages. We therefore concluded that cytotoxicity of LGP32 towards oyster hemocytes is strictly dependent on phagocytosis.

### **Antioxidant responses and metal homeostasis genes are highly expressed intracellularly**

To identify the mechanisms used by LGP32 during intracellular stages, we characterized the intracellular transcriptome of LGP32. For that, we prepared transcripts from intracellular and extracellular LGP32. Basically, for intracellular vibrios, LGP32 was phagocytosed by hemocyte monolayers kept in oyster plasma to promote phagocytosis and then washed extensively in SSW to eliminate most of the extracellular vibrios. Total RNA was extracted from the hemocyte monolayer or from LGP32 kept for one hour in SSW as extracellular controls. Since total RNA from LGP32-infected hemocytes contained approximately 90% hemocyte RNA, the RNA from LGP32 incubated in SSW was supplemented by RNA from uninfected hemocytes, to improve comparison between the two conditions. Samples were further processed for Illumina RNA-seq as described in Materials and Methods. Out of 50-60 M of reads obtained from the RNA-seq, an average of 1.2 M of reads from SSW samples and 2.3 M of reads from intrahemocyte samples were successfully mapped onto the genome of LGP32. Out of 3230 genomic elements (not including rRNA genes), transcript levels of 1280 genes varied by more than 4 fold in the intracellular condition, with a false detection rate of 5% in all triplicate conditions (Table S1). Validation of the RNAseq was achieved by qPCR on another set of three independent experiments. Twenty-five genes were chosen as representatives of interesting functional categories, which were found to be the most affected in the hemocytes (see below and Fig. 2). The qPCR data were in agreement with the RNAseq data for 21, *i.e.* 84% of the tested genes (Fig. S1).

The comparative transcriptomics of intracellular vs. extracellular LGP32 revealed a massive activation of LGP32 metabolism inside the hemocytes. Indeed, the three functional categories which came first by the number of differentially expressed genes were *protein synthesis*, *carbon compound utilization and transport*, and *amino acid transport and metabolism*. An important up-regulation of genes involved in *glycogenesis*, *gluconeogenesis*, *TCA cycle*, as well as in *envelope*, *LPS and capsule biogenesis* was also observed (Table S1; Fig. 2). Similarly, *stress response* and *metal homeostasis* were functions highly impacted by the intracellular environment. As we were interested in the

functions required for intracellular survival, we focused here on the genes highly overexpressed in the intracellular condition: 34 were overexpressed more than 50 times (0.8% of the transcriptome) (Table 1). Among them, five genes were involved in copper efflux: *cusCBAF* (VS\_II0514, VS\_II0515, VS\_II0516, VS\_II0517) and *copA* (VS\_0768), which encode a RND-transporter and a P-type ATPase, respectively. Three genes were involved in the antioxidant response, namely *sodA* (VS\_2918) and *ahpC1/ahpF* (VS\_2126, VS\_2127), which encode a superoxide dismutase and an alkyl hydroperoxide reductase complex, respectively. Altogether, the RNAseq data identified metal (in particular copper) homeostasis and antioxidant response as the functions most highly triggered by the intracellular environment.

To determine whether triggering of those two major functions was specific of the intracellular stage or was already induced by oyster plasma, we compared the expression of candidate genes after 30 min, 1h and 2h in SSW, oyster plasma, or hemolymph (hemocytes kept in plasma). Gene expression was monitored by RT-qPCR in three independent experiments using three reference genes whose expression was not regulated in the RNAseq conditions to normalize the data. Our RT-qPCR data showed that the antioxidant genes *ahpC1* and *sodA* were strictly induced after entry into hemocytes, while the copper efflux genes *copA* and *cusC* were already induced in oyster plasma (Fig. 3).

#### **Mutants impaired in copper efflux and antioxidants are attenuated in intracellular survival and cytotoxicity**

To determine whether the copper efflux systems and the antioxidant response of LGP32 were needed for the bacterium to survive in the hemocyte phagosome and cause damages to LGP32-invaded hemocytes, we constructed deletion mutants lacking *ahpC1*, *sodA*, *copA* and *cusAB*. Correct deletions were confirmed by PCR and sequencing (data not shown). The four mutants were then phenotyped for their capacity to grow after phagocytosis by hemocytes. For that, they were transformed with the high copy pMRB-HC-*gfp* plasmid as done with the wild-type LGP32 (Fig. 1A,B). For all four mutants, we first confirmed that (i) their growth in rich medium was not significantly affected by the mutation, and (ii) they were phagocytosed as efficiently as the wild-type LGP32 (data not shown). Interestingly, on hemocyte monolayers, we observed an almost complete loss of growth for the  $\Delta$ *sodA* mutant and a strongly attenuated growth phenotype for the  $\Delta$ *copA* mutant ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4A). On the contrary,  $\Delta$ *cusAB* and  $\Delta$ *ahpC1* had no significant growth defect on hemocyte monolayers (Fig. 4A).

Copper efflux and antioxidant mutants also displayed an attenuated cytotoxicity to hemocytes in the Sytox green assay. Indeed, both  $\Delta$ *sodA* and  $\Delta$ *copA* were two times less cytotoxic than the wild-type

LGP32 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4B). On the contrary,  $\Delta cusAB$  and  $\Delta ahpC1$  had no significant cytolytic defect (Fig. 4B). To confirm further the role of copper efflux and antioxidant genes in LGP32 cytotoxicity towards hemocytes, the deletion mutants were complemented with a low- and a high-copy pMRB plasmid carrying the corresponding ORF of the deleted gene. We confirmed that complementation of *cusAB* and *copA* could restore the tolerance of LGP32 to high copper concentrations in a zone inhibition assay (Table 2). Restoration was dependent on the level of *copA* and *cusAB* gene expression as indicated by the higher tolerance to copper of mutants carrying high-copy MRB plasmids. Importantly, complementation assays also showed a dose-dependent restoration of the LGP32 cytotoxicity to hemocytes (Fig. 4C), confirming the essential role of *copA* and *sodA* in the LGP32-induced host cell damages.

### **LGP32 copper-efflux deletion mutants are attenuated in oyster experimental infections.**

We finally tested the role of antioxidants and copper efflux systems in the virulence of LGP32 in experimental infections of juvenile oysters. The antioxidant mutants  $\Delta ahpC1$  and  $\Delta sodA$  did not show significant attenuation of their virulence in experimental infections, as shown in Kaplan Meier survival curves representative of three independent experiments (Fig. 5). On the contrary, the copper efflux mutants  $\Delta cusAB$  and  $\Delta copA$  showed an attenuated virulence (Fig. 4). Indeed, mortalities at day 7 dropped from 85% for LGP32 down to 65% ( $p < 0.005$ ) and 72% ( $p < 0.05$ ) for the  $\Delta copA$  and  $\Delta cusAB$  mutants, respectively. Altogether, these data show that copper efflux is one major function not only essential for LGP32 intracellular survival and cytotoxicity to hemocytes, but also involved in the virulence phenotype of LGP32 in oyster experimental infections.

## **Discussion**

While several *Vibrio* species have been shown to adopt intracellular stages in professional phagocytes like macrophages and amoebae, the molecular functions sustaining intracellular life in vibrios have not been elucidated to date. Here we show that copper homeostasis and the antioxidant response of *Vibrio tasmaniensis* LGP32 are essential determinants of its capacity to survive inside hemocytes, the circulating professional phagocytes of oysters. Beyond its role in intracellular survival, we show that copper homeostasis is a key function that is required for LGP32 cytotoxicity and contributes to virulence in oyster experimental infections.

Entry and survival inside hemocytes were shown to be essential for expression of LGP32 cytotoxicity towards hemocytes. Indeed, we found that (i) phagocytosis was required for LGP32 cytotoxicity (Fig.

1A) and (ii) that  $\Delta sodA$ ,  $\Delta cusAB$  and  $\Delta copA$  mutants affected in intracellular survival were also attenuated for hemocyte cytotoxicity (Fig. 4). Unlike LGP32, the avirulent strain LMG20 012T was not cytotoxic to hemocytes although it was as efficiently phagocytosed (Fig. 1B&C). Entry into hemocytes was also required for LGP32 replication under our *in vitro* experimental conditions, *i.e.* in the absence of extracellular nutrients. Indeed, LGP32 replicated efficiently in the presence of hemocytes while no growth could be observed when LGP32 was incubated in SSW alone (Fig. 1A). As a massive release of extracellular LGP32 was observed 5h after phagocytosis, when hemocyte lysis occurs (Fig. 1B), LGP32 entry into hemocytes and subsequent lysis are likely involved in LGP32 replicative process within the host. As proposed for the *V. cholerae*-promoted lysis of epithelial cells (Nielsen et al., 2010), our *in vitro* data strongly suggest that the release of intracellular nutrients from host cells could promote LGP32 growth (Fig. 1). Our microscopy data did not show any evidence of escape from the phagocytic vacuole (this study and (Vanhove et al., 2014)), making LGP32 intracellular traffic distinct from that of *V. parahemolyticus* (de Souza Santos and Orth, 2014). On the contrary, we observed large vacuoles (Fig. 1B and (Vanhove et al., 2014)) containing numerous vibrios similar to those observed for intravacuolar pathogens like *Legionella* (Kumar and Valdivia, 2009).

One important function required for LGP32 survival in the phagosome hostile environment was the antioxidant response. Indeed, the *sodA* (VS\_2918) and *ahpC1/ahpF* (VS\_2126, VS\_2127) antioxidant genes, which encode a manganese superoxide dismutase (MnSOD) and an alkyl hydroperoxide reductase complex, respectively, were among the most highly induced genes in the intracellular condition (Table S2). Their induction was confirmed to be specifically associated to the intracellular stage (Fig. 3). SODs catalyze the conversion of superoxide ion ( $O_2^{\cdot-}$ ), a highly toxic oxygen radical, to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and dioxygen ( $O_2$ ). SODs have been identified in diverse *Vibrio* species. In *V. vulnificus*, three SODs, which use Mn, Fe or Zn/Cu as cofactors, contribute to tolerance to oxidative stress (Kang et al., 2007). As oyster hemocytes respond to phagocytosis by a rapid and massive oxidative burst (Poirier et al., 2014) highly toxic to phagocytosed microorganisms, the intracellular induction of the MnSOD VS\_2918 (*sodA* gene product) was particularly interesting. The essential role of the MnSOD in LGP32 survival in oyster phagocytes was shown by the dramatic loss of growth of the  $\Delta sodA$  LGP32 mutant in hemocytes (Fig. 4A). As phagosomes are characterized by a low pH due to the active influx of protons, this phenotype is highly consistent with the role of MnSOD in resistance to acidic pH demonstrated earlier in *V. vulnificus* (Kim et al., 2005). The *V. vulnificus* MnSOD was also induced by signals including low iron and acidic pH (Kim et al., 2005), which are signals likely encountered by LGP32 in its intraphagosomal stages. To our knowledge, we report here for the first time the essential role of a MnSOD (VS\_2918) in the intracellular survival of a *Vibrio* species. However, outside vibrios, MnSODs have been reported to participate in intracellular survival

within professional phagocytes, as shown in the resistance to macrophage killing of *Providencia alcalifaciens* (Chen et al., 2007).

Among vibrios, the only SOD described for its role in intracellular survival is a FeSOD from the coral pathogen *V. shiloi*, which contributes to survival in coral ectodermal cells and virulence (Banin et al., 2003). Its N-terminal sequence was identical to that of VS\_0961, a FeSOD from LGP32 and VP2118, the primary SOD of *V. parahaemolyticus* against oxidative stress (Le et al., 2012). VS\_0961 and VP2118 have very similar amino acid sequences (93.3% identity; Fig. S2). However, unlike the MnSOD (VS\_2918), the FeSOD (VS\_0961) of LGP32 was not significantly overexpressed inside oyster hemocytes (Table S1). As in LGP32, expression of FeSOD was reported to be constitutive in *V. vulnificus* (Kim et al., 2005). Altogether, this suggests that FeSOD has only a secondary role at this stage of LGP32 infectious process. Interestingly, in *E. coli*, MnSOD is expressed under iron-limiting conditions, when FeSOD is repressed (Niederhoffer et al., 1990). This may explain why MnSOD plays a crucial role in LGP32 intraphagosomal stages, where iron is scarce as indicated by the intracellular activation of iron uptake (Table S1). FeSODs and MnSODs, which share a common ancestor, have very similar sequences (Fig. S2). From our present data and studies on *V. shiloi* (Banin et al., 2003), Fe and MnSODs are required for intracellular survival of vibrios. As they are highly conserved across *Vibrio* species, they could be involved in the intracellular survival of other *Vibrio* species like *V. parahaemolyticus* inside epithelial cells, or *V. cholerae* and *V. mimicus* inside amoebae.

The *ahpC1* gene (VS\_2126) was identified here as the most strongly induced antioxidant of intracellular LGP32, far above the *sodA* gene or the catalase gene (VS\_II0148) (Table S1). Like catalases, the alkyl hydroxyperoxide reductase AhpCF complex participates in the antioxidant response by converting H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water. This thiol-based peroxidase transfers electrons from NADH to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, thereby reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water. In *E. coli*, it is considered the more efficacious scavenger during low-level H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress (for review see Imlay 2013, Nat Rev microbiol). The intracellular induction of *ahpC1* is consistent with the induction of the *ahpC* gene in *Vibrio harveyi* exposed to sublethal concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vattanaviboon and Mongkolsuk, 2001). However, unlike the  $\Delta$ *sodA* mutant, the  $\Delta$ *ahpC1* mutant did not show any attenuated phenotype in our assays. Diverse phenotypes have been associated to *ahpC* deletions in vibrios. In *V. vulnificus*, deletion of *ahpC1* altered its toxicity to epithelial cells and virulence in mice experimental infections (Baek et al., 2009). On the contrary, in *V. cholerae*, deletion of *ahpC* did not alter host colonization (Davies et al., 2011). To date, the role of *ahpC* in intracellular survival has not been investigated in vibrios. However, like in LGP32, in *Legionella pneumophila*, *ahpC* was shown to be overexpressed intracellularly but its deletion did not modify bacterial growth inside macrophages (Rankin et al., 2002). The lack of phenotype associated to *ahpC1* deletion in LGP32 can be due to phenotypic complementation by the



*ahp/tsa* peroxiredoxin gene (VS\_0593) also referred to as *ahpC2* (Fig. S3), or by the catalase gene VS\_II0148. Indeed, in the intracellular pathogen *L. pneumophila*, *ahpC2* expression was significantly increased in the *ahpC1* mutant, indicating that the *ahpC2* system compensates for oxidative stress (LeBlanc et al., 2006). Recent studies in *V. parahaemolyticus* have shown that the protective activity of both *ahpC1* (VPA1683) and *ahpC2* (VP0580) is crucial to the growth of this pathogen under extrinsic oxidative stress (Wang et al., 2013; Chung et al., 2014). Therefore, the characterization of *ahpC2* (VS\_0593) function in a  $\Delta$ *ahpC1* background appears now essential for understanding the lack of phenotype of our  $\Delta$ *ahpC1* mutant in terms of intracellular survival and virulence in oyster experimental infections.

While copper homeostasis has been poorly studied in vibrios, it was identified here as one major function required for LGP32 intracellular survival, cytotoxicity and virulence in oyster experimental infections. Indeed, in the intracellular condition, 5 genes involved in copper efflux were among the 34 most overexpressed genes (0.8% of the genome) (Table S1). These include *cusCBAF* (VS\_II0513 to VS\_II0516) and *copA* (VS\_0768), which encode a copper RND-transporter and a P-type ATPase, respectively. Activation of copper efflux is an important mechanism to avoid copper toxicity. Indeed, under aerobic conditions, the redox properties of Cu(I) enable the generation of hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\cdot$ ) from  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Thus, free copper enhances the production of highly reactive oxygen species that create damages to a broad series of macromolecules and largely contribute to copper antimicrobial properties (Hodgkinson and Petris, 2012). Our RT-qPCR experiment showed that the induction of both *cusC* and *copA* already occurred in oyster plasma (Fig 3), likely due to the abundance of copper in oyster hemolymph. Like oyster plasma, the phagosome is a compartment rich in copper. For instance, intraphagosomal accumulation of copper has been shown in macrophages after internalization of mycobacteria (Wagner et al., 2005). By using  $\Delta$ *copA* and  $\Delta$ *cusAB* deletion mutants, we showed here that (i) copper transporters confer tolerance to high copper concentrations (Table 2) and (ii) copper homeostasis plays a crucial role in LGP32 survival inside hemocytes (Fig. 4).

In particular, the CopA P-type ATPase (VS\_0768) was shown here to be a major determinant of LGP32 intracellular survival, cytotoxicity and virulence in oyster experimental infections as demonstrated by the attenuated phenotypes of the  $\Delta$ *copA* in our series of *in vitro* and *in vivo* assays (Fig. 4-5). P-type ATPases are widespread among Gram-positive and Gram-negative bacteria in which they export Cu(I), the more toxic form of copper across the plasma membrane (for review see (Hodgkinson and Petris, 2012). CopA is conserved in 85% of the  $\gamma$ -proteobacteria, in which it helps maintaining the cytoplasm virtually free of copper (Hernandez-Montes et al., 2012). As shown here for LGP32 in our *in vitro* assays, CopA is required for copper tolerance in *V. cholerae* (Marrero et al.,

2012). However, in this species, like other copper tolerance proteins from *V. cholerae*, it was not required for virulence in experimental infections in mice. This may be due to the pathogenesis of *V. cholerae*, which does not experiment copper-rich environments in its host.

While little is known about copper efflux in the biology of vibrios, P-type ATPases homologous to CopA have been described in diverse species of intracellular bacteria like *Salmonella* (CopA) (Espariz et al., 2007) and *Mycobacterium* (CtpV) (Rowland and Niederweis, 2012). As in the LGP32/hemocytte interaction, genes encoding P-type ATPase are upregulated when such pathogens, which enter macrophages and replicate inside phagosomes (Chaturvedi and Henderson, 2014). This overexpression of bacterial copper-efflux genes corresponds to an increased copper concentration in bacteria-containing phagosomes up to several hundred micromolar (Wagner et al., 2005). The main effectors of copper influx in phagosomes of macrophages are CTR1 and ATP7A (for review see (Hodgkinson and Petris, 2012)). The suppression of ATP7A expression in macrophages was shown to abolish intracellular killing of *E. coli* (White et al., 2009), indicating that copper is essential to the bactericidal activity of the phagosome. Three ATP7A and two CTR1 genes are found in the genome of *Crassostrea gigas* (accession numbers gbIEKC33905.1, gbIEKC18325.1, gbIEKC28422.1 and gbIEKC31900.1, gbIEKC33878.1). Therefore, like other intracellular pathogens replicating inside phagosomes (Wolschendorf et al., 2011), LGP32 likely uses copper efflux genes to resist the high copper concentrations to which it is exposed intracellularly. It has been hypothesized that copper detoxification has been conserved during evolution to provide protection against phagocytosis either by host immune cells or environmental amoebae (Raimunda et al., 2011; German et al., 2013). This hypothesis is supported by our present data, which show that pathogens capable to survive inside phagocytes of invertebrates (here the oyster) use similar strategies compared to pathogens surviving inside macrophages of vertebrates.

Besides CopA, the CusABC RND transporter was shown here to participate in copper efflux and virulence of LGP32. However, the  $\Delta cusAB$  mutant had very weak phenotypes compared to the  $\Delta copA$  mutant in terms of copper efflux (Table 2), intracellular survival and cytotoxicity to hemocytes (Fig. 4). The CusABC transporter forms a tripartite complex that spans the periplasmic space, exporting Cu(I) from the cytoplasm to the outside of the cell. It can also export Cu(I) from the periplasmic space to the outside thanks to CusF, a periplasmic accessory protein present in LGP32 genome (VS\_II0517). It has been suggested that CusC could still be functional in the absence of CusAB (Hernandez-Montes et al., 2012). This could explain the lower phenotype of the  $\Delta cusAB$  mutant, which in presence of *copA*, *cusC* and *cusF* could still efflux sufficient amount of intracellular copper to survive intracellularly.

In conclusion, this study demonstrates for the first time in a *Vibrio* species the essential role of copper efflux and antioxidants in survival inside host cells. The molecular effectors we identified here are widespread among  $\gamma$ -proteobacteria and vibrios in particular. Importantly, vibrios are increasingly recognized to adopt intracellular stages in their hosts or in environmental protozoans. Therefore, *Vibrio* intracellular stages may be major determinants of their capacity to survive in the environment or emerge as pathogenic species pre-adapted to their superior hosts. It will now be important to characterize the cytolytic mechanism expressed in those intracellular stages. In *V. parahaemolyticus*, the T3SS is essential for cytotoxicity to host epithelial cells (Zhang et al., 2012; de Souza Santos and Orth, 2014). Such a T3SS is absent from the *V. tasmaniensis* LGP32 genome. In *V. cholerae*, cytotoxicity to macrophages was associated T6SS effectors (Ma et al., 2009), which do not appear overexpressed in the intracellular transcriptome of LGP32 (Table S1). Therefore, while the bacterial effectors required for intracellular survival are conserved across *Vibrio* species, likely due to the high degree of conservation of the phagocytotic machinery they have to face from protozoans to metazoans (Boulais et al., 2010), the *Vibrio* cytolytic mechanisms could be much more diverse may have been shaped by the specialized ecological niches of the different *Vibrio* species.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Adult diploid *Crassostrea gigas* were purchased from the local oyster farm in Le Petit Mas (Mèze, France) and used for RNAseq and RT-qPCR analyses. Adult triploid *Crassostrea gigas* were purchased from the local oyster farm in CAT de Maguelone (Palavas, France) to perform *in vitro* cell biology experiments. For experimental infections, juvenile diploid *Crassostrea gigas* oysters were purchased from the Ifremer oyster hatchery in La Tremblade (Charente Maritime, France).

### **Bacterial strains and culture condition**

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

### **Vector construction**

For mutagenesis, cloning was performed using the Gibson assembly method according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, NEB). Two independent PCR amplifications of the regions (500 bp) encompassing the gene to delete were performed using two primer pairs (1+2 and 3+4) (Table 2). An inside out PCR was performed using pSW7848T suicide vector DNA (Val et al., 2012) and primer pair (pSW-F and pSW-R) (Table S2). For complementation experiment, the gene was cloned under the control of a constitutive P<sub>LAC</sub> promoter in a pMRB plasmid (Le Roux et al., 2011). Two independent PCR amplifications of the gene and plasmid were performed using the primers gene-F+R and pMRB-F+R reciprocally. After purification and quantification, 100 ng of the PCR products were mixed with Gibson assembly Master Mix and incubated for 60 minutes at 50°C. Samples were diluted at 1/3 before *E. coli* transformation. Clones were controlled by digestion with restriction enzyme and sequencing using the primers described in Table S2. Strains  $\pi$ 3813 and  $\beta$ 3914 were used as a plasmid host for cloning and conjugation, respectively (Le Roux et al., 2007). Plasmids and strains used and established in the present study are presented in Table S2. Mating was performed as described previously. Mutants were screened by PCR using external primer 5+6 listed in Table S2.

#### ***Vibrio* interactions with oyster hemocytes *in vitro***

Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 mL syringe with a 23-G needle. After cell counting, freshly collected hemolymph was dispensed wells to obtain hemocytes monolayers in the desired plate format (see below). In parallel, after growing vibrio strains at 20°C in Zobell medium for 14h, bacteria were washed in SSW by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of  $2.10^9$  cfu/ml deduced from OD<sub>600</sub> reads.

#### ***Vibrio* intracellular survival assay**

In a black 96 wells plate with transparent flat bottom,  $2 \times 10^5$  hemocytes were plated per well. Then, *Vibrio* strains carrying high copy pMRB-GFP were added one hour after plating hemocytes, at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation 5min at 400g. After 1h of phagocytosis, hemocytes were carefully washed three times with SSW to remove any remaining extracellular bacteria. Then GFP fluorescence was measured every 30 min over 20h using a TECAN plate reader (480nm/520nm). Within a single experiment, each condition was performed in triplicates and the depicted results are average over three independent experiments. Statistical analysis was performed using 2 ways ANOVA over the independent experiments.

#### **Cytotoxicity assay**

In a black 96 wells plate with transparent flat bottom,  $2 \times 10^5$  hemocytes were plated per well. After growing, *Vibrio* strains were incubated in 0.22  $\mu\text{m}$  filtered oyster plasma for 1h to allow opsonisation. Oposonized bacteria were washed in SSW to remove plasma, and were added to hemocytes monolayers in SSW containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Sytox Green (Molecular Probes) at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation 5min at 400g. Bacterial density and Sytox Green fluorescence were determined respectively at OD<sub>600</sub> and 480nm/550nm over 14h by using a TECAN microplate reader. For control, washed bacteria were incubated in Sytox diluted in SSW. Hemocytes were incubated in Sytox diluted in SSW in presence or absence of Triton X-100 (0,1%). Hemocytes were incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  of cytochalasin D, an actin polymerization inhibitor that inhibits phagocytosis. The results are representative of three independent experiments. The 2 factors-ANOVA test was used to estimate p-values for comparing cytotoxicity phenotype.

### **Fluorescence microscopy**

Hemocytes were plated onto glass coverslips in a 24-well plate to obtain monolayers of  $5 \times 10^5$ . After adherence, hemocytes were exposed to SSW washed vibrios carrying pMRB-GFP at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation 5min at 400g. After 1h, 3h and 5h-incubation, culture supernatants were fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min and cytopsin 5min at 1000g to desposit any bacteria and hemocytes present in the supernatants onto a microscope slide. The remaining cells monolayer in the bottom of the wells, were fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min, all samples were stained with 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI (Sigma) and 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Phalloidin TRITC (Sigma). Fluorescence imaging was performed using a Zeiss Axioimager fluorescence microscopy with Zeiss 63x Plan-Apo 1.4 oil objectif equipped with a Zeiss MRC black and white camera for image acquisition.

### ***Vibrio* transcriptomic analysis by RNAseq.**

LGP32 was grown at 20°C in Zobell medium for 10h and washed twice in SSW by centrifugations (10min, 1000g, 20°C). Bacteria were then diluted in SSW at OD<sub>600</sub> of 0.5 ( $1.10^9$  cfu/mL equivalent).

Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 mL syringe with a 23-G needle. Freshly collected hemolymph was dispensing in a 6-well plate to obtain monolayers of  $6 \times 10^6$  hemocytes per well. One hour after plating, vibrios were added at a multiplicity of infection of 100:1, and plates were centrifuged 5min at 400g for binding synchronization. After 1h of co-incubation, wells were washed extensively three times with SSW to remove extracellular bacteria and Trizol reagent (Invitrogen) was poured into the wells for total RNA extraction. The efficiency of vibrios internalization in hemocytes was verified by microscopy and showed that about 40% of hemocytes

internalized bacteria and 50 to 70 bacteria were observed with rare bacteria remaining extracellular. As control, washed bacteria were incubated in SSW for 1h and resuspended in Trizol after centrifugation. RNA from three independent experiments of LGP32 phagocytosis by hemocytes were extracted using Trizol reagent protocol (Life Technologies). RNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) and quality was monitored by agarose gel electrophoresis and a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). DNA traces in the samples were then removed using by Ambion DNA-free™ Kit following the manufacturer instructions. A Bioanalyzer analysis showed that bacterial RNAs represented approximately 10% of the total RNA in the intrahemocyte samples. Control samples were prepared by mixing total RNA extracted from free-living *V. splendidus* with *C. gigas* hemocyte RNA with a ratio 1:9.

To try to enrich the samples in bacterial RNAs, we use successively the MICROBEnrich™ Kit (Ambion) and because this kit is based on oligonucleotides that are designed to capture rRNAs from mammal species, which are not efficient with invertebrate rRNAs, we did a further depletion step using a 5'-phosphate-dependent exonuclease (Terminator, Epicentre), that degrades processed transcripts, following instructions from the manufacturer. Bacterial rRNAs were then removed using the MICROBExpress™ Kit (Ambion) following the manufacturer instructions. For cDNA sequencing, a directional cDNA library was constructed and sequenced on an illumina Hiseq 1000, in paired-ends reads of 2x100bp. 3 samples were multiplexed per lane allowing the obtention of ~ 60 x 10<sup>6</sup> reads per sample.

### **Sequencing data analysis.**

Transcriptomic high throughput sequencing data were analyzed using a bioinformatic pipeline implemented in the Microscope platform (Vallenet et al., 2013). The current pipeline is a “Master” shell script that launches the various parts of the analysis (i.e. a collection of Shell/Perl/R scripts) and controls for all tasks having been completed without errors. In a first step, the RNA-Seq data quality was assessed by including option like reads trimming or merging/split paired-end reads. In a second step, reads were mapped onto the *V. tasmaniensis* LGP32 genome (genome ID: 13995, assembly GCA\_000091465.1, NCBI) using the SSAHA2 package (Ning et al., 2001) that combines the SSAHA searching algorithm (sequence information is encoded in a perfect hash function) aiming at identifying regions of high similarity, and the cross-match sequence alignment program (Ewing et al., 1998), which aligns these regions using a banded Smith-Waterman-Gotoh algorithm (Smith and Waterman, 1981). An alignment score equal to at least half of the read is required for a hit to be retained. To lower false positives discovery rate, the SAMtools (v.0.1.8) (Li et al., 2009) are then used to extract reliable alignments from SAM formatted files. The number of reads matching each

genomic object harbored by the reference genome is subsequently computed with the Bioconductor-Genomic-Features package (Carlson et al., 2011). If reads matching several genomic objects, the count number is weighted in order to keep the same total number of reads. Finally, the Bioconductor-DESeq package (Anders and Huber, 2010) with default parameters is used to analyze raw counts data and test for differential expression between conditions.

### **RT-qPCR analyses.**

LGP32 was grown at 20°C in Zobell medium for 10h and washed twice in SSW by centrifugations (10min, 1000g, 20°C). Bacteria were then diluted in SSW at OD<sub>600</sub> of 0.5 (1.10<sup>9</sup> cfu/mL equivalent). Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 mL syringe with a 23-G needle. Freshly collected hemolymph was dispensing in a 6-well plate to obtain monolayers of 6 × 10<sup>6</sup> hemocytes per well. Plasma from hemolymph was prepared by centrifugation at 1000g for 10min and supernatant filtered through a 0.22 µm pore-size. Opsonisation of vibrios was performed by incubating bacteria for one hour into plasma. After adherence of hemocytes, vibrios were added to hemocytes at a multiplicity of infection of 100:1 (1h, room temperature) using the washed culture of LGP32 at 1.10<sup>9</sup> cfu/mL. Then, plate was centrifuged 5min at 400g for binding synchronisation. After 1h of co-incubation, wells were washed extensively three times with SSW to remove extracellular bacteria and Trizol reagent (Invitrogen) was poured into the wells for total RNA extraction. For control, bacteria were incubated in either SSW or oyster plasma for 1h and resuspended in Trizol after centrifugation. Total RNA were extracted from Trizol using the DirectZol RNA Miniprep (R2051) according to manufacturer's instructions (ZymoResearch) and then treated by DNaseI to remove contaminating genomic DNA, using the DNA-free kit (Ambion) before purification by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantification of total RNA were checked using NanoDrop spectrophotometer (Thermo, Fisher Scientific) and quality was monitored using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). Real-time qPCR was performed either at the Imagif platform (Gif sur Yvette) on an ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System using a Fast SG qPCR Master Mix (Roboklon), or at the MGX platform in Montpellier using a the Light-Cycler 480 System (Roche) and the primers listed in Table S3. Relative expression was calculated using the 2-ΔΔCq method (Pfaffl, 2001), with normalization of three constitutively expressed genes 6PKF (VS\_2913), MGS (VS\_II1055) and ccmC (VS\_0852).

### **Copper sensitivity**

Paper disks (Sigma Z741310) were loaded with CuSO<sub>4</sub> by soaking them over-night into a 50mM CuSO<sub>4</sub> solution (Sigma C7631). Stationary phase LGP32 culture at DO= 1 was diluted at 1/10 in fresh Zobell medium and 100µl were spread onto a Zobell agar plate. Using a sterile crowbar, copper disks were

deposit above bacteria and placed at 20°C. After 24h-incubation, inhibition diameters of mutant strains were measured and compared to the wild type.

### **Experimental infections**

Experimental infections were performed at 20 °C, as previously described (Duperthuy et al., 2010). Groups of 45 oysters were injected with the different strains of LGP32 ( $4 \times 10^7$  CFU per spat). An equal volume of SSW was injected to control animals. Colony forming units of bacteria were checked by counting on Zobell agar plates. For each condition, oysters were placed for 24h in 3 separate tanks in 6 L of seawater (15 animals per aquarium). Mortalities were followed during 7 days. The non-parametric Kaplan–Meier test was used to estimate Log-Rank values for comparing conditions. All experimental infections were performed according to the Ifremer animal care guideline and policy.



**Table 1. List of the 34 genes overexpressed more than 50 times in the intracellular condition.** This list is extracted from TableS1 which provides the extensive list of differentially regulated genes as determined by RNAseq. Genes characterized in the present study are in *boldface*.

Label	Name	Product	Pathways/functions	Functional category	log2 fold change
VS_II0905	-	Putative endoribonuclease, translation inhibitor	Virulence	Virulence	9.49
<b>VS_II0514</b>	<b>cusC</b>	<b>Copper efflux system outer membrane protein CusC</b>	<b>copper efflux</b>	<b>Metal homeostasis</b>	<b>9.2</b>
VS_II0517	cusF	Periplasmic copper binding protein CusF	copper efflux	Metal homeostasis	8.15
VS_II0904	-	Aldehyde dehydrogenase	Tryptophan metabolism; Propanoate metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	7.65
VS_1283	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	Unknown function	7.26
VS_II0149	-	Phospholipase	Virulence	Virulence	6.96
VS_II1062	inhA/prtV	Putative M6 secreted metalloprotease PrtV/InhA	Virulence	Virulence	6.94
<b>VS_2126</b>	<b>ahpC</b>	<b>Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 22</b>	<b>Oxydative stress</b>	<b>Stress response</b>	<b>6.9</b>
VS_2127	ahpF	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	Oxydative stress	Stress response	6.84
<b>VS_II0515</b>	<b>cusB</b>	<b>Copper efflux system, membrane fusion protein CusB</b>	<b>copper efflux</b>	<b>Metal homeostasis</b>	<b>6.76</b>
VS_1282	metE	Putative methylcobalamin:homocysteine methyltransferase	Methionine	Amino acid metabolism and transport	6.73
VS_2591	malC	Maltodextrin transport system permease protein MalC	Glycogen, starch and sucrose metabolism	Carbon compound utilization and transport	6.58
VS_1145	-	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate-homocysteine methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	Amino acid metabolism and transport	6.55
VS_1068	-	Outer membrane protein	Transport: others	Transport	6.39
VIBSP2_misc_RNA_19	Vsr217	IGR VS_II0219-VS_II0220	sRNA of unknown function	Unknown function	6.37
VS_2589	cymA	cytoplasmic membrane-associated tetrahaem c-type cytochrome	Energy production/respiration	Energy production and respiration	6.33
VS_3121	purK	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	Purine metabolism	Nucleoside and nucleotide metabolism	6.33
VS_0992	oppC	Oligopeptide transport system permease protein oppC	Transport: peptides	Amino acid metabolism; cofactor and small molecule carrier biogenesis	6.28
VS_2246	-	Putative succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	6.13
VS_1313	tctC	Putative tricarboxylate transport TctC	Carbon compound transport	Carbon compound utilization and transport	6.12
VS_2244	sdhB	succinate dehydrogenase	Butanoate metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	6.06
VS_II0903	-	Putative dipeptidase	Protein and peptide degradation	Protein and peptide degradation	6
VS_1461	ccoQ	cytochrome c oxidase, subunit CcoQ	Energy production/respiration	Energy production and respiration	5.93
VS_2585	-	cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor	Glycogen, starch and sucrose metabolism	Carbon compound utilization and transport	5.92
<b>VS_0768</b>	<b>copA</b>	<b>Copper-exporting P-type ATPase A CopA</b>	<b>copper efflux</b>	<b>Metal homeostasis</b>	<b>5.87</b>
VS_0175	cspA	Cold shock protein CspA	Stress response	Stress response	5.84
VS_1967	trpD	Anthranilate synthase beta subunit	Tryptophan synthesis	Amino acid metabolism and transport	5.81
VS_2927	pyrB	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	Nucleoside and nucleotide metabolism	5.72
VS_II0545	betT	Putative glycine betaine transporter	Osmotic stress	Stress response	5.71
VS_2382	metN	D-methionine transport ATP-binding protein metN	Transport: AA	Amino acid metabolism and transport	5.7
VS_2241	sucC	Succinyl-CoA synthetase beta chain	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	5.7
<b>VS_II0516</b>	<b>cusA</b>	<b>Copper efflux system protein, membrane component CusA</b>	<b>copper efflux</b>	<b>Metal homeostasis</b>	<b>5.69</b>
<b>VS_2918</b>	<b>sodA</b>	<b>Superoxide dismutase</b>	<b>Oxydative stress</b>	<b>Stress response</b>	<b>5.69</b>
VS_2242	-	Dihydropolyllysine-residue succinyltransferase (component of 2-oxoglutaratedehydrogenase complex)	Tryptophan metabolism	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	5.66

**Table 2. *copA* and *cusAB* are required for resistance to copper in LGP32**

Strains	Inhibition diameter (mm)
wild-type LGP32	15
$\Delta cusAB$	19
$\Delta cusAB$ : <i>cusAB</i> Low copy	18
$\Delta cusAB$ : <i>cusAB</i> High copy	14
$\Delta copA$	30
$\Delta copA$ : <i>copA</i> low copy	16

## Figure legends.

### Figure 1: Hemocyte phagocytosis and lysis support efficient replication of LGP32

**A. Replication of LGP32 in contact with hemocytes.** In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LGP32 (diamonds) or the avirulent control LMG20 012T (triangles). In controls (black symbols), bacteria were incubated in sterile sea water (SSW) in the absence of hemocytes. Growth was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. Values are presented +/- SEM. Values are presented +/- SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  (two ways ANOVA).

**B. Phagocytosis of LGP32 is followed by major hemocyte lysis and extracellular release of LGP32.** Monolayers of hemocytes having phagocytosed GFP-expressing LGP32 (A) or LMG20012T (B) were observed 1h, 3h and 5h after contact at a MOI of 50:1. Both strains were rapidly phagocytosed. Major hemocyte lysis as well as loss of cell adhesion were observed after 5h upon exposure to LGP32 only. This correlated with the release of extracellular vibrios, observed on both the coverslip and the culture supernatant. Nuclei were stained with DAPI and membranes with WGA-TRIC. Scale bar: 5 $\mu$ m.

**C. Cytotoxicity of LGP32 is dependent on hemocyte invasion.** Hemocyte monolayers were incubated with LGP32 (diamonds) or LMG20 012T (triangles) at a MOI of 50:1. Their cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. To determine whether hemocytes invasion is required for lysis, the same experiments were performed in the presence (black symbols) and absence (grey symbols) of cytochalasin D. The percentage of hemocyte lysis was obtained by comparison with a triton X100-included lysis (100% lysed hemocytes). Values are presented +/- SEM. \*\*\*  $p < 0.001$  (two ways ANOVA).

### Figure 2: Major functions induced intracellularly

Differentially expressed genes ( $\log_2$ ratio  $> 2$  or  $< -2$ ) were classified into functional categories (see Table S1). For each category, the number of genes with increased expression in the hemocytes is shown in black, and the number of genes with decreased expression is shown in white.

### Figure 3: Time-course of LGP32 antioxidant and copper-efflux gene expression monitored by qPCR.

*Vibrio* gene expression was analyzed in three biological replicates. Conditions included: *Vibrio* in SSW (control), *Vibrio* in oyster plasma (osponisation) and intracellular *Vibrio* in oyster hemocytes. Three times were tested (30min, 1h, 2h). Relative expression was calculated by normalization with three constitutively expressed genes (VS\_2913), ccmC (VS\_0852) and MGS (VS\_II1055). Results were standardized with the control condition (*Vibrio* in SSW). Data are the mean of gene expression in three independent experiments + /- SEM.

**Figure 4: Mutants impaired in copper efflux and antioxidants are attenuated in intracellular survival and cytotoxicity.** In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LGP32 (diamonds), its  $\Delta sodA$ ,  $\Delta copA$  or  $\Delta cusAB$  isogenic mutants (boxes), or LMG20 012T (triangles) used as a negative control.

**A.** Intracellular growth was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.001$  (two ways ANOVA).

**B.** Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. The percentage of hemocyte lysis was obtained by comparison with a triton X100-included lysis (100% lysed hemocytes). Values are presented +/- SEM. \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.001$  (two ways ANOVA).

**C.** Restoration of LGP32 cytotoxicity upon *copA* and *cusAB* complementation. Hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LGP32 (diamonds), its  $\Delta sodA$ ,  $\Delta copA$  or  $\Delta cusAB$  isogenic mutants (boxes), or the mutants carrying a plasmid expressing the delete gene at low (crosses) or high copy (dark grey symbols). The LMG20 012T strain (triangles) was used as a negative control. Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay.

**Figure 5: LGP32 copper-efflux deletion mutants are attenuated in oyster experimental infections.** Kaplan-Meier survival curves were generated from juvenile oyster experimental infections. Oyster were injected with  $4 \times 10^7$  cfu per animal of the wild-type LGP32 (square) or the isogenic  $\Delta sodA$ ,  $\Delta copA$  or  $\Delta cusAB$  (triangle) isogenic mutants. An injection of sterile seawater (SSW) was used as control (circle). Groups of 45 oysters (15 per seawater tank) were monitored for 7 days after infection. Data are representative of three independent experiments. \*\*  $p < 0.005$ ; \*  $p < 0.05$  (Log rank test).

### Acknowledgements

We are grateful to Stéphane Cruveiller and Claudine Médigue for the RNAseq analyses. We also thank Marc Leroy for technical assistance. We thank Dr Julien de Lorgeril and Phillipe Clair at the University of Montpellier for qPCR analyses. We are indebted to the Montpellier RIO Imaging platform of University of Montpellier 2. This work received financial support from the ANR (Vibriogen project, Blanc SVSE7 2011). Audrey Vanhove was supported by a fellowship from the University of Montpellier 1 and Ifremer.

## Bibliography

- Abd, H., Weintraub, A., and Sandstrom, G. (2005) Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol* **7**: 1003-1008.
- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G.B., and Sandstrom, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 33-39.
- Abd, H., Valeru, S.P., Sami, S.M., Saeed, A., Raychaudhuri, S., and Sandstrom, G. (2010) Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*. *Environ Microbiol Rep* **2**: 166-171.
- Anders, S., and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**: R106.
- Baek, W.K., Lee, H.S., Oh, M.H., Koh, M.J., Kim, K.S., and Choi, S.H. (2009) Identification of the *Vibrio vulnificus* *ahpCl* gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *J Microbiol* **47**: 624-632.
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J., and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* **46**: 418-422.
- Boulais, J., Trost, M., Landry, C.R., Dieckmann, R., Levy, E.D., Soldati, T. et al. (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* **6**: 423.
- Carlson, M., Pages, H., Aboyoun, P., Falcon, S., Morgan, M., Sarkar, D., and Lawrence, M. (2011) GenomicFeatures: tools for making and manipulating transcript centric annotations. In: Maintainer, B.P. (ed).
- Chaturvedi, K.S., and Henderson, J.P. (2014) Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 3.
- Chen, X., Kodama, T., Iida, T., and Honda, T. (2007) Demonstration and characterization of manganese superoxide dismutase of *Providencia alcalifaciens*. *Microbiol Immunol* **51**: 951-961.
- Chung, C.H., Ma, T.Y., Fen, S.Y., and Wong, H.C. (2014) Activity of Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C1 and C2 of *Vibrio parahaemolyticus* against Different Peroxides. *Appl Environ Microbiol*.
- Davies, B.W., Bogard, R.W., Dupes, N.M., Gerstenfeld, T.A., Simmons, L.A., and Mekalanos, J.J. (2011) DNA damage and reactive nitrogen species are barriers to *Vibrio cholerae* colonization of the infant mouse intestine. *PLoS Pathog* **7**: e1001295.
- de Souza Santos, M., and Orth, K. (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* Escapes the Vacuole and Establishes a Replicative Niche in the Cytosol of Epithelial Cells. *MBio* **5**.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P. et al. (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* **12**: 951-963.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F. et al. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2993-2998.

- Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E., Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2007) Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* **153**: 2989-2997.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* **8**: 175-185.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**: 355-366.
- German, N., Doyscher, D., and Rensing, C. (2013) Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* **8**: 1257-1264.
- Hernandez-Montes, G., Arguello, J.M., and Valderrama, B. (2012) Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiol* **12**: 249.
- Hodgkinson, V., and Petris, M.J. (2012) Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* **287**: 13549-13555.
- Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**: 525-537.
- Kang, I.H., Kim, J.S., and Lee, J.K. (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 1399-1402.
- Kim, J.S., Sung, M.H., Kho, D.H., and Lee, J.K. (2005) Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* **187**: 5984-5995.
- Kumar, Y., and Valdivia, R.H. (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe* **5**: 593-601.
- 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., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777-784.
- Le, T.T., Mawatari, K., Maetani, M., Yamamoto, T., Hayashida, S., Iba, H. et al. (2012) VP2118 has major roles in *Vibrio parahaemolyticus* response to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **1820**: 1686-1692.
- LeBlanc, J.J., Davidson, R.J., and Hoffman, P.S. (2006) Compensatory functions of two alkyl hydroperoxide reductases in the oxidative defense system of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **188**: 6235-6244.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N. et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079.
- 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.

- Marrero, K., Sanchez, A., Gonzalez, L.J., Ledon, T., Rodriguez-Ulloa, A., Castellanos-Serra, L. et al. (2012) Periplasmic proteins encoded by VCA0261-0260 and VC2216 genes together with copA and cueR products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **158**: 2005-2016.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* **172**: 1930-1938.
- Nielsen, A.T., Dolganov, N.A., Rasmussen, T., Otto, G., Miller, M.C., Felt, S.A. et al. (2010) A bistable switch and anatomical site control *Vibrio cholerae* virulence gene expression in the intestine. *PLoS Pathog* **6**: e1001102.
- Ning, Z., Cox, A.J., and Mullikin, J.C. (2001) SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res* **11**: 1725-1729.
- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., and Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**: 2326-2328.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P. et al. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem*.
- Raimunda, D., Gonzalez-Guerrero, M., Leeber, B.W., 3rd, and Arguello, J.M. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu<sup>+</sup>-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals* **24**: 467-475.
- Rankin, S., Li, Z., and Isberg, R.R. (2002) Macrophage-induced genes of *Legionella pneumophila*: protection from reactive intermediates and solute imbalance during intracellular growth. *Infect Immun* **70**: 3637-3648.
- Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* **58**: 143-159.
- Rowland, J.L., and Niederweis, M. (2012) Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis (Edinb)* **92**: 202-210.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., and Vonau, V. (2000) Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Organ* **40**: 109-115.
- Smith, T.F., and Waterman, M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* **147**: 195-197.
- Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* **13**: 1042-1052.
- 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**: D636-647.
- Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charriere, G.M., Le Roux, F., Goudenege, D., Gourbal, B. et al. (2014) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol*.
- Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2001) Unusual adaptive, cross protection responses and growth phase resistance against peroxide killing in a bacterial shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Lett* **200**: 111-116.
- Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., 3rd, Honer Zu Bentrup, K. et al. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* **174**: 1491-1500.
- Wang, H.W., Chung, C.H., Ma, T.Y., and Wong, H.C. (2013) Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3734-3743.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009) A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* **284**: 33949-33956.
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T.B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G. et al. (2011) Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1621-1626.
- Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., and Orth, K. (2012) Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* **1**: 453-460.



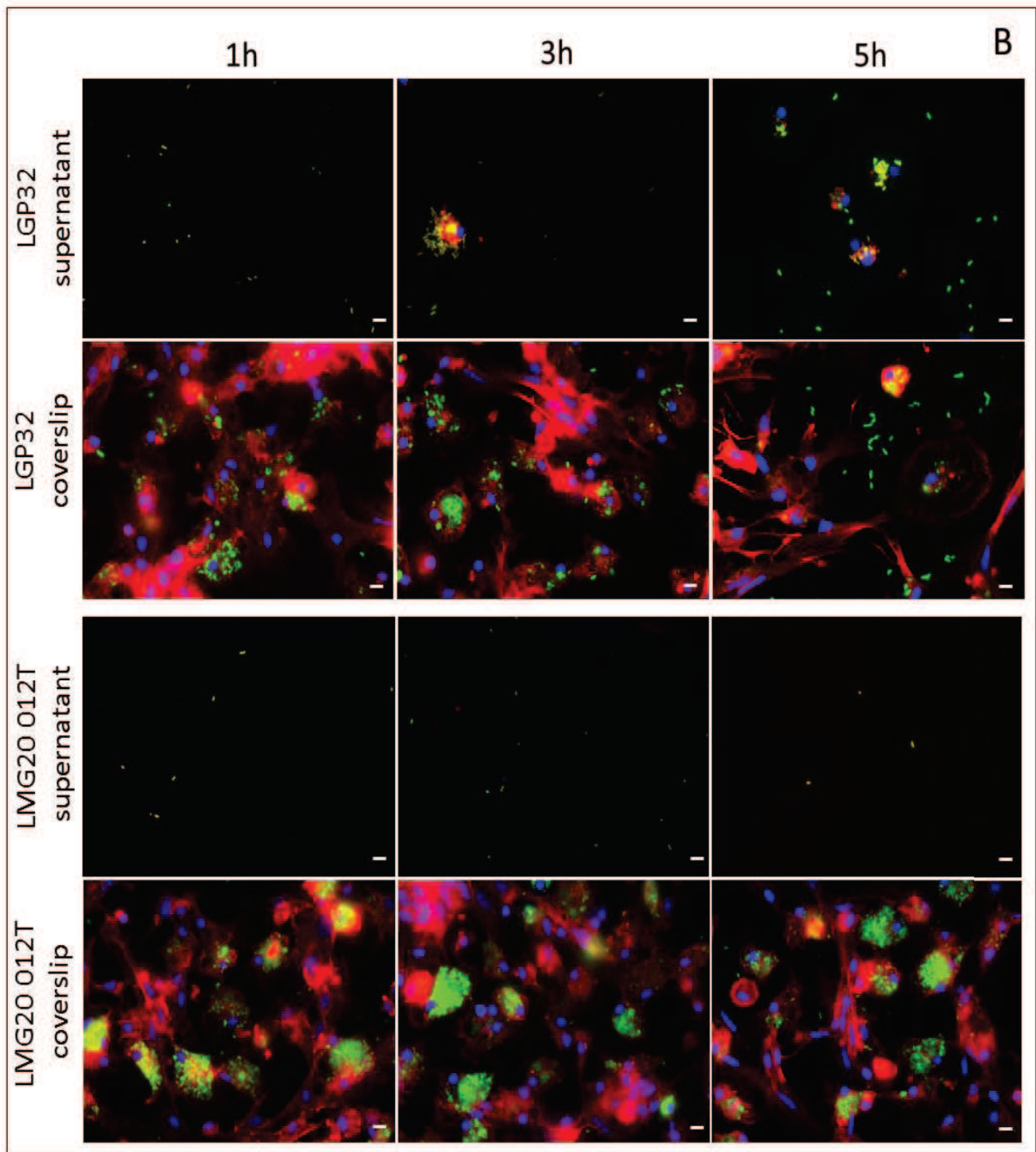
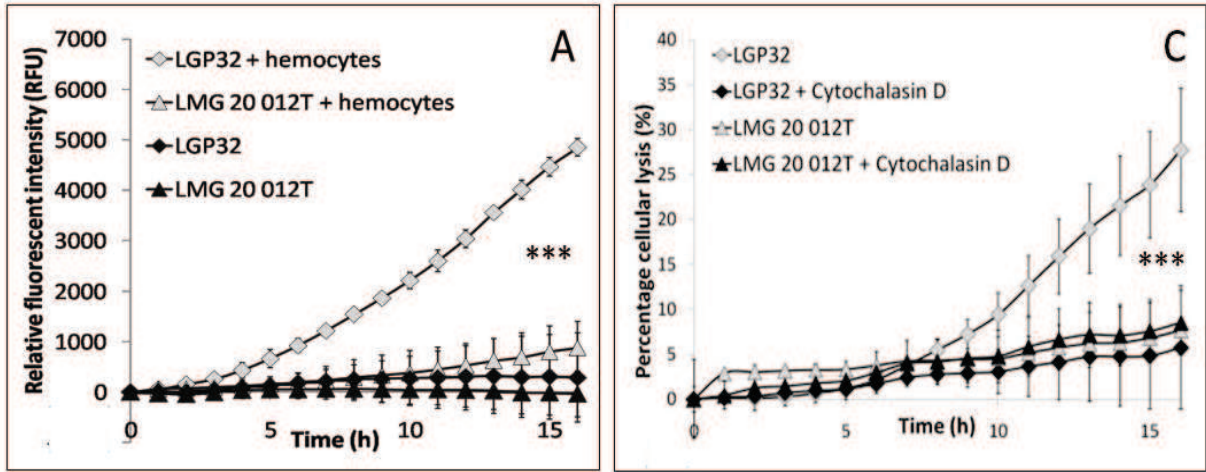


Figure 1: Hemocyte phagocytosis and lysis support efficient replication of LGP32

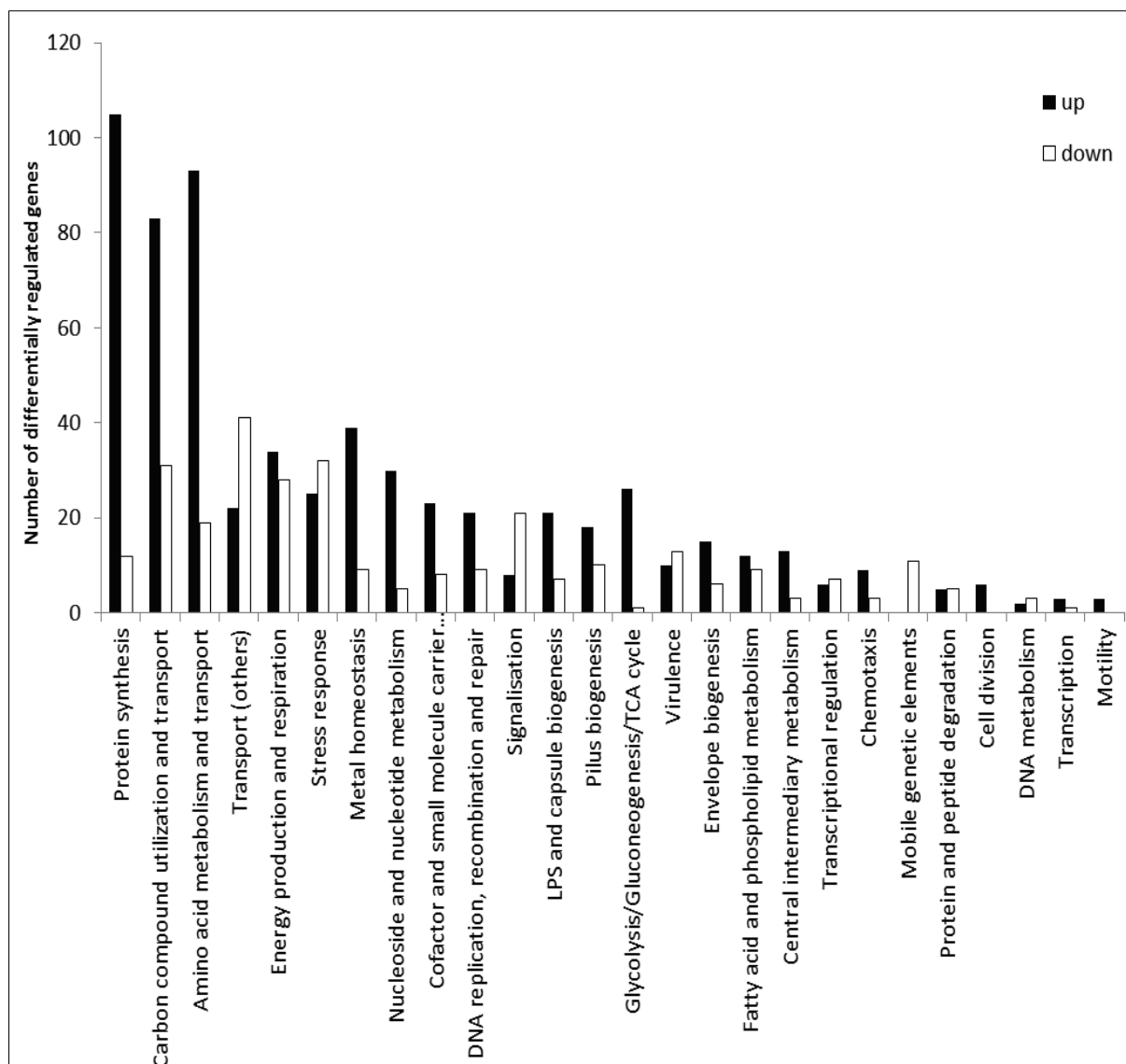


Figure 2: Major functions induced intracellularly

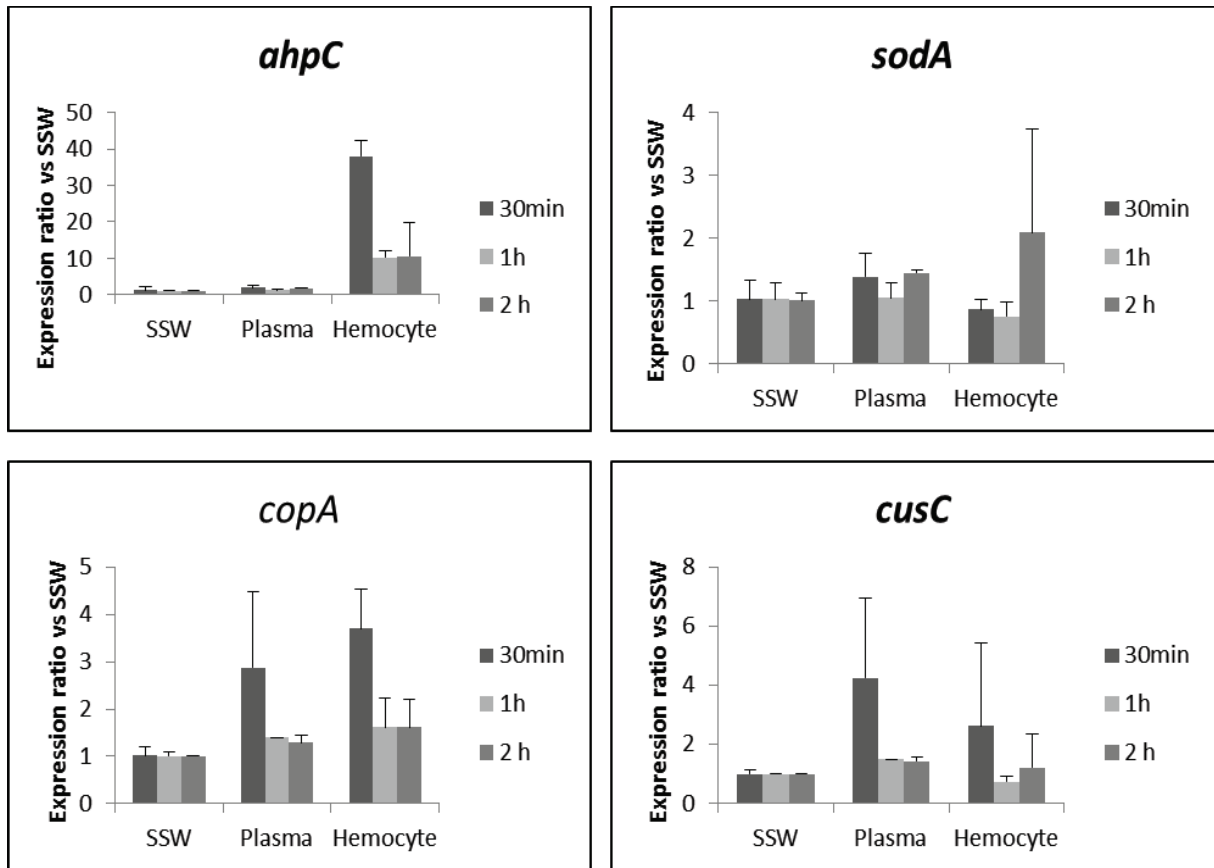


Figure 3: Time-course of LGP32 antioxidant and copper-efflux gene expression monitored by qPCR.

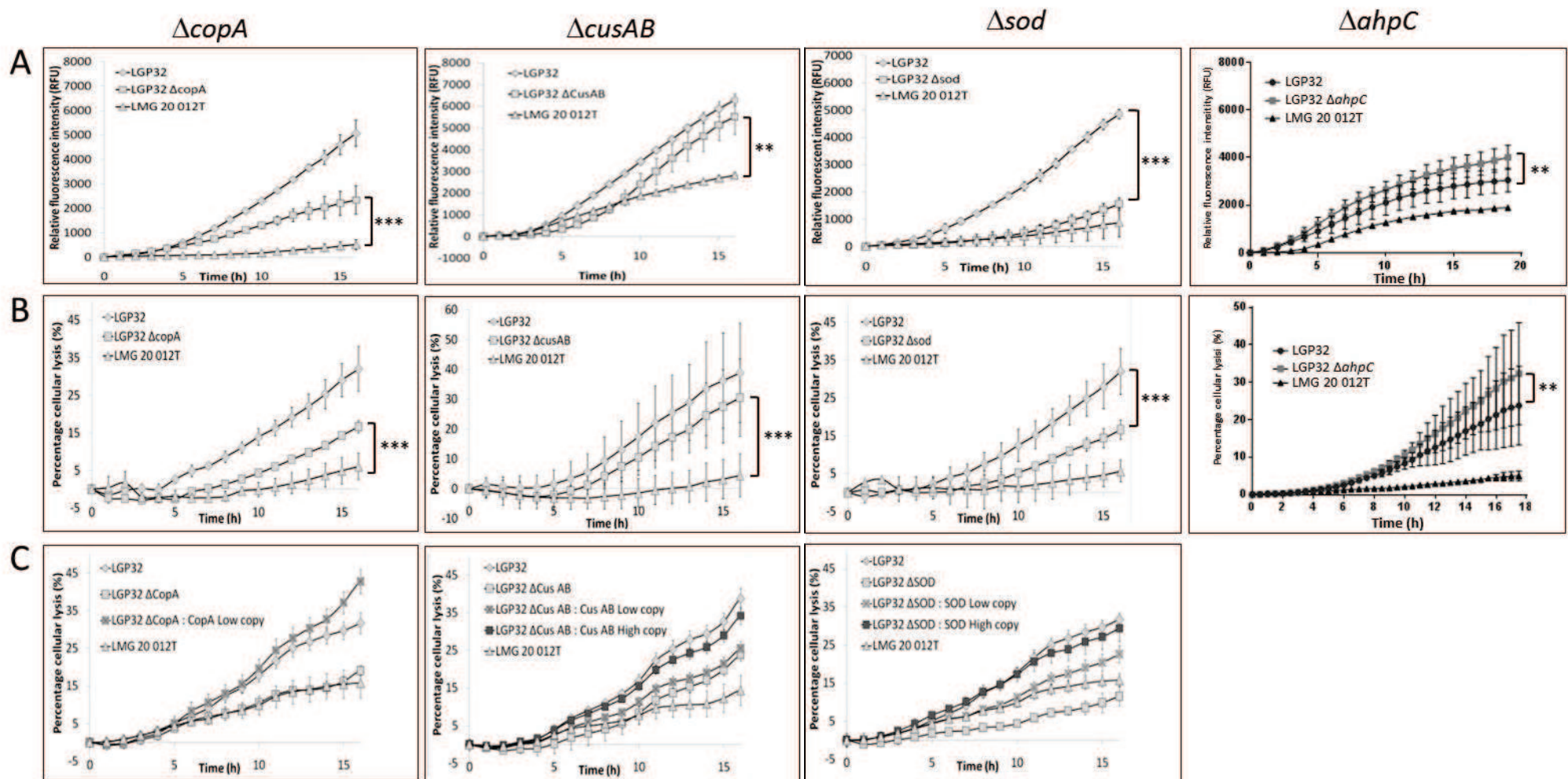


Figure 4: Mutants impaired in copper efflux and antioxidants are attenuated in intracellular survival and cytotoxicity.

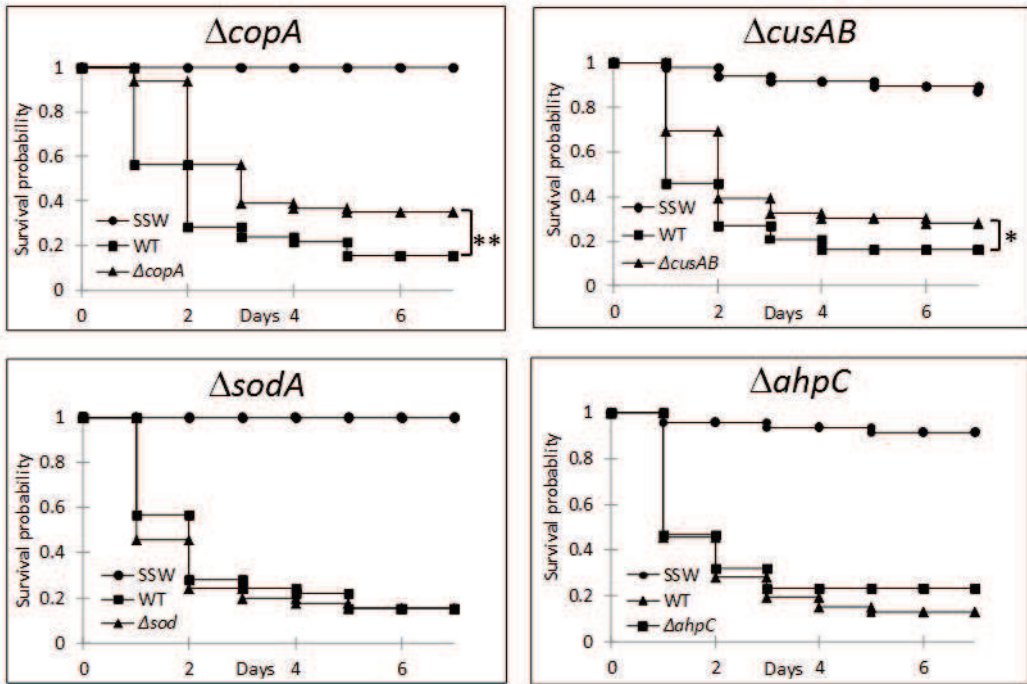
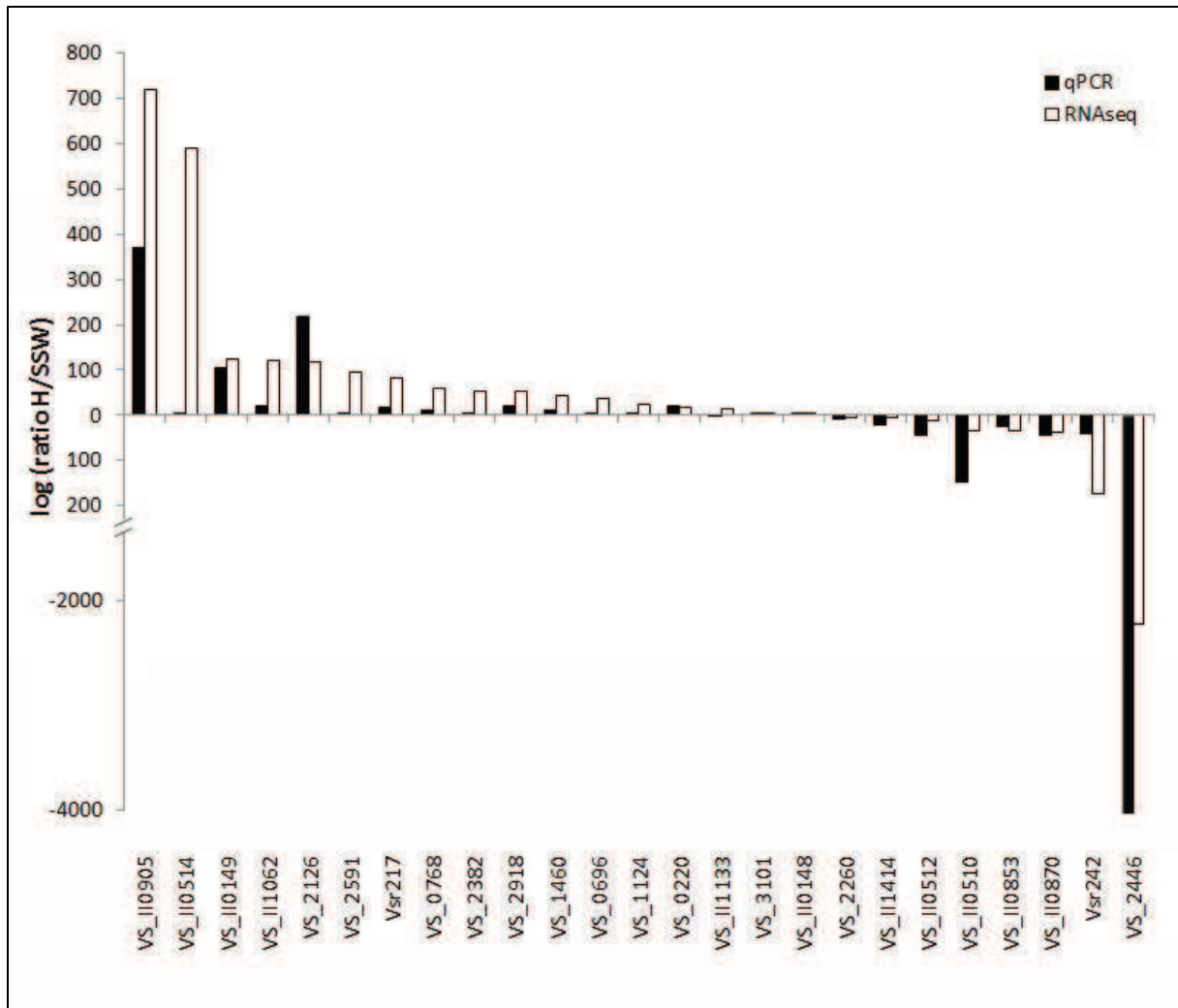


Figure 5: LGP32 copper-efflux deletion mutants are attenuated in oyster experimental infections.

**Figure S1: Validation of RNAseq results by qPCR.**

For each gene, the ratio Hemocyte/SSW were represented in black for qPCR and in white for RNAseq. H : hemocyte. SSW : sterile sea water.



**Figure S2. Amino acids alignment of MnSOD and FeSOD from *Vibrio*.**

MnSOD from *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (VS\_2918), *Vibrio parahaemolyticus* (VP2860), *Vibrio vulnificus* (VV1\_1252) were aligned with FeSOD from *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (VS\_0961), *Vibrio parahaemolyticus* (VP2118), *Vibrio vulnificus* (VV1\_3107). Sequences were aligned with ClustalW. Identical amino acids are indicated by an asterisk. Conservative replacements are indicated by a colon. The N-terminal sequence of *V. shiloi* FeSOD in bold. The manganese/iron superoxide dismutase signature motif (DVWEHAYY) is shown in grey boxes. The amino acids required for binding metal are indicated in highlighted in black. The active-sites for enzymatic activity are indicated in highlighted in grey.

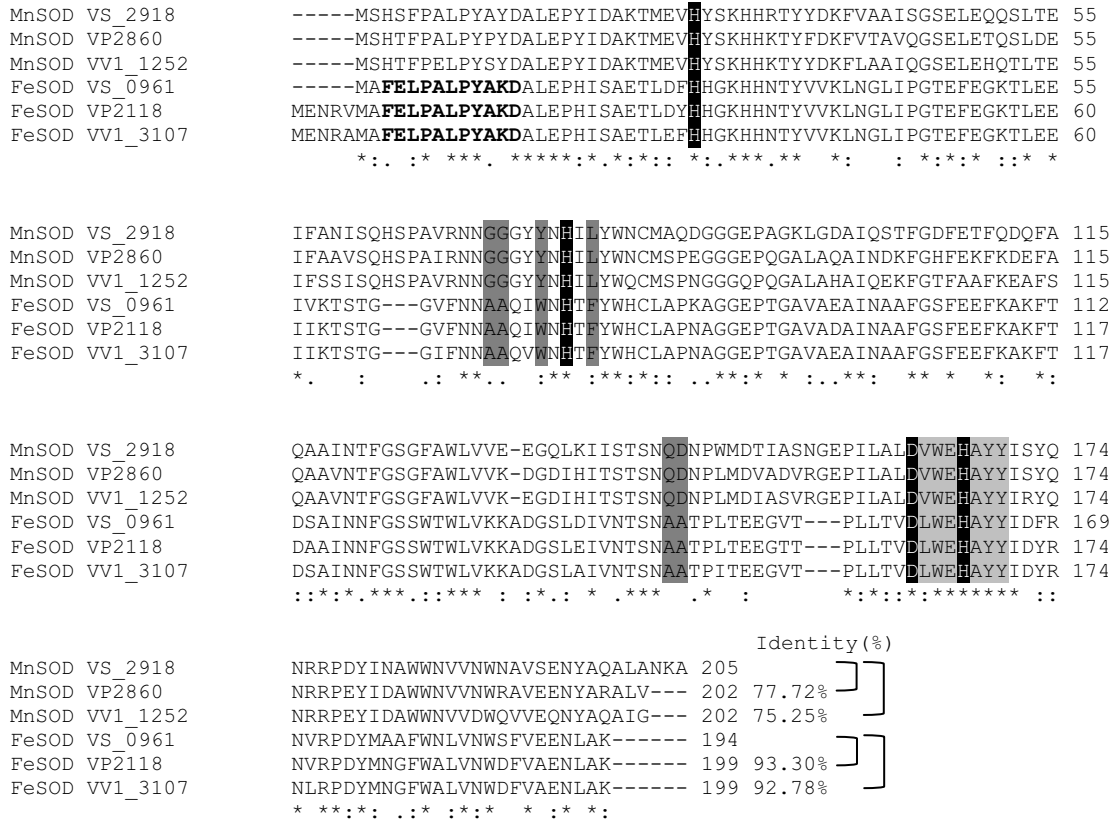






Table S1. Differential expression of LGP32 transcripts from RNAseq reads data.

Label	Name	Product	Pathways/functions	log2 fold change	Adjusted p-value (FDR)
<b>Protein synthesis</b>					
VS_0005	-	ribosomal protein S12	Protein synthesis	5.6	2.47E-24
VS_0006	-	Ribosomal protein S5	Protein synthesis	5.51	6.98E-26
VS_0032	-	ribosomal protein L18	Protein synthesis	5.36	4.22E-25
VS_0033	-	ribosomal protein S7	Protein synthesis	5.36	2.66E-25
VS_0127	-	50S ribosomal protein L29	Protein synthesis	5.35	2.12E-23
VS_0177	-	Ribosomal protein L30	Protein synthesis	5.28	4.19E-24
VS_0183	-	Ribosomal protein S3	Protein synthesis	5.23	2.30E-24
VS_0184	-	RNA methyltransferase	Protein synthesis	5.16	4.16E-04
VS_0280	-	Ribosomal protein L4	Protein synthesis	5.11	2.44E-24
VS_0281	-	Elongation factor Ts	Protein synthesis	5.06	1.04E-21
VS_0282	-	ribosomal protein L6	Protein synthesis	5.04	4.17E-23
VS_0361	-	Ribosomal protein L10	Protein synthesis	5.04	1.24E-21
VS_0362	-	ribosomal protein S17	Protein synthesis	5.02	2.04E-22
VS_0370	-	50S ribosomal protein L16	Protein synthesis	5.02	1.19E-23
VS_0429	-	Ribosomal protein S18	Protein synthesis	5.01	1.06E-18
VS_0430	-	Ribosomal protein L23	Protein synthesis	5	4.79E-24
VS_0440	-	ribosomal protein L34	Protein synthesis	4.95	8.24E-11
VS_0517	rpmI	50S ribosomal protein L35	Protein synthesis	4.95	7.80E-16
VS_0533	-	ribosomal protein L25	Protein synthesis	4.95	3.65E-20
VS_0536	-	Ribosomal protein L2	Protein synthesis	4.91	9.41E-24
VS_0560	-	ribosomal protein L1	Protein synthesis	4.91	1.10E-21
VS_0598	-	Ribosomal protein L22	Protein synthesis	4.9	2.35E-23
VS_0616	-	tRNA (guanine-N1)-methyltransferase	Protein synthesis	4.89	3.25E-22
VS_0642	-	50S ribosomal protein L3	Protein synthesis	4.88	2.82E-23
VS_0691	rplT	50S ribosomal subunit protein L20	Protein synthesis	4.87	4.87E-20
VS_0718	-	ribosomal protein L17	Protein synthesis	4.81	2.56E-21
VS_0724	-	ribosomal protein S8	Protein synthesis	4.76	6.58E-20
VS_0751	-	30S ribosomal protein S10	Protein synthesis	4.75	3.33E-21
VS_0752	-	Ribosomal protein L15	Protein synthesis	4.7	9.73E-21
VS_0753	-	Ribosomal protein S19	Protein synthesis	4.67	2.92E-21
VS_0769	-	ribosomal protein S6	Protein synthesis	4.65	7.02E-18
VS_0869	-	ribosomal protein L5	Protein synthesis	4.63	5.06E-19
VS_0928	-	ribosomal protein S14	Protein synthesis	4.57	6.83E-19
VS_0967	-	ribosomal protein L11	Protein synthesis	4.56	6.92E-19
VS_1009	-	Ribosomal protein S16	Protein synthesis	4.53	1.40E-18
VS_1016	-	Glycyl-tRNA synthetase beta chain	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	4.42	6.64E-13
VS_1020	-	ribosomal protein S4	Protein synthesis	4.4	1.57E-19
VS_1077	-	16S rRNA processing protein RimM	Protein synthesis	4.37	3.52E-18
VS_1104	-	Similar to ribosomal protein S15	Protein synthesis	4.36	8.35E-15
VS_1172	-	tRNA-dihydrouridine synthase B	Protein synthesis	4.27	7.31E-10
VS_1228	-	ribosomal protein S2	Protein synthesis	4.26	4.06E-17
VS_1229	-	ribosomal protein L9	Protein synthesis	4.22	6.08E-17
VS_1230	-	Hypothetical tRNA/rRNA methyltransferase	Protein synthesis	4.2	9.90E-09
VS_1231	-	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase	Protein synthesis	4.19	1.97E-05
VS_1411	-	Ribosomal protein S11	Protein synthesis	4.16	6.47E-17
VS_1424	-	ribosomal protein L13	Protein synthesis	4.12	4.99E-16
VS_1428	-	50S ribosomal protein L21	Protein synthesis	4.11	3.20E-15
VS_1765	-	50S ribosomal protein L14	Protein synthesis	4.11	1.32E-16
VS_1766	-	elongation factor Tu	Protein synthesis	4.11	5.51E-12
VS_1809	-	ribosomal protein S9	Protein synthesis	4.09	4.67E-16
VS_1861	-	30S ribosomal protein S20	Protein synthesis	4	3.67E-08
VS_1961	-	50S ribosomal protein L24	Protein synthesis	4	6.39E-15
VS_1963	rpmJ	50S ribosomal subunit protein L36	Protein synthesis	3.99	9.28E-09
VS_2014	-	50S ribosomal protein L32	Protein synthesis	3.89	5.24E-07
VS_2043	-	ribosomal protein L19	Protein synthesis	3.84	9.68E-12
VS_2219	-	peptide chain release factor 3	Protein synthesis	3.83	2.93E-06
VS_2230	-	ribosomal protein L11 methyltransferase	Protein synthesis	3.82	5.70E-03
VS_2259	infC	Translation initiation factor IF-3	Protein synthesis	3.78	6.51E-13
VS_2350	-	ribosomal protein S13	Protein synthesis	3.78	3.73E-14
VS_2352	-	ribosomal protein L31	Protein synthesis	3.71	9.71E-09
VS_2353	-	Isoleucyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.55	2.34E-11
VS_2368	pheT	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain	Protein synthesis	3.55	9.04E-11
VS_2454	-	Release factor glutamine methyltransferase	Protein synthesis	3.48	9.73E-04
VS_2467	-	Ribonuclease P protein component	Protein synthesis	3.43	1.05E-04
VS_2476	-	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	3.43	1.23E-06
VS_2479	-	Ribosomal protein L28	Protein synthesis	3.4	4.72E-08
VS_2482	-	Threonyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.33	4.72E-10
VS_2484	-	Ribosomal protein L33	Protein synthesis	3.2	2.42E-07
VS_2491	-	50S ribosomal protein L27	Protein synthesis	3.13	6.74E-07
VS_2497	pheS	Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain	Protein synthesis	3.09	7.01E-06
VS_2555	-	Cysteinyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	3.08	2.11E-06
VS_2556	-	elongation factor EF-G	Protein synthesis	3.08	1.39E-09
VS_2557	-	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase N	Protein synthesis	3.05	2.35E-03
VS_2558	-	Ribosome recycling factor	Protein synthesis	3.02	3.24E-04
VS_2603	infB	translation initiation factor 2 (IF-2 GTPase)	Protein synthesis	3	1.77E-09
VS_2806	-	Asparaginyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.97	3.46E-07
VS_2808	-	methionyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.96	3.47E-05
VS_2809	-	Glutamyl-tRNA reductase	Protein synthesis	2.95	1.15E-04
VS_2810	-	tryptophanyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.9	6.51E-06
VS_2810.1	-	Putative tRNA-i(6)A37 methylthiotransferase	tRNA modification	2.86	2.83E-05
VS_2812	-	Aspartyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.77	1.68E-06
VS_2813	rsmF	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase F	Protein synthesis	2.76	2.18E-02

VS_2814	rnt	Ribonuclease T (RNase T)	RNA metabolism	2.71	1.39E-02
VS_2815	-	Seryl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.68	2.47E-05
VS_2816	-	tyrosyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.64	2.22E-04
VS_2817	-	Ribonuclease E	Protein synthesis	2.63	3.47E-07
VS_2818	rimP	Ribosome maturation factor RimP	Protein synthesis	2.51	4.20E-04
VS_2819	-	Glutamyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.5	4.43E-06
VS_2820	-	23S rRNA m(2)G2445 methyltransferase	Protein synthesis	2.48	1.06E-03
VS_2821	-	Leucyl-tRNA synthetase	Protein biosynthesis	2.43	5.93E-06
VS_2822	-	tRNA pseudouridine synthase D	Protein synthesis	2.39	2.57E-03
VS_2823	-	Glutamyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.37	4.68E-03
VS_2824	-	Ribonuclease PH	Protein synthesis	2.36	2.77E-02
VS_2825	rsml	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	Protein synthesis	2.36	2.28E-02
VS_2826	-	Putative ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	Protein synthesis	2.35	8.50E-03
VS_2828	rnd	Ribonuclease D	Protein synthesis	2.28	2.70E-02
VS_2829	-	Arginyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.24	6.47E-04
VS_2830	-	SsrA-binding protein	Protein synthesis	2.22	4.38E-02
VS_2831	-	putative ribosomal protein L7/L12	Protein synthesis	2.21	1.43E-05
VS_2832	-	Lysyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.17	1.04E-03
VS_2833	-	Peptide chain release factor 1	Protein synthesis	2.16	1.77E-02
VS_2836	-	prolyl-tRNA synthetase	protein synthesis	2.08	1.04E-03
VS_2837	queA	S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase QueA	Protein synthesis	2.07	4.78E-02
VS_2866	-	Dimethyladenosine transferase; Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A	Protein synthesis	2.05	9.80E-04
VS_2897	-	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	Protein synthesis	2.03	8.31E-03
VS_2919	-	Putative ATP-dependent RNA helicase	Protein synthesis	-2.02	3.85E-02
VS_2946	-	tRNA (uracil-5-)-methyltransferase	Protein synthesis	-2.06	9.21E-03
VS_2947	-	23S rRNA methylase	rRNA modification	-2.25	6.32E-03
VS_2964	rnpB	RNase P, RNA component precursor RnpB	Protein synthesis	-2.27	5.60E-04
VS_2965	-	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase	Protein synthesis	-2.35	4.15E-03
VS_2967	-	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase	Protein synthesis	-2.36	3.62E-02
VS_2968	-	hypothetical translation factor	Protein synthesis	-2.39	5.35E-03
VS_2972	-	tmRNA	Protein synthesis	-2.52	5.90E-06
VS_3000	-	Leucyl/phenylalanyl-tRNA--protein transferase	Protein synthesis	-3.34	2.03E-04
VS_II1207	rmf	ribosome modulation factor	Protein synthesis	-3.59	2.73E-06
VS_m0441	-	Similar to transcriptional regulator, MarR family	Protein synthesis	-3.93	1.68E-04
VS_m0641	-	Ribosomal protein S6 modification protein	Protein synthesis	-4.83	1.68E-07

### Carbon compound utilization and transport

VS_2591	malC	Maltodextrin transport system permease protein MalC	Glycogen, starch and sucrose metabolism	6.58	2.92E-13
VS_1313	tctC	Putative tricarboxylate transport TctC	Carbon compound transport	6.12	1.58E-30
VS_2585	-	cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.92	2.93E-20
VS_II0162	-	Maltose-binding periplasmic protein	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.6	1.39E-05
VS_2593	-	Neopullulanase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.58	1.73E-12
VS_1311	tctA	Putative tricarboxylate transport membrane protein TctA	Carbon compound transport	5.55	1.70E-18
VS_II0158	-	Putative maltoporin	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.38	3.33E-25
VS_1312	tctB	Putative tricarboxylate transport TctB	Carbon compound transport	5.3	4.34E-20
VS_II1298	-	cyclomaltodextrinase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	5.23	6.27E-14
VS_II0184	-	Maltodextrin phosphorylase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.76	8.60E-20
VS_2590	malE	Maltose/maltodextrin-binding protein	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.68	5.01E-11
VS_II0159	-	Maltose operon periplasmic protein precursor	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.41	4.79E-13
VS_II0145	dctQ	2,3-diketo-L-gulonate TRAPdicarboxylate transporter, DctQ subunit	Ascorbate and aldarate metabolism	4.35	1.52E-02
VS_II0222	malG	Maltooligosaccharide ABC transporter, permease subunit MalG	Glycogen, starch and sucrose metabolism	4.21	5.22E-13
VS_II0185	-	4-alpha-glucanotransferase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.93	3.38E-14
VS_II0220	malE	ABC transporter: Substrate-binding protein precursor MalE; Maltooligosaccharides uptake	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.93	1.24E-14
VS_II0143	dctP	2,3-diketo-L-gulonate TRAP transporter , DctP subunit	Ascorbate and aldarate metabolism	3.89	5.62E-04
VS_II0186	-	1,4-alpha-glucan branching enzyme	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.69	1.30E-10
VS_II0219	malK	ABC transporter: ATP-binding protein subunit MalK; Maltooligosaccharides uptake	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.59	2.22E-10
VS_II0774	-	Putative secreted triacylglycerol lipase	Fatty acid metabolism	2.99	4.58E-08
VS_II0167	-	Putative Alpha-amylase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.95	2.69E-02
VS_II0168	pulA	Secreted pullulanase PulA	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.81	1.63E-02
VS_II1287	-	Putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Carbon compound utilization	2.81	1.02E-04
VS_II0221	malF	Maltooligosaccharide transporter subunit MalF	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.79	5.99E-07
VS_II0161	-	Glycogen debranching enzyme	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.67	6.94E-03
VS_2292	-	Glucose-specific phosphotransferase enzyme IIA	Carbon compound utilization	2.53	6.03E-05
VS_II1501	-	Putative 2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.53	3.15E-02

VS_1083	-	Glycogen synthase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.46	4.98E-05
VS_2910	-	Putative 5-carboxymethyl-2-hydroxyruconate isomerase	Carbon compound utilization	2.46	5.57E-03
VS_II0266	glcB	Malate synthase G	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.38	1.19E-03
VS_2291	-	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase Enzyme I	Carbon compound utilization	2.1	8.06E-04
VS_II0183	-	HTH-type transcriptional regulator malT (ATP-dependent transcriptional activator malT)	Glycogen, starch and sucrose metabolism	2.03	1.10E-02
VS_0597	-	Putative acetoin utilization protein	Carbon compound utilization	-2.11	7.13E-03
VS_II0364	-	Putative phosphomannomutase	GDP-mannose biosynthesis	-2.22	4.52E-03
VS_0394	glmS	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	Carbon compound utilization	-2.41	1.42E-03
VS_0958	adhE	Alcohol dehydrogenase/acetalddehyde dehydrogenase	Carbon compound utilization	-2.51	8.10E-03
VS_2377	-	Trehalose-6-phosphate hydrolase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.53	4.62E-03
VS_1178	-	Putative sucrose phosphate synthase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.58	1.79E-03
VS_II0546	-	Chitinase	Carbon compound utilization	-2.58	3.48E-03
VS_2260	-	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICBA component	PTS transport	-2.64	3.30E-04
VS_II0048	dpaL	Diaminopropionate ammonia-lyase	Carbon compound utilization	-2.67	1.41E-02
VS_2186	-	putative PTS permease for N-acetylglucosamine and glucose	Carbon compound utilization	-2.69	1.86E-02
VS_II1414	-	Chitinase	Carbon compound utilization	-2.69	8.18E-03
VS_II1279	-	ADP-glucose pyrophosphorylase	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-2.9	4.16E-02
VS_II0496	asd	Putative aldose sugar dehydrogenase	Carbon compound utilization	-3.1	1.96E-03
VS_II0605	hrsA	Fused 2-O-a-mannosyl-D-glycerate specific PTS enzymes: IIA component/IIB component/IIC component	Carbon compound utilization	-3.15	3.06E-03
VS_II0314	-	PTS system, IIB component	Carbon compound utilization	-3.25	2.25E-04
VS_II0147	garK	Glycerate kinase	Ascorbate and aldarate metabolism	-3.36	1.10E-03
VS_2378	-	PTS system trehalose-specific EIIBC component	Glycogen, starch and sucrose metabolism	-4.17	1.88E-05

## Amino acid metabolism and transport

VS_1282	metE	Putative methylcobalamin:homocysteine methyltransferase	Methionine	6.73	9.71E-26
VS_1145	-	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate-homocysteine methyltransferase	Cysteine and methionine metabolism	6.55	4.73E-23
VS_0992	oppC	Oligopeptide transport system permease protein oppC	Transport: peptides	6.28	2.11E-11
VS_1967	trpD	Anthranilate synthase beta subunit	Tryptophan synthesis	5.81	7.87E-06
VS_2382	metN	D-methionine transport ATP-binding protein metN	Transport: AA	5.7	4.68E-09
VS_0077	dppC	Dipeptide transport system permease protein dppC	Transport: peptides	5.55	3.12E-12
VS_2860	-	Arginine N-succinyltransferase, beta chain	Arginine and proline metabolism	5.5	3.68E-16
VS_2640	-	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	AA metabolism	5.47	4.11E-17
VS_0075	-	Periplasmic dipeptide transport protein precursor	Transport: peptides	5.26	2.80E-23
VS_0991	-	Oligopeptide transport system permease protein oppB	Transport: peptides	5.11	6.53E-12
VS_0378	-	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	5	9.37E-20
VS_0076	-	Dipeptide transport system permease protein dppB	Transport: peptides	5	1.79E-15
VS_1968	trpG	anthranilate phosphoribosyltransferase	Tryptophan synthesis	4.97	2.53E-08
VS_0993	oppD	Oligopeptide transport ATP-binding protein oppD	Transport: peptides	4.95	3.97E-15
VS_0379	-	3-isopropylmalate dehydrogenase	AA metabolism	4.9	2.23E-16
VS_1966	trpE	Anthranilate synthase alpha subunit	Tryptophan synthesis	4.85	7.92E-08
VS_2859	-	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase	Arginine and proline metabolism	4.7	3.33E-15
VS_0009	-	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein patH precursor	Transport: AA	4.55	1.06E-13
VS_0243	-	Lysine 2,3-aminomutase	AA metabolism	4.44	7.38E-03
VS_0461	-	Carbamoyl-phosphate synthase, small subunit	Arginine and proline metabolism; Nitrogen metabolism; Pyrimidine metabolism	4.44	6.26E-12
VS_0377	-	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	4.42	1.56E-13
VS_0061	ilvC	Ketol-acid reductoisomerase	Isoleucine, valine	4.39	5.40E-16
VS_2872	aroK	Shikimate kinase	chorismate	4.36	4.91E-09
VS_2384	metQ	D-methionine-binding lipoprotein metQ precursor	Transport: AA	4.34	4.91E-13
VS_1144	metR	HTH-type transcriptional regulator metR	AA metabolism	4.29	2.27E-09
VS_0990	-	Periplasmic oligopeptide-binding protein	Transport: peptides	4.21	5.36E-16
VS_2264	-	Asparagine synthetase B, glutamine-hydrolyzing	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ;Arginine and proline metabolism	4.19	4.86E-11
VS_0994	oppF	Oligopeptide transport ATP-binding protein oppF	Transport: peptides	4.17	7.93E-14
VS_0548	tyrA	Chorismate mutase/prephenate dehydrogenase	Tyrosine synthesis	4.11	2.00E-04
VS_0462	-	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	Arginine and proline metabolism; Nitrogen metabolism	4.1	5.19E-16
VS_m1293	-	Glycine ribowitch	AA metabolism	4.06	1.16E-05
VS_0955	-	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	AA metabolism	4	1.18E-08
VS_2289	-	Cysteine synthase A	Cysteine and methionine metabolism	3.97	4.86E-15
VS_2415	-	Gamma-glutamyl phosphate reductase	Arginine and proline metabolism	3.96	1.40E-07
VS_2383	metI	Probable D-methionine transport system permease protein metI	Transport: AA	3.91	2.47E-05
VS_2861	argD	Bifunctional acetylornithine aminotransferase and succinyldiaminopimelate aminotransferase	AA metabolism	3.89	1.90E-13
VS_0315	-	Methionine synthase	Cysteine and methionine metabolism;One carbon pool by folate	3.87	4.61E-13

VS_0008	patM	Probable amino-acid ABC transporter permease protein patM	Transport: AA	3.78	1.79E-04
VS_1216	hutH	Histidine ammonia-lyase	Histidine degradation	3.72	6.89E-09
VS_3147	-	Threonine dehydratase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.61	4.76E-10
VS_2893	-	Bifunctional aspartokinase/homoserine dehydrogenase II	AA metabolism	3.55	2.89E-12
VS_II0818	-	serine hydroxymethyltransferase	AA metabolism	3.55	1.77E-10
VS_0484	-	Homoserine kinase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.5	2.46E-08
VS_II0387	aroG	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase, Phe-sensitive	Aromatic amino acid metabolism	3.45	4.09E-07
VS_0380	-	2-isopropylmalate synthase	AA metabolism	3.42	2.63E-10
VS_1217	-	Urocanate hydratase	Histidine degradation	3.39	4.00E-07
VS_0485	-	Threonine synthase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.36	1.04E-08
VS_m1292	-	Glycine ribowitch	AA metabolism	3.35	1.88E-03
VS_2048	-	Alanine dehydrogenase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3.28	1.18E-10
VS_2894	-	cystathionine gamma-synthase	Cysteine and methionine metabolism;Sulfur metabolism	3.26	2.62E-09
VS_0121	-	Glutamine synthetase	AA metabolism	3.25	2.32E-11
VS_1969	trpCF	Tryptophan biosynthesis protein trpCF	Tryptophan synthesis	3.23	1.47E-05
VS_2416	-	Glutamate 5-kinase (Gamma-glutamyl kinase)	Arginine and proline metabolism	3.22	1.93E-04
VS_II0820	-	Glycine dehydrogenase (Glycine cleavage system P-protein)	Glycine, serine and threonine metabolism	3.17	2.38E-09
VS_1970	trpB	Tryptophan synthase beta chain	Tryptophan synthesis	3.16	4.15E-04
VS_3146	-	Dihydroxy-acid dehydratase	Pantothenate and CoA biosynthesis; Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3.11	9.91E-08
VS_0285	-	Alanine racemase	AA metabolism	3.1	3.67E-04
VS_2301	purE	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	Lysine synthesis via DAP	3.08	4.34E-04
VS_2024	hisC	Histidinol-phosphate aminotransferase	Histidine biosynthesis	3.07	1.49E-03
VS_2373	-	Serine hydroxymethyltransferase 1	Glycine/Folate metabolism	3.07	1.24E-06
VS_0318	-	Serine--pyruvate aminotransferase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.05	1.30E-04
VS_0483	-	Homoserine dehydrogenase	Glycine, serine and threonine metabolism	3.03	5.04E-07
VS_1057	-	Histidine transport system permease protein hisM	Transport: AA	2.93	2.08E-03
VS_2583	-	Alanyl-tRNA synthetase	Protein synthesis	2.92	1.14E-06
VS_0474	-	Glutamate synthase [NADPH] large chain	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ; Arginine and proline metabolism; D-Glutamine and D-glutamate metabolism	2.9	1.54E-08
VS_m0317	-	Lysine riboswitch	Glycine, serine and threonine metabolism;Cysteine and methionine metabolism	2.83	1.60E-04
VS_2023	hisB	Histidine biosynthesis bifunctional protein hisB	Histidine biosynthesis	2.75	7.61E-04
VS_0473	-	Glutamate synthase [NADPH] small chain	AA metabolism	2.55	3.79E-05
VS_II0638	-	Threonine aldolase	Glycine, serine and threonine metabolism	2.54	2.72E-02
VS_1804	-	L-serine dehydratase 1	Glycine, serine and threonine metabolism	2.52	2.47E-02
VS_1055	-	Lysine-arginine-ornithine-binding periplasmic protein precursor	Transport: AA	2.51	2.57E-06
VS_3143	-	Acetolactate synthase isozyme II large subunit	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.5	9.36E-06
VS_0892	-	Chorismate synthase (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatephosphorylase)	AA metabolism; Cofactor, small molecule carrier biosynthesis	2.5	3.02E-04
VS_2333	-	Nitrogen regulatory protein P-II	Regulates glutamin synthetase	2.47	1.82E-02
VS_2926	argF	Ornithine carbamoyltransferase	Arginine metabolism	2.47	2.09E-03
VS_1056	hisQ	Histidine transport system permease protein hisQ	Transport: AA	2.46	7.55E-04
VS_2022	hisH	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	Histidine biosynthesis	2.45	1.93E-02
VS_0316	-	Lysine-sensitive aspartokinase III	Glycine, serine and threonine metabolism;Cysteine and methionine metabolism	2.43	4.24E-04
VS_1819	-	Aspartate aminotransferase	Cysteine and methionine metabolism	2.4	2.87E-03
VS_II0816	-	glycine cleavage system T protein	Glycine degradation	2.39	7.08E-05
VS_1677	metA	Homoserine O-succinyltransferase	Methionine biosynthesis	2.37	2.99E-03
VS_1793	tyrR	Transcriptional regulatory protein tyrR	AA metabolism	2.3	1.14E-02
VS_3145	-	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.27	1.99E-03
VS_2871	aroB	3-dehydroquinate synthase	Aromatic AA biosynthesis	2.24	7.26E-04
VS_2021	hisA	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	Histidine biosynthesis	2.22	5.13E-03
VS_0015	-	Valine-pyruvate aminotransferase	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2.19	7.39E-03
VS_2738	-	Arginine deiminase	Arginine and proline metabolism	2.18	4.96E-05
VS_1262	-	Tryptophanase (L-tryptophan indole-lyase)	Tryptophan metabolism	2.16	8.26E-04
VS_II0819	-	glycine cleavage system H protein	AA metabolism	2.14	5.14E-04
VS_1971	trpA	Tryptophan synthase alpha chain	Tryptophan synthesis	2.13	4.69E-02
VS_2569	-	Oxaloacetate decarboxylase alpha chain	Propanoate metabolism	2.12	2.25E-04
VS_2025	hisD	Histidinol dehydrogenase	Histidine biosynthesis	2.11	3.82E-03
VS_2570	-	oxaloacetate decarboxylase gamma chain	Pyruvate metabolism	2.04	6.27E-03
VS_II0066	-	L-2,4-diaminobutyric acid acetyltransferase	Glycine, serine and threonine metabolism	-2.01	4.37E-02

VS_II0442	-	Threonine aldolase	Glycine, serine and threonine metabolism	-2.05	8.71E-03
VS_1403	-	Amino acid ABC transporter	Transport: AA	-2.17	3.19E-03
VS_II1030	-	Serine-threonine protein kinase	AA metabolism	-2.31	2.62E-02
VS_II1525	-	Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding portion	Transport: AA	-2.46	5.44E-03
VS_2169	-	Cysteine synthase	Amino acid metabolism	-2.84	9.35E-03
VS_0416	-	Glutamine synthetase adenyltransferase	AA metabolism	-2.94	3.91E-04
VS_0558	-	amino-acid abc transporter binding protein	Transport: AA	-3.04	5.80E-04
VS_II1518	-	Maleylacetoacetate isomerase	Tyrosine degradation	-3.6	3.65E-03
VS_II1334	-	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	Tryptophan metabolism; Propanoate metabolism	-3.73	1.83E-02
VS_II1520	-	Putative homogentisate 1,2-dioxygenase	Tyrosine degradation	-3.86	4.56E-03
VS_II1521	hpd	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Tyrosine degradation	-3.93	5.44E-03
VS_2138	-	Glutamate synthetase	Alanine, aspartate and glutamate metabolism ;Nitrogen metabolism	-5.21	4.25E-07
VS_1047	prkA	Putative PrkA family serine protein kinase	AA metabolism	-5.94	1.83E-08
VS_II1508	phhB	4a-hydroxytetrahydrobiopterin dehydratase	tetrahydrobiopterin synthesis	-6.36	5.12E-07
VS_1944	-	Glycine cleavage system regulatory protein	AA metabolism	-6.46	2.69E-09
VS_1744	-	Bkd operon transcriptional regulator	Branched chain AA biosynthesis	-6.57	2.18E-06
VS_II1509	phhA	Phenylalanine 4-monooxygenase	Phenylalanine degradation	-7.2	1.01E-08
VS_1743	-	Putative pyridoxal-phosphate-dependent cystathionine synthase	Methionine biosynthesis	-8.52	5.46E-14

## Transport (others)

VS_II0391	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	5.37	1.19E-04
VS_II0392	-	ABC transporter: transmembrane protein	Transport: other	5.22	1.12E-04
VS_II0440	-	ABC transporter	Transport: other	4.7	2.28E-06
VS_II0441	-	Putative sulfate transporter	Transport: other	4.61	3.83E-06
VS_0242	-	Hypothetical ABC transporter ATP-binding protein	Transport: other	4.49	1.38E-16
VS_II0723	-	ABC-type transport system	Transport: other	4.49	4.72E-10
VS_0074	-	Na <sup>+</sup> -dependent transporter	Transport: other	4.37	5.76E-16
VS_0089	-	Putative Sodium/glutamate symporter	Transport: other	4.1	1.90E-08
VS_0369	-	Putative Sodium/sulfate symporter	Transport: other	4.09	1.64E-09
VS_0530	-	sodium-dependent transporter	Transport: other	3.89	3.45E-10
VS_0588	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	3.68	5.40E-11
VS_0633	-	Sodium/alanine symporter	Transport: other	3.52	8.09E-08
VS_0650	-	ABC transporter: two domain ATP-binding protein	Polyamine-transporting ATPase	3.27	1.22E-03
VS_0665	-	Inner membrane sodium/carboxylate symporter	Transport: other	3.09	1.13E-04
VS_0875	-	Putative nucleoside permease NupX:	Transport: other	2.98	1.56E-07
VS_0887	-	Putative Na <sup>+</sup> /Pi transporter	Phosphate transporter	2.82	1.10E-03
VS_0888	-	ABC transporter: transmembrane protein	Transport: other	2.76	2.62E-02
VS_0919	-	Permease family protein	Transport: other	2.75	4.80E-03
VS_1015	-	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	2.55	7.27E-05
VS_1034	-	Permease of the major facilitator superfamily	Transport: other	2.45	1.02E-03
VS_1179	-	ABC-type proline/glycine betaine transport system, ATPase component	Transport: other	2.31	2.35E-04
VS_1496	-	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -dicarboxylate symporter	Transport: other	2.12	3.95E-02
VS_1499	madN	Putative acetate efflux pump, MadN	Transport: other	-2.03	2.23E-02
VS_1523	-	peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	Transport: other	-2.04	3.03E-02
VS_1524	-	ABC transporter: two domain ATP-binding protein	Transport: other	-2.18	9.92E-03
VS_1525	kefC	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein kefC (K <sup>+</sup> )/H <sup>+</sup> (+)antiporter)	Transport: other	-2.19	7.01E-03
VS_1847	-	Putative Mg(2+) transport ATPase inner membrane protein	Transport: other	-2.29	5.22E-03
VS_1980	-	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	-2.37	2.51E-02
VS_1986	apaG	Putative ApaG protein associated with Co <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> efflux	Transport: other	-2.41	4.95E-03
VS_1987	-	Transporter	Transport: other	-2.45	2.69E-02
VS_1988	-	Putative multidrug efflux pump	Transport: other	-2.49	1.36E-02
VS_2277	phoU	Phosphate transport system regulatory protein PhoU	Transport: other	-2.5	8.54E-04
VS_2365	-	Putative glutathione-regulated potassium-efflux system ancillary protein KefG; quinone reductase	Transport: K <sup>+</sup>	-2.55	2.23E-03
VS_2421	-	Small-conductance mechanosensitive channel	Transport: other	-2.6	1.40E-02
VS_2464	-	Na <sup>+</sup> (+) driven multidrug efflux pump	Transport: other	-2.63	1.88E-02
VS_2506	-	Nucleoside permease	Transport: other	-2.67	3.03E-02
VS_2586	-	Molybdate-binding periplasmic protein	Molybdate transport	-2.72	3.97E-03
VS_2658	-	Membrane-fusion protein	Transport: other	-2.74	4.02E-03
VS_2787	-	ABC transporter: ATP binding protein	Transport: other	-2.78	1.35E-03
VS_II0175	mtrF	efflux pump component MtrF	Transport: other	-2.83	8.11E-04
VS_II0188	-	ABC transporter, permease protein	Transport: other	-2.89	6.73E-03
VS_II0247	-	Putative ABC transporter component: ATP binding protein; putative polyamine transport system	Transport: other	-2.97	7.65E-03
VS_II0390	-	Cation/multidrug efflux pump	Transport: other	-3.01	7.21E-04
VS_II0509	ktrB	KtrB	Transport: K <sup>+</sup>	-3.08	1.02E-03
VS_II0510	-	Permeases of the major facilitator superfamily	Transport: other	-3.08	1.54E-03
VS_II0511	-	ABC transporter: transmembrane protein (IM)	Transport: other	-3.11	4.20E-04
VS_II0578	-	ABC transporter, transmembrane protein- ATP-binding protein (IM, ABC)	Transport: other	-3.15	9.14E-04
VS_II0676	-	ABC transporter: ATP-binding protein	Transport: other	-3.16	8.17E-03
VS_II0858	-	ABC transporter: substrate binding protein precursor	Transport: other	-3.21	1.64E-04
VS_II0860	hlyD	Putative secretion protein HlyD	Transport: other	-3.31	5.92E-04
VS_II0861	-	ABC transporter (IM-ABC)	Transport: other	-3.33	4.90E-04
VS_II0862	ktrA	KtrA	Transport: K <sup>+</sup>	-3.49	1.41E-04
VS_II0932	-	Transmembrane water channel Aquaporin Z	Transport: other	-3.58	1.30E-04
VS_II0935	-	ABC transporter: Outer membrane protein (OMP)	Transport: other	-3.89	4.49E-05
VS_II1050	-	Putative sodium/hydrogen exchanger family protein	Transport: other	-4.06	1.06E-04

VS_II1114	-	ABC transporter: substrate-binding protein precursor (BP)	Transport: other	-4.21	1.50E-05
VS_II1143	-	ABC transporter: Membrane fusion protein (MFP)	Transport: other	-4.57	1.59E-05
VS_II1268	-	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	Transport: other	-4.58	4.02E-06
VS_II1284	-	ABC transporter: Membrane fusion protein	Transport: other	-4.59	1.70E-05
VS_II1285	-	ABC transporter: Transmembrane and ATP-binding protein	Transport: other	-5.03	2.15E-06
VS_II1286	-	ABC transporter: Transmembrane and ATP-binding protein	Transport: other	-5.57	1.43E-06
VS_II1377	-	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter NhaD and related arsenite permeases	Transport: other	-5.68	2.26E-08
VS_II1428	-	Permease of the drug metabolite transporter (DMT) superfamily	Transport: other	-6.08	6.18E-07

## Energy production and respiration

VS_2589	cymA	cytoplasmic membrane-associated tetrahaem c-type cytochrome	Energy production/respiration	6.33	1.05E-25
VS_1461	ccoQ	cytochrome c oxidase, subunit CcoQ	Energy production/respiration	5.93	3.46E-16
VS_1462	ccoP	cytochrome c oxidase, subunit CcoP	Energy production/respiration	5.51	1.50E-24
VS_1460	ccoO	cytochrome c oxidase, subunit CcoO	Energy production/respiration	5.38	2.35E-23
VS_3155	-	ATP synthase delta chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	5.17	2.82E-23
VS_0696	nqrD	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit D	Energy production and respiration	5.16	1.34E-18
VS_3151	-	ATP synthase epsilon chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	5.12	9.47E-22
VS_3152	-	ATP synthase beta chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	5.06	4.66E-24
VS_3153	-	ATP synthase gamma chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	5.06	4.79E-24
VS_3156	-	ATP synthase B chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	5	1.22E-22
VS_0695	nqrC	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit C	Energy production and respiration	4.98	1.31E-17
VS_3154	-	ATP synthase alpha chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	4.97	2.98E-23
VS_0697	nqrE	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit E	Energy production and respiration	4.89	1.09E-19
VS_1459	-	Cytochrome c oxidase polypeptide I homolog	Energy production/respiration	4.77	3.48E-20
VS_0698	nqrF	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit F	Energy production and respiration	4.68	1.65E-18
VS_3158	-	ATP synthase a chain (ATPase protein 6)	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	4.57	2.25E-18
VS_0433	petC	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1	Energy production/respiration	4.38	1.93E-12
VS_0694	nqrB	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit B	Energy production and respiration	4.36	4.06E-17
VS_3157	-	ATP synthase C chain	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	4.24	6.37E-14
VS_0432	petB	Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome B	Energy production/respiration	4	3.21E-12
VS_1110	-	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	Energy production/respiration	3.52	1.69E-06
VS_1185	cydD	Transport ATP-binding protein CydD	Cysteine/Gsh transporter involved in cytochrome c assembly	3.38	5.80E-05
VS_0431	petA	Ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit	Energy production/respiration	3.32	1.74E-08
VS_0098	-	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE	Energy production/respiration	3.29	6.06E-05
VS_0112	-	Cytochrome c4	Energy production/respiration	3.28	3.31E-06
VS_3159	-	ATP synthase subunit I	Na <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase	3.27	5.43E-09
VS_0693	nqrA	Na <sup>(+)</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit A	Energy production and respiration	2.88	3.93E-08
VS_1212	-	Putative D-lactate dehydrogenase (cytochrome)	Energy production/respiration	2.7	4.55E-05
VS_0067	-	Cytochrome c5	Energy production/respiration	2.64	8.30E-04
VS_1109	-	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I	Energy production/respiration	2.62	6.87E-05
VS_2256	-	Flavodoxin	Energy production/respiration	2.29	4.26E-03
VS_1184	cydC	Transport ATP-binding protein CydC	Cysteine/Gsh transporter involved in cytochrome c assembly	2.12	3.09E-03
VS_3067	fre	Flavin reductase	Energy production/respiration	2.08	1.86E-02
VS_II0150	ldhA	D-lactate dehydrogenase	Pyruvate metabolism	2.02	8.65E-03
VS_1483	-	Formate dehydrogenase gamma subunit	Energy production/respiration	-2.08	5.30E-03
VS_0939	-	putative nitroreductase	Energy production/respiration	-2.28	3.43E-02
VS_1485	-	Formate dehydrogenase alpha chain	Energy production/respiration	-2.37	3.44E-03
VS_2275	-	Putative nitrogen regulatory protein P-II family protein	Nitrogen metabolism	-2.38	1.91E-02
VS_II1028	-	Putative nitrite reductase NADPH	Energy production/respiration	-2.46	8.50E-03
VS_II1153	fdxA	Ferredoxin	Electron transport	-2.49	1.12E-02
VS_1091	torR	TorCAD operon transcriptional regulatory protein torR	TMAO respiration	-2.5	3.03E-03
VS_1484	-	Formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Energy production/respiration	-2.52	1.43E-03
VS_1926	-	Cytochrome C biogenesis protein	Energy production/respiration	-2.55	4.52E-02
VS_II0599	napD	Periplasmic nitrate reductase chaperone NapD	Nitrate respiration	-2.65	1.36E-03
VS_II0455	-	Putative pyruvate formate-lyase activating enzyme (formate C-acetyltransferase)	Energy production/respiration	-2.67	7.98E-04
VS_1931	nrfB	Formate-dependent nitrite reductase	Anaerobic respiration	-2.76	1.11E-02
VS_2003	torA	Putative trimethylamine-N-oxide reductase	TMAO respiration	-3.23	3.36E-04
VS_II0894	-	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit I	Energy production/respiration	-3.28	5.88E-04
VS_1933	nrfA	Nitrite reductase periplasmic cytochrome c552 NrfA	Anaerobic respiration	-3.3	1.12E-06
VS_II0896	-	Putative cytochrome c, class I	Energy production/respiration	-3.36	3.09E-04
VS_1397	-	Putative acylphosphatase	Energy production/respiration	-3.53	1.43E-04
VS_2004	torC	Cytochrome c-type protein TorC	TMAO respiration	-3.56	1.28E-04
VS_1611	glpQ	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase precursor	Glycerol degradation	-3.74	5.91E-05
VS_II0895	-	Cbb3-type cytochrome oxidase, cytochrome c subunit	Energy production/respiration	-3.99	9.74E-05
VS_2005	torE	trimethylamine N-oxide reductase TorE	TMAO respiration	-4.28	4.81E-05
VS_1932	nrfC	cytochrome c-type subunit of nitrite reductase NrfB	Anaerobic respiration	-4.4	9.20E-07
VS_II0371	-	putative cytochrome c oxidase assembly protein	Energy production/respiration	-4.76	3.18E-06
VS_II0365	-	Cytochrome c oxidase, subunit II	Energy production/respiration	-5	2.35E-06
VS_II0366	-	Cytochrome c oxidase, subunit I	Energy production/respiration	-5.76	1.60E-07
VS_II0367	-	putative cytochrome c oxidase assembly	Energy production/respiration	-5.91	1.35E-07

VS_II0368	-	transmembrane protein				
VS_2672	-	cytochrome c oxidase, subunit III	Energy production/respiration	-6.06	1.41E-07	
VS_2672	-	putative cytochrome c oxidase, subunit I	Energy production/respiration	-6.51	4.99E-09	

## Stress response

VS_2126	ahpC	<b>Alkyl hydroperoxide reductase subunit C 22</b>	<b>Oxydative stress</b>	<b>6.9</b>	<b>2.24E-30</b>	
VS_2127	ahpF	<b>Alkyl hydroperoxide reductase subunit F</b>	<b>Oxydative stress</b>	<b>6.84</b>	<b>4.36E-19</b>	
VS_0175	cspA	<b>Cold shock protein CspA</b>	<b>Stress response</b>	<b>5.84</b>	<b>1.29E-21</b>	
VS_II0545	betT	<b>Putative glycine betaine transporter</b>	<b>Osmotic stress</b>	<b>5.71</b>	<b>2.11E-05</b>	
VS_2918	sodA	<b>Superoxide dismutase</b>	<b>Oxydative stress</b>	<b>5.69</b>	<b>9.90E-19</b>	
VS_2880	-	peroxiredoxin family protein/glutaredoxin	Oxydative stress	4.56	1.94E-14	
VS_2090	dsbA	Thiol:disulfide interchange protein dsbA precursor	Oxydative stress	4.51	1.28E-04	
VS_2803	-	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases 1	Stress/Chaperone	4.02	1.18E-07	
VS_II0902	-	Putative glycine betaine transporter	Osmotic stress	3.86	1.36E-14	
VS_0604	-	Inositol monophosphate phosphatase	Stress response	3.81	5.17E-08	
VS_0593	-	Putative peroxyredoxin	Oxydative stress	3.79	9.43E-14	
VS_1836	-	Glutaredoxin	Oxydative stress	3.6	5.59E-10	
VS_2425	-	Putative pressure-regulated ORF-like protein	Stress response	3.57	6.09E-03	
VS_II0495	-	cold shock DNA-binding domain protein	Stress response	3.41	1.85E-09	
VS_1180	-	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein proW	Osmotic stress	3.2	6.85E-05	
VS_1044	sohB	SohB protein, peptidase U7 family	Stress/Chaperone	2.84	3.36E-02	
VS_2602	surE	Broad specificity 5'(3')-nucleotidase and polyphosphatase SurE	Stress response	2.79	4.53E-04	
VS_0435	sspB	Stringent starvation protein SspB	Stress response	2.49	5.99E-05	
VS_1181	-	Glycine betaine-binding periplasmic protein	Osmotic stress	2.42	1.85E-03	
VS_3140	-	Thiol:disulfide interchange protein dsbA precursor	Oxydative stress	2.4	7.29E-05	
VS_II0148	-	Catalase	Oxydative stress	2.19	6.28E-05	
VS_0907	cpvA	Bacteriocin production protein	Toxin production	2.18	9.90E-03	
VS_II1328	frmC	S-formylglutathione hydrolase	Glutathione	2.14	1.22E-03	
VS_3083	-	Peroxyredoxin	Oxydative stress	2.14	2.19E-02	
VS_0374	djlA	DnaJ-like inner membrane protein DjIA	Chaperone/Stress response	2.03	3.24E-02	
VS_1992	-	Psp operon transcriptional activator	Stress response	-2.1	1.63E-02	
VS_1989	pspC	Phage shock protein C	Stress response	-2.14	1.45E-02	
VS_II1336	-	Sigma-54 dependent transcriptional regulator	Stress response	-2.15	1.92E-02	
VS_1990	pspB	phage shock protein B	Stress response	-2.22	1.21E-02	
VS_1165	-	Putative heat shock protein HslI	Stress/Chaperone	-2.24	4.09E-03	
VS_0238	-	putative Co-chaperonin GroES	Stress response:chaperone	-2.35	3.00E-04	
VS_2901	hslV	ATP-dependent protease hslV	Stress response	-2.36	1.56E-03	
VS_1991	pspA	phage shock protein A	Stress response	-2.38	3.18E-03	
VS_0039	-	Acrylyl-CoA reductase	Stress response	-2.4	3.84E-03	
VS_1934	-	Similar to phage shock protein E	Stress response	-2.46	6.41E-03	
VS_2757	-	RNA polymerase sigma-54 factor	Stress response	-2.53	1.86E-03	
VS_m2637	-	6S	Stress response	-2.56	1.59E-04	
VS_0014	ibpA	Small heat shock protein ibpA (16 kDa heat shock protein A)	Chaperone and stress	-2.65	1.00E-03	
VS_II0087	-	Putative addiction module	Toxin/antitoxin system	-2.73	2.00E-02	
VS_1074	-	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA	Stress response	-2.76	1.64E-03	
VS_1073	-	ATP-dependent Clp protease adaptor protein clpS	Stress response	-2.93	1.03E-03	
VS_II0381	-	HigB toxin protein	Toxin/antitoxin system	-2.98	5.65E-03	
VS_0562	-	Chaperone ClpB protein	Chaperone/stress response	-3.05	1.30E-04	
VS_1468	-	Universal stress protein E	Stress response	-3.09	1.23E-04	
VS_II0382	-	HigA antitoxin protein	Toxin/antitoxin system	-3.22	1.18E-03	
VS_II0764	-	Putative cochaperone with DnaJ-domain	Chaperone and stress	-3.27	3.68E-04	
VS_II0086	-	Putative antitoxin of toxin-antitoxin stability system	Toxin/antitoxin system	-3.33	2.39E-03	
VS_0207	-	Putative rhodanese-related sulfurtransferase	Stress response	-3.34	6.23E-05	
VS_1519	-	Putative anti-sigma regulatory factor	Stress response	-3.57	1.59E-02	
VS_II0877	-	Putative magnesium chelatase MoxR	Porphyrin and chlorophyll metabolism	-3.58	2.23E-03	
VS_0090	-	Universal stress protein A	Stress response	-4.15	2.74E-06	
VIBSP1_misc_RNA_129	VrrA	VrrA sRNA	Stress response	-4.17	3.90E-06	
VS_1445	-	Plasmid stabilization element ParD antitoxin	Toxin/antitoxin system	-4.31	1.22E-05	
VS_0092	uspB	Universal stress protein B	Stress response	-4.45	1.33E-05	
VS_1444	-	Plasmid stabilization element ParE toxin	Toxin/antitoxin system	-5.05	2.23E-05	
VS_II0853	-	RpoS-like sigma factor (rpoQ?)	Stress response	-5.12	5.21E-07	
VS_1618	-	universal stress protein A	Stress response	-5.17	6.22E-08	

## Metal homeostasis

VS_II0514	cusC	<b>Copper efflux system outer membrane protein CusC</b>	<b>copper</b>	<b>9.2</b>	<b>8.03E-27</b>	
VS_II0517	cusF	<b>Periplasmic copper binding protein CusF</b>	<b>copper</b>	<b>8.15</b>	<b>1.39E-18</b>	
VS_II0515	cusB	<b>Copper efflux system, membrane fusion protein CusB</b>	<b>copper</b>	<b>6.76</b>	<b>2.47E-24</b>	
VS_0768	copA	<b>Copper-exporting P-type ATPase A CopA</b>	<b>copper</b>	<b>5.87</b>	<b>3.30E-22</b>	
VS_II0516	cusA	<b>Copper efflux system protein, membrane component CusA</b>	<b>copper</b>	<b>5.69</b>	<b>6.98E-26</b>	
VS_1902	sufB	Protein SufB involved in FE-S cluster assembly	iron	4.69	1.56E-08	
VS_1124	viuD	ABC transporter: Transmembrane protein; Iron-siderophore uptake, Vibriobactin	iron	4.6	2.79E-03	
VS_II1126	-	ABC transporter: substrate-binding protein; vibrioferrin uptake	iron	4.42	4.58E-08	
VS_II1127	-	Vibrioferrin receptor	iron	4.41	1.22E-15	
VS_1923	-	Putative iron-regulated protein A	iron	4.18	2.04E-17	
VS_II0681	-	Putative TonB system transport protein	iron	4.16	1.50E-02	
VS_II0284	hutD	hemin ABC transporter, ATP-binding protein HutD	iron	4.12	1.24E-03	
VS_m0107	ryhB	RyhB	iron	4.12	3.18E-17	
VS_1123	viuP	ABC transporter: Substrate-binding protein precursor (BP); Iron-siderophore uptake (Vibriobactin)	iron	4.03	3.89E-04	
VS_1121	viuA	Vibriobactin receptor precursor	iron	3.99	6.64E-13	
VS_1122	viuB	Vibriobactin utilization protein	iron	3.91	1.90E-06	
VS_II1133	pvsE	Vibrioferrin biosynthesis protein PvsE	iron	3.81	5.22E-05	

VS_II1128	-	Receptor for a ferric siderophore of unknown origin	iron	3.64	3.58E-10
VS_II1131	pvsC	Multi-drug efflux pump homolog PvsC	iron	3.56	8.71E-07
VS_II1132	pvsD	Vibrio ferrin biosynthesis protein PvsD	iron	3.52	2.06E-07
VS_II1123	-	ABC transporter: ATP-binding protein; Vibrio ferrin uptake	iron	3.5	2.33E-02
VS_1904	sufD	Protein SufD involved in FE-S cluster assembly	iron	3.49	1.36E-03
VS_1905	sufS	Cysteine desulfurase	iron	3.37	1.57E-03
VS_0767	copG	Putative copper binding protein CopG	copper	3.21	1.84E-07
VS_II1124	-	ABC transporter: transmembrane protein; Vibrio ferrin uptake	iron	3.1	1.59E-02
VS_II0285	-	Hemin transport system permease protein	iron	2.97	2.06E-04
VS_II0751	-	heme receptor	iron	2.92	1.37E-08
VS_II1071	-	ABC transporter, periplasmic substrate binding protein; enterobactin uptake	iron	2.74	3.20E-04
VS_2083	zntA	Putative zinc transporting ATPase ZntA	zinc	2.65	1.46E-06
VS_II0412	viuB	Siderophore-interacting protein ViuB	iron	2.64	1.81E-02
VS_0290	zur	Zinc uptake regulation protein Zur	zinc	2.59	2.29E-04
VS_II0286	-	hemin ABC transporter, periplasmic hemin-binding protein HutB	iron	2.54	1.23E-02
VS_II0682	-	Putative TonB protein	iron	2.54	8.25E-03
VS_2502	hemL	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	iron	2.53	3.76E-02
VS_2518	-	iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-compound-binding protein	iron	2.44	1.25E-05
VS_1464	-	Putative copper transporting ATPase	copper	2.44	8.70E-03
VS_3101	-	Putative multicopper oxydase CumA-like	copper	2.29	3.08E-02
VS_II1130	pvsB	Vibrio ferrin biosynthesis protein PvsB	iron	2.19	3.74E-05
VS_2516	-	Putative Fe(3+)-transporting ATPase	iron	2.06	1.69E-02
VS_II0677	-	Ferrichrome-iron receptor	iron	-2.08	3.00E-02
VS_2850	-	ABC transporter, ATP-binding protein	iron	-2.3	8.20E-03
VS_2237	znuA	High-affinity zinc uptake system protein znuA precursor	zinc	-2.35	3.28E-02
VS_2122	-	hypothetical protein	iron	-2.64	9.90E-03
VS_II0400	-	ABC transporter: Substrate binding protein precursor	iron	-3.1	4.62E-02
VS_II0399	-	ABC-type Fe3+ transport system, periplasmic component	iron	-3.37	6.41E-03
VS_II0600	napF	iron-sulfur cluster-binding protein NapF	iron	-3.4	1.09E-04
VS_0091	ftnA	Ferritin 1	iron	-4.18	1.91E-05
VS_2124	-	Lipoprotein A family protein	iron	-4.77	5.36E-05

## Nucleoside and nucleotide metabolism

VS_3121	purK	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	Purine metabolism	6.33	1.05E-07
VS_2927	pyrB	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	5.72	3.57E-11
VS_II0447	-	5'-nucleotidase (Nucleoside 5'-monophosphatephosphohydrolase)	Nicotinate and nicotinamide metabolism;	4.88	1.81E-03
VS_2740	pyrB2	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain	Pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	4.61	7.83E-05
VS_2741	pyrI2	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	4.56	5.61E-06
VS_0664	-	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	Purine metabolism	4.47	1.07E-13
VS_2034	-	Adenylosuccinate lyase	Purine metabolism	3.83	2.55E-08
VS_3074	-	Guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase	Purine metabolism	3.81	4.00E-07
VS_0628	-	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	Purine metabolism	3.8	4.78E-11
VS_2228	-	Formyltetrahydrofolate deformylase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3.67	3.11E-08
VS_2053	-	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase	Pyrimidine metabolism	3.52	5.75E-06
VS_2951	purH	Bifunctional purine biosynthesis protein purH	Purine metabolism	3.47	2.47E-06
VS_1422	pyrD	Dihydroorotate dehydrogenase	Pyrimidine metabolism	3.46	7.82E-05
VS_1717	-	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	Purine metabolism	3.4	3.50E-02
VS_2928	pyrI	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	pyrimidine ribonucleotide biosynthesis	3.31	2.02E-04
VS_2952	-	Phosphoribosylamine--glycine ligase	Purine metabolism	3.29	8.86E-07
VS_II0639	-	ADP-ribose diphosphatase	Nucleoside and nucleotide metabolism	3.28	3.42E-02
VS_0748	-	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	Purine and pyrimidine metabolism	3.27	1.69E-09
VS_0629	-	GMP synthase	Purine metabolism	3.25	4.26E-08
VS_3120	-	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	Purine metabolism	3.19	1.14E-03
VS_0908	-	Amidophosphoribosyltransferase	Purine metabolism	3.14	2.12E-05
VS_0615	-	Nucleoside diphosphate kinase	Pyrimidine metabolism	3.1	4.98E-05
VS_0159	-	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase	Purine metabolism	3.07	2.02E-08
VS_2030	gsk	inosine guanosine kinase	Purine metabolism	2.98	4.76E-02
VS_2268	-	Adenylate kinase	Purine metabolism	2.94	2.43E-03
VS_2318	purM	Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase	Purine metabolism	2.88	5.35E-06
VS_II0463	tktA	Transketolase	Pentose phosphate pathway	2.82	1.75E-06
VS_II1110	guaC	GMP reductase GuaC	Purine metabolism	2.73	3.26E-03
VS_2351	pyrH	Uridylate kinase	Pyrimidine metabolism	2.65	1.67E-03
VS_1205	-	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	Purine metabolism	2.31	2.23E-02
VS_2463	deoC	deoxyribose-phosphate aldolase	Nucleoside and nucleotide metabolism	-2.02	5.87E-03
VS_2082	-	uridine phosphorylase	Pyrimidine metabolism	-2.15	1.40E-02
VS_2085	-	Putative inosine monophosphate dehydrogenase	Purine metabolism	-3	7.62E-04
VS_2196	-	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase-like protein	Purine metabolism	-3.01	4.23E-04



VS_2195	-	Putative deoxyribonucleoside 5'-monophosphatase	Purine metabolism	-4.4	3.26E-06
---------	---	---	-------------------	------	----------

### Cofactor and small molecule carrier biogenesis

VS_2531	-	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase	Folate biosynthesis	3.98	1.90E-03
VS_2039	bioF	8-amino-7-oxononanoate synthase	Biotin	3.5	4.09E-04
VS_1702	-	nicotinate-nucleotide--dimethylbenzimidazole	Porphyrin and chlorophyll metabolism	3.24	1.19E-02
VS_0150	-	Carboxylesterase bioH (Biotin synthesis protein bioH)	Biotin	3.05	5.70E-03
VS_m2768	-	TPP riboswitch	Cofactor/small molecule carrier biogenesis	3	6.22E-08
VS_2267	-	Ferrochelatase (Protoheme ferro-lyase)	Porphyrin and chlorophyll metabolism	2.98	9.92E-05
VS_2532	-	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.94	3.72E-02
VS_0181	-	Coenzyme A biosynthesis bifunctional protein coaBC	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.86	8.71E-03
VS_0900	-	Erythronate-4-phosphate dehydrogenase	Cofactor, small molecule carrier biosynthesis biosynthesis	2.83	1.69E-03
VS_0889	folD	Bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase and 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	One carbon pool by folate	2.77	7.13E-03
VS_3081	ggt	Gamma-glutamyltranspeptidase	Glutathione metabolism	2.77	1.85E-03
VS_0648	-	Probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2.76	2.63E-02
VS_2040	bioB	Biotin synthase	Biotin	2.72	3.38E-03
VS_II0108	fpr	NADPH-flavin oxidoreductase	FAD, FMN biosynthesis	2.67	2.98E-02
VS_m2999	-	Cobalamin riboswitch	Cofactor/small molecule/carrier	2.64	3.02E-03
VS_3003	-	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase, class I	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2.38	4.65E-03
VS_3069	-	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	Ubiquinone and menaquinone	2.35	4.21E-04
VS_2533	-	Pantoate--beta-alanine ligase	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.29	1.10E-02
VS_IIim1091	-	TPP riboswitch	Thiamine	2.28	1.73E-04
VS_2615	-	Holo-[acyl-carrier-protein] synthase	Pantothenate and CoA biosynthesis	2.21	1.12E-02
VS_2648	epd	D-erythrose-4-phosphate dehydrogenase	pyridoxal 5'-phosphate biosynthesis I	2.2	2.84E-03
VS_II1263	ribB	3;4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	Riboflavin	2.06	8.32E-04
VS_0371	-	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	Cofactor, small molecule carrier biosynthesis biosynthesis	2.01	1.55E-03
VS_1924	ribA	GTP cyclohydrolase-2	Cofactor, small molecule carrier biosynthesis biosynthesis	-2.27	1.06E-02
VS_2405	ipsA	(2E,6E)-farnesyl diphosphate synthase	isopreneoid biosynthesis	-2.72	2.42E-03
VS_II0722	-	Cobryic acid synthase		-2.83	1.25E-03
VS_II0567	-	putative cobalamin synthesis protein	Cofactor/small molecule carrier biogenesis	-3.23	2.79E-04
VS_II1519	-	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (catechol pathway)	Phenylalanine degradation	-3.69	3.80E-03
VS_II0276	-	Hypothetical protein	Nicotinate and nicotinamide metabolism	-3.9	2.37E-05
VS_II1526	-	Putative GTP cyclohydrolase II	Riboflavin biosynthesis	-4.63	2.79E-06
VS_II0373	cyoE	Protoheme IX farnesyltransferase	Heme	-5.39	1.78E-07

### DNA replication, recombination and repair

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

### Signalisation

VS_0410	-	Probable two-component system sensor kinase	Signalisation	3.88	6.25E-03
VS_0540	-	sensor histidine kinase	Signalisation	2.8	6.81E-04
VS_0873	-	putative sensory box/GGDEF family protein	Signalisation	2.63	3.40E-02
VS_0910	-	GGDEF family protein	Signalisation	2.52	2.66E-03
VS_0964	-	sensory box histidine kinase/response regulator	Signalisation	2.48	3.26E-03
VS_1155	-	Putative signal transduction protein (SH3 domain)	Signalisation	2.38	2.23E-03
VS_1307	-	predicted signal-transduction protein	Signalisation	2.36	8.54E-03

VS_1315	-	Signal transduction histidine kinase	Signalisation	2.3	3.68E-02
VS_1316	-	signal transduction histidine kinas	Signalisation	-2.19	7.64E-03
VS_1390	-	Response regulator	Signalisation	-2.26	4.86E-02
VS_1911	-	putative GGDEF family protein	Signalisation	-2.34	1.14E-02
VS_2042	-	DNA-binding response regulator	Signalisation	-2.41	1.48E-02
VS_2938	-	GGDEF family protein	Signalisation	-2.72	8.45E-04
VS_2940	-	sensory box histidine kinase/response regulator	Signalisation	-2.85	4.27E-03
VS_2949	-	Hypothetical response regulatory protein	Signalisation	-2.99	1.14E-03
VS_3042	-	hypothetical regulatory components of sensory transduction	Signalisation	-3	4.24E-04
VS_3043	-	Putative two-component response regulator	Signalisation	-3.24	4.35E-04
VS_II0009	-	GGDEF family protein	Signalisation	-3.27	2.49E-05
VS_II0271	-	GGDEF family protein	Signalisation	-3.75	6.01E-06
VS_II0303	-	Hypothetical protein containg GGDEF domain	Signalisation	-3.87	6.48E-05
VS_II0348	-	Putative two-component regulatory system; Multi-sensor hybrid histidine kinase	Signalisation	-4.05	1.16E-05
VS_II0675	-	Response regulator	Signalisation	-4.07	2.11E-05
VS_II0727	-	Putative two-component sensor	Signalisation	-4.09	6.87E-05
VS_II0761	-	Putative two-component regulatory system: response regulator containing a CheY-like receiver domain and an HD-GYP domain	Signalisation	-4.14	7.06E-06
VS_II0864	-	putative sensor protein	Signalisation	-4.74	1.96E-06
VS_II0891	-	Putative diguanylate cyclase, GGDEF family protein	Signalisation	-4.86	2.06E-07
VS_II1181	-	response regulator	Signalisation	-5.32	1.10E-07
VS_II1409	-	Putative histidine kinase	Signalisation	-5.64	6.68E-08
VS_II1524	-	GGDEF family protein	Signalisation	-6.51	2.70E-08

### LPS and capsule biogenesis

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

### Pilus biogenesis

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

### Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle

VS_II0904	-	Aldehyde dehydrogenase	Tryptophan metabolism ; Propanoate metabolism	7.65	4.14E-34
VS_2246	-	Putative succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	6.13	3.85E-26
VS_2244	sdhB	succinate dehydrogenase	Butanoate metabolism	6.06	4.22E-22

VS_2241	sucC	Succinyl-CoA synthetase beta chain	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	5.7	1.81E-24
VS_2242	-	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase (component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex)	Tryptophan metabolism	5.66	1.05E-25
VS_2243	-	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	Tryptophan metabolism	5.61	5.89E-27
VS_2240	-	Succinyl-CoA synthetase alpha chain	Propanoate metabolism	5.32	7.65E-22
VS_0131	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	TCA cycle	5.22	1.19E-23
VS_2247	-	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	4.77	2.02E-10
VS_2248	-	Succinate dehydrogenase cytochrome	Glycolysis/neoglucogenesis/TCA	4.64	1.35E-15
VS_II0346	gapC	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	4.43	2.61E-13
VS_2249	-	Citrate synthase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	4.37	2.06E-15
VS_2937	-	Fumarate hydratase class II	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	3.98	8.68E-13
VS_2881	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis/Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3.51	1.55E-11
VS_II1225	ppsA	Phosphoenolpyruvate synthase/pyruvate phosphate dikinase	Glycolysis	3.32	2.93E-09
VS_0389	-	Acetolactate synthase isozyme III small subunit	Pyruvate metabolism; Butanoate metabolism;	3.25	3.06E-06
VS_0388	-	Acetolactate synthase isozyme III large subunit	Butanoate metabolism	3.23	4.86E-10
VS_1071	-	Isocitrate dehydrogenase	Glycolysis/Gluconeogenesis/TCA cycle	3.17	1.05E-09
VS_2540	-	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	3.07	1.56E-08
VS_2252	pgm	Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	Glycogen, starch and sucrose metabolism	3.05	2.18E-05
VS_1202	sfcA	Malate dehydrogenase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.92	9.97E-05
VS_1407	-	Putative phosphoenolpyruvate synthase	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.92	1.40E-02
VS_0358	-	Malate dehydrogenase	TCA cycle, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.53	5.35E-06
VS_II0264	aceA	Isocitrate lyase	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2.4	3.44E-05
VS_2645	-	Fructose/tagatose bisphosphate aldolase	Glycolysis / Gluconeogenesis/TCA	2.35	2.00E-05
VS_2522	-	Aconitate hydratase 2 (Citrate hydro-lyase 2)	TCA cycle	2.12	9.53E-05
VS_1037	-	Pyruvate kinase II	Glycolysis / Gluconeogenesis; Carbon fixation in photosynthetic organisms	-2.6	1.10E-03

## Virulence

VS_0468	-	Putative endoribonuclease, translation inhibitor	Virulence	9.49	2.24E-30
VS_II0149	-	Phospholipase	Virulence	6.96	3.03E-11
VIBSP1_misc_RNA_187	inhA/prtV	Putative M6 secreted metalloprotease PrtV/InhA	Virulence	6.94	1.17E-28
VS_1527	luxN	sensor protein LuxN	Quorum sensing	3.3	1.48E-04
VS_m0154	luxM	Lux M	Quorum sensing	3.02	5.58E-04
VS_2581	-	Putative TPR repeat protein	Virulence	2.81	3.97E-02
VS_II0260	luxT	LuxT regulator	Quorum sensing	2.7	1.12E-05
VS_II0261	csrA	Carbon storage regulator CsrA	Quorum sensing	2.47	9.86E-05
VS_II0283	-	adenosylhomocysteine nucleosidase	Cysteine and methionine metabolism	2.1	1.58E-02
VS_IIml425	-	Putative hemolysin-type RTX toxin	Virulence	2	1.77E-04
VS_II0512	luxO	Putative LuxO repressor protein	Quorum sensing	-2.34	4.92E-03
VS_II0855	csrB3	CsrB3	Quorum sensing	-2.36	1.12E-03
VS_II0856	csrB2	CsrB2 sRNA	Quorum sensing	-2.79	5.54E-06
VS_II1066	epsN	general secretion pathway protein N	Type II protein secretion system	-2.92	2.89E-03
VS_0145	csrB1	CsrB1	Virulence	-3	1.01E-08
VS_1240	csrB4	small regulatory RNA CsrB4	Quorum sensing	-3.17	1.39E-07
VS_1267	-	Putative hemolysin-type calcium-binding region	Virulence	-3.43	7.11E-05
VS_1281	-	Putative RTX toxin, VCBS repeat protein	RTX toxin	-3.76	7.66E-05
VS_1394	-	Conserved hypothetical protein (N-terminal part of VS_II0856)	RTX toxin	-3.79	6.52E-06
VS_1842	-	Conserved hypothetical protein, VCBS repeat, possible RTX toxin	RTX toxin	-4.34	1.21E-07
VS_II0905	-	Putative cyclic di-GMP phosphodiesterase response regulator	Signalisation	-4.44	7.70E-06
VS_II1062	vsm	Extracellular zinc metalloprotease	Virulence	-5.77	2.11E-05
VS_m2362	-	Putative biofilm-associated surface protein	Virulence	-6.17	2.66E-10

## Envelope biogenesis

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

VS_0574	mepA	Penicillin-insensitive murein endopeptidase	Murein	-4.86	6.85E-07
<b>Fatty acid and phospholipid metabolism</b>					
VS_2217	pfaC	PfaC, omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase	Fatty acid metabolism	4.06	1.23E-05
VS_II0773	-	long-chain fatty acid transport protein	Fatty acid metabolism	3.4	4.64E-09
VS_0749	ispE	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase	Isoprenoid biosynthesis	3.05	4.09E-08
VS_0041	-	3-hydroxybutyryl-CoA epimerase, Fatty acid oxidation complex subunit alpha	Butanoate metabolism	2.71	9.66E-08
VS_1043	-	Putative oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase with NAD(P)-binding domain	Fatty acid metabolism	2.71	2.20E-02
VS_0040	-	3-ketoacyl-CoA thiolase (Fatty acid oxidation complex beta subunit)	Fatty acid metabolism	2.44	1.79E-06
VS_2743	plsC	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism	2.42	3.95E-02
VS_2216	pfaB	PfaB, omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase	Fatty acid metabolism	2.37	3.33E-02
VS_0861	-	Long-chain fatty acid transport protein precursor	Fatty acid metabolism	2.25	1.91E-05
VS_1026	-	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	Fatty acid metabolism	2.17	3.87E-04
VS_2341	fabZ	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein]dehydratase	Fatty acid metabolism	2.1	2.93E-02
VS_0938	fadH	2,4-dienoyl-CoA reductase [NADPH]	Fatty acid metabolism	2.07	5.23E-04
VS_0786	-	putative phospholipid biosynthesis acyltransferase	Fatty acid metabolism	-2.19	1.82E-02
VS_3007	-	Diacylglycerol kinase	Glycerophospholipid metabolism	-2.4	7.20E-03
VS_II0760	-	Putative trans-2-enoyl-CoA reductase (NAD(+))	Butanoate metabolism	-2.49	1.63E-02
VS_II1052	-	Fatty acid cis/trans isomerase	Fatty acid metabolism	-2.62	1.75E-03
VS_II0647	-	Putative lipase	Fatty acid metabolism	-2.63	2.33E-02
VS_II1294	-	Putative muconate cycloisomerase	Fatty acid and phospholipid metabolism	-2.77	1.45E-02
VS_II0587	phaC	Polyhydroxyalkanoic acid synthase	Fatty acid metabolism	-3.23	2.70E-04
VS_II0230	-	Putative exported triacylglycerol hydrolase/lipase	Fatty acid metabolism	-3.28	3.01E-02
VS_II0585	atoB	Acetyl-CoA acetyltransferase	Pyruvate metabolism;	-3.92	7.91E-05
VS_II1510	-	Conserved acetyl CoA synthase	Butanoate metabolism	-3.96	3.41E-03
VS_II0584	-	Acetoacetyl-CoA reductase	Butanoate metabolism	-4.94	3.83E-06
<b>Central intermediary metabolism</b>					
VS_0300	cysI	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component	Sulfur metabolism	5.39	2.35E-23
VS_2788	cysN	Sulfate adenylate transferase subunit 1	Sulfur metabolism	5.2	3.17E-24
VS_0301	-	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	Sulfur metabolism	4.8	3.94E-16
VS_2789	cysD	sulfate adenylate transferase, subunit 2	Sulfur metabolism	4.53	1.85E-20
VS_2892	-	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	One carbon pool by folate	4.49	3.92E-13
VS_0299	cysJ	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	Sulfur metabolism	4.38	7.71E-17
VS_2639	-	Ribose-5-phosphate isomerase A	Pentose phosphate pathway	4.32	6.60E-05
VS_2654	-	Transketolase 1	Pentose phosphate pathway (non oxidative branch)	3.92	5.11E-12
VS_0924	phoA	Alkaline phosphatase III	Phosphorus metabolism	3.69	1.78E-06
VS_2489	-	dihydropteroate synthase	Folate biosynthesis	3.35	3.98E-02
VS_II0138	-	3-keto-L-gulonate 6-phosphate decarboxylase	Pentose and glucuronate interconversions	3.04	3.45E-02
VS_2786	cysC	Adenylylsulfate kinase	Sulfur metabolism	2.56	3.84E-04
VS_2655	-	S-adenosylmethionine synthetase	SAM biosynthesis	2.11	3.32E-04
VS_1239	speB	Agmatinase (Agmatine ureohydrolase)	Arginine and proline metabolism	-3.32	1.01E-04
VS_1238	speA	Biosynthetic arginine decarboxylase	Putrescine biosynthesis	-3.41	4.45E-06
VS_II0870	-	Putative type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase	Phosphorus metabolism	-5.27	4.43E-07
<b>Transcriptional regulation</b>					
VS_0322	Irp	Leucine-responsive regulatory protein	Transcriptional regulation	3.84	1.76E-09
VS_II0114	glpR	DNA-binding transcriptional repressor GlpR	Transcriptional regulation	3.8	4.22E-02
VS_2047	-	Hypothetical transcriptional regulator	Transcriptional regulation	2.5	4.88E-02
VS_2141	crp	cAMP-binding protein CRP	Catabolic repression	2.18	3.06E-03
VS_2236	-	Putative regulatory protein	Transcriptional regulation	2.12	2.52E-02
VS_2855	-	predicted transcriptional regulator	Transcriptional regulation	2.07	4.97E-02
VS_II0093	-	AraC-type transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-2.02	2.66E-02
VS_II0101	-	Putative transcriptional regulator, AraC/XylS family	Transcriptional regulation	-2.54	3.71E-03
VS_II0118	-	Transcriptional regulators, LysR family	Transcriptional regulation	-2.71	1.11E-02
VS_II0120	-	Transcriptional regulators, LysR family	Transcriptional regulation	-3.01	3.60E-03
VS_II0817	-	Transcriptional regulator, LysR family	Transcriptional regulation	-3.19	1.90E-02
VS_II1402	-	transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-3.95	1.03E-02
VS_II0110	-	transcriptional regulator	Transcriptional regulation	-5.33	5.24E-07
<b>Chemotaxis</b>					
VS_1157	-	Histidine kinase, HAMP region:Bacterial chemotaxis sensory transducer	Chemotaxis	3.56	1.99E-03
VS_II1312	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.3	4.12E-05
VS_II1300	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.03	8.44E-05
VS_II1084	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	3.02	3.30E-03
VS_0800	-	Methylase of chemotaxis methyl-accepting protein CheR	Chemotaxis	2.71	1.01E-06
VS_1907	-	methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.34	2.60E-02
VS_1636	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.21	1.95E-02
VS_1396	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.18	8.68E-04
VS_II0216	-	Methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	2.05	3.29E-04
VS_0929	-	Putative Methyl-accepting chemotaxis protein 1	Chemotaxis	-2.06	2.36E-02
VS_II1337	-	Putative methyl-accepting chemotaxis protein	Chemotaxis	-2.8	1.01E-02
VS_II0428	-	chemotactic transducer-related protein	Chemotaxis	-6.24	1.56E-08
<b>Mobile genetic elements</b>					
VS_0486	-	Integrase, catalytic region (fragment)	Mobile genetic elements	-2.82	3.51E-02
VS_1387	-	Putative site-specific recombinase, phage integrase family	Mobile genetic element	-3.72	3.18E-05

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

## Protein and peptide degradation

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

## Cell division

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

## DNA metabolism

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

## Transcription

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

## Motility

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

## Unknown functions

<b>VIBSP2_misc_RNA_19</b>	<b>Vsr217</b>	<b>IGR VS_II0219-VS_II0220</b>	<b>sRNA of unknown function</b>	<b>6.37</b>	<b>1.62E-22</b>
VIBSP1_misc_RNA_136	Vsr141	AS to VS_2048	sRNA of unknown function	4.65	2.55E-06
VIBSP1_misc_RNA_170	Vsr177	IGR VS_2739- VS_2740	sRNA of unknown function	4.28	5.58E-04
VIBSP1_misc_RNA_46	vsr47	IGR VS_0628- VS_0629	sRNA of unknown function	4.28	8.21E-06
VIBSP1_misc_RNA_76	Vsr80	IGR VS_1120-VS_1121	sRNA of unknown function	3.48	4.57E-03
VIBSP2_misc_RNA_73	Vsr271	IGR VS_II0901-VS_II0902	sRNA of unknown function	3.47	7.10E-06
VIBSP1_misc_RNA_153	Vsr159	IGR VS_2288- VS_2289	sRNA of unknown function	2.9	1.34E-03
VIBSP1_misc_RNA_160	Vsr167	sRNA Vsr167: IGR VS_2479- VS_2479	sRNA of unknown function	2.49	1.24E-02
VIBSP1_misc_RNA_192	Vsr198	IGR VS_3142- VS_3143	sRNA of unknown function	2.47	1.57E-03
VIBSP1_misc_RNA_5	Vsr5	IGR2 VS_0034- VS_0035	sRNA of unknown function	2.36	2.05E-02
VS_m0034	-	yybP-ykoY	sRNA of unknown function	2.35	2.44E-02
VIBSP1_misc_RNA_8	Vsr9	IGR VS_0112- VS_0113	sRNA of unknown function	2.25	6.15E-03
VIBSP2_misc_RNA_94	Vsr293	IGR1 VS_II1189-VS_II1190	sRNA of unknown function	-2.03	3.06E-03
VIBSP2_misc_RNA_88	Vsr286	Vsr286: IGR VS_II1134-VS_II1135	sRNA of unknown function	-2.11	1.65E-02
VIBSP1_misc_RNA_87	vsr91	IGR VS_1291- VS_1294	sRNA of unknown function	-2.35	4.37E-03
VIBSP1_misc_RNA_137	Vsr142	IGR VS_2078- VS_2079	sRNA of unknown function	-2.36	1.72E-02
VIBSP1_misc_RNA_173	Vsr180	IGR VS_2790- VS_2791	sRNA of unknown function	-2.5	3.23E-02
VIBSP1_misc_RNA_81	vsr85	AS to VS_1168	sRNA of unknown function	-2.52	3.99E-02
VIBSP2_misc_RNA_95	Vsr294	AS to VS_II1190	sRNA of unknown function	-2.54	3.91E-04
VIBSP2_misc_RNA_85	Vsr283	IGR VS_II1100-VS_II1101	sRNA of unknown function	-2.65	3.94E-03
VIBSP2_misc_RNA_5	Vsr203	IGR VS_II0045-VS_II0047	sRNA of unknown function	-2.71	8.50E-03
VIBSP1_misc_RNA_166	Vsr173	IGR VS_t2708- VS_2709	sRNA of unknown function	-2.73	1.97E-02
VIBSP2_misc_RNA_109	Vsr308	IGR VS_II1374-VS_II1375	sRNA of unknown function	-2.76	1.03E-02
VIBSP2_misc_RNA_86	IsrK	IsrK Hfq binding RNA	sRNA of unknown function	-2.82	1.82E-04
VIBSP1_misc_RNA_86	vsr90	IGR2 VS_1261- VS_1262	sRNA of unknown function	-2.87	1.59E-03
VIBSP1_misc_RNA_77	vsr81	IGR UTR VS_t1131-VS1132	sRNA of unknown function	-2.96	9.33E-03
VIBSP2_misc_RNA_112	Vsr311	IGR VS_II1397-VS_II1398	sRNA of unknown function	-2.98	1.04E-04
VIBSP2_misc_RNA_110	Vsr309	AS to VS_II1376	sRNA of unknown function	-2.99	3.24E-02
VIBSP1_misc_RNA_133	Vsr138	IGR VS_1942- VS_1943	sRNA of unknown function	-3.04	7.45E-04
VIBSP1_misc_RNA_152	Vsr158	AS to VS_2288	sRNA of unknown function	-3.08	4.15E-03
VIBSP1_misc_RNA_27	Vsr28	AS to VS_0322	sRNA of unknown function	-3.1	8.50E-03
VIBSP2_misc_RNA_103	Vsr302	AS to VS_II1293	sRNA of unknown function	-3.12	1.48E-02
VIBSP1_misc_RNA_2	Vsr2	IGR VS_0013- VS_0014	sRNA of unknown function	-3.13	2.21E-04

VIBSP1_misc_RNA_141	Vsr146	IGR SRP- VS_2163:	sRNA of unknown function	-3.26	4.98E-03
VIBSP1_misc_RNA_30	Vsr31	IGR VS_0458- VS_0459	sRNA of unknown function	-3.29	1.93E-03
VIBSP2_misc_RNA_100	Vsr299	IGR2 VS_II1279-VS_II1280	sRNA of unknown function	-3.42	1.59E-03
VIBSP2_misc_RNA_61	Vsr259	IGR1 VS_II0725-VS_II0726	sRNA of unknown function	-3.44	4.83E-05
VIBSP2_misc_RNA_114	Vsr313	IGR VS_II1404-VS_II1405	sRNA of unknown function	-3.46	5.58E-05
VIBSP2_misc_RNA_111	Vsr310	IGR VS_II1377-VS_II1378	sRNA of unknown function	-3.47	2.38E-05
VIBSP2_misc_RNA_14	Vsr212	AS to VS_II0162	sRNA of unknown function	-3.6	9.67E-03
VIBSP2_misc_RNA_55	Vsr253	IGR2 VS_II0619-VS_II0620	sRNA of unknown function	-3.66	8.14E-05
VIBSP2_misc_RNA_39	Vsr237	IGR VS_II0466-VS_II0467	sRNA of unknown function	-3.78	4.02E-04
VIBSP2_misc_RNA_4	Vsr202	IGR VS_II0032-VS_II0033	sRNA of unknown function	-3.9	4.57E-03
VIBSP1_misc_RNA_123	Vsr127	IGR1 VS_1720- VS_1721	sRNA of unknown function	-3.91	1.76E-04
VIBSP1_misc_RNA_63	vsr67	IGR VS_0947- VS_t0948	sRNA of unknown function	-4.01	8.17E-04
VIBSP2_misc_RNA_62	Vsr260	IGR VS_II0729-VS_II0730	sRNA of unknown function	-4.03	5.23E-04
VIBSP1_misc_RNA_19	Vsr20	IGR VS_0239- VS_0240	sRNA of unknown function	-4.07	4.18E-05
VIBSP1_misc_RNA_148	Vsr154	IGR2 VS_2279- VS_2280	sRNA of unknown function	-4.22	1.47E-02
VIBSP1_misc_RNA_108	Vsr112	IGR VS_1494- VS_1495	sRNA of unknown function	-4.24	7.71E-04
VIBSP2_misc_RNA_83	Vsr281	IGR VS_II1079-VS_II1080	sRNA of unknown function	-4.31	2.80E-03
VIBSP1_misc_RNA_168	Vsr175	sRNA Vsr175: IGR2 VS_2709-VS_r2711	sRNA of unknown function	-4.38	2.55E-05
VIBSP2_misc_RNA_60	vsr258	sRNA Vsr258 IGR2 VS_II0725-VS_II0726	sRNA of unknown function	-4.62	2.97E-06
VIBSP1_misc_RNA_124	Vsr128	sRNA Vsr128 IGR VS_1726- VS_1727	sRNA of unknown function	-4.72	9.75E-07
VIBSP2_misc_RNA_89	Vsr287	sRNA Vsr287 IGR VS_II1137-VS_II1138	sRNA of unknown function	-4.72	5.80E-04
VIBSP2_misc_RNA_50	Vsr248	IGR2 VS_II0609-VS_II0608	sRNA of unknown function	-5.2	1.14E-04
VIBSP2_misc_RNA_7	Vsr205	AS to VS_II0074	sRNA of unknown function	-5.21	8.20E-07
VIBSP1_misc_RNA_84	vsr88	IGR VS_1241- VS_1242	sRNA of unknown function	-5.37	1.93E-02
VIBSP2_misc_RNA_23	Vsr221	sRNA Vsr221 IGR1 VS_II0224-VS_II0225	sRNA of unknown function	-5.51	6.31E-08
VIBSP1_misc_RNA_167	Vsr174	IGR1 VS_2709- VS_t2711	sRNA of unknown function	-5.52	1.35E-04
VIBSP1_misc_RNA_149	Vsr155	Putative sRNA Vsr155: IGR VS_2283- VS_2284	sRNA of unknown function	-5.97	6.22E-08
VIBSP1_misc_RNA_45	Vsr46	sRNA Vsr46: IGR VS_0574- VS_0575	sRNA of unknown function	-6.4	1.48E-09
VIBSP2_misc_RNA_26	Vsr27	IGR VS_0321- VS_0322	sRNA of unknown function	-6.52	1.68E-08
VIBSP2_misc_RNA_20	Vsr218	AS to VS_II0220- VS_II0221	sRNA of unknown function	-6.83	7.12E-07
VIBSP2_misc_RNA_44	Vsr242	IGR VS_II0566-VS_II0567	sRNA of unknown function	-7.45	6.02E-13
VIBSP1_misc_RNA_157	Vsr164	IGR VS_2428-VS_2429	sRNA of unknown function	-7.96	2.41E-11
<b>VS_1283</b>	-	<b>Conserved hypothetical protein</b>	<b>Unknown function</b>	<b>7.26</b>	<b>1.08E-28</b>
VS_1068	-	hypothetical protein	Unknown function	6.39	3.76E-30
VIBSP1_CDS1223061R	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	5.42	1.13E-09
VS_2858	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	5.14	3.73E-14
VS_1156	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	5.1	5.33E-04
VS_2137	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.84	3.16E-03
VS_2587	-	Putative lipoprotein	Unknown function	4.81	2.84E-08
VS_II0263	-	Hypothetical protein	Unknown function	4.67	7.04E-05
VS_2594	-	hypothetical protein	Unknown function	4.62	2.55E-06
VS_2631	-	hypothetical protein	Unknown function	4.42	1.22E-02
VS_2966	-	hypothetical protein	Unknown function	4.29	4.36E-14
VS_0505	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.26	4.08E-07
VS_1832	-	hypothetical protein	Unknown function	4.21	1.18E-03
VS_0319	-	Hypothetical protein	Unknown function	4.12	2.80E-02
VS_II1421	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.12	2.12E-03
VS_0947	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	4.08	3.45E-02
VS_II0998	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.04	1.93E-02
VS_II0210	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	4.02	3.95E-06
VS_0004	-	Hypothetical protein	Unknown function	4	1.98E-03
VS_II1178	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	3.98	2.51E-03
VS_2036	-	hypothetical protein	Unknown function	3.97	4.96E-05
VS_II0279	-	hypothetical protein	Unknown function	3.96	4.28E-03
VS_II1505	-	hypothetical protein	Unknown function	3.95	4.19E-02
VS_1599	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.94	2.92E-02
VS_1463	-	hypothetical protein	Unknown function	3.88	4.51E-03
VS_1102	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.81	7.08E-03
VS_2734	-	hypothetical membrane protein	Unknown function	3.79	1.14E-03
VS_1019	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.76	3.81E-13
VS_0122	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.74	5.75E-08
VS_II0901	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.73	7.00E-14
VS_II0513	-	hypothetical protein	Unknown function	3.72	1.73E-11
VS_0963	-	hypothetical protein	Unknown function	3.67	1.45E-02
VS_1469	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.67	1.90E-04
VS_1921	-	Predicted periplasmic lipoprotein	Unknown function	3.65	2.06E-07
VS_1372	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.63	5.83E-04
VS_2089	-	hypothetical protein	Unknown function	3.6	1.33E-02
VS_1922	-	hypothetical protein	Unknown function	3.59	3.47E-08
VS_1686	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.54	2.33E-02
VS_II1404	-	Putative sulfurtransferase	Sulfur metabolism	3.51	2.39E-04
VS_0176	-	hypothetical protein	Unknown function	3.49	7.89E-03
VS_1340	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.48	1.43E-05
VIBSP1_CDS2590728D	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	3.41	9.49E-03
VS_2629	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.37	3.43E-02
VS_II0160	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.37	6.41E-03
VS_1266	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.36	1.30E-04
VS_1159	-	hypothetical protein	Unknown function	3.35	1.95E-02
VS_II0211	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.28	3.01E-06
VS_II0212	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.28	7.41E-04
VS_II1184	-	hypothetical protein	Unknown function	3.28	1.02E-02
VS_2595	-	hypothetical protein	Unknown function	3.21	4.40E-04
VS_2729	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.2	5.10E-06
VS_1031	-	Putative Mg-dependent DNase	Unknown function	3.19	1.35E-02
VIBSP2_CDS1210380D	-	conserved protein of unknown function	Unknown function	3.18	1.90E-03
VS_2730	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.18	1.14E-05
VS_1215	-	Conserved hypothetical protein, putative lipoprotein	Unknown function	3.17	1.88E-02
VS_0690	-	putative lipoprotein	Unknown function	3.13	5.44E-03

VS_1548	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	3.13	1.92E-02
VS_1393	-	outer membrane protein	Unknown function	3.07	1.33E-04
VS_0212	-	Conserved hypothetical protein; Putative lipoprotein	Unknown function	3.04	2.03E-04
VS_II1107	-	Hypothetical protein	Unknown function	3.03	1.60E-02
VS_0375	-	conserved protein	Unknown function	3.01	6.99E-03
VS_2391	-	TPR-repeat-containing protein	Unknown function	3.01	1.91E-02
VS_2936	-	hypothetical protein	Unknown function	3	7.41E-03
VS_1755	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.97	2.08E-02
VS_II1378	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.95	1.36E-02
VS_2183	-	Hypothetical membrane protein	Unknown function	2.93	2.79E-03
VS_II0014	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.93	5.89E-05
VS_II0016	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.88	1.19E-05
VS_0577	-	Putative peptidase U32	Unknown function	2.85	2.53E-04
VS_1687	-	Hypothetical acetyltransferase	Unknown function	2.82	9.56E-04
VS_1920	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	2.77	4.46E-05
VS_II0726	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.76	2.22E-03
VS_1374	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.75	2.30E-03
VS_II0900	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.75	4.41E-08
VS_1158	-	hypothetical protein	Unknown function	2.73	2.64E-04
VS_2492	-	Putative RNA-binding protein	Unknown function	2.66	3.48E-03
VS_0700	-	hypothetical protein	Unknown function	2.58	1.82E-02
VS_1118	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.53	6.19E-04
VS_0399	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.52	1.64E-05
VS_II0020	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.52	4.94E-03
VS_II0966	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.52	4.30E-02
VS_II0292	-	hypothetical protein	Unknown function	2.51	1.17E-04
VS_0209	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	2.5	1.07E-02
VS_II1376	-	Putative tetratricopeptide repeat containing protein	Unknown function	2.49	6.81E-04
VS_1566	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.45	1.10E-02
VS_2998	-	Outer membrane protein	Unknown function	2.45	3.31E-04
VS_0210	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.43	2.16E-02
VS_0911	-	hypothetical protein	Unknown function	2.42	2.78E-02
VS_2033	-	Hypothetical UPF0274 protein	Unknown function	2.42	1.58E-02
VS_II0135	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.42	3.98E-02
VS_0208	-	Conserved membrane protein of unknown function	Unknown function	2.41	9.44E-06
VS_1154	-	hypothetical protein	Unknown function	2.41	3.42E-06
VS_II0534	-	ABC transporter: ATP binding protein	Unknown function	2.4	1.21E-02
VS_2653	-	hypothetical protein	Unknown function	2.39	4.03E-05
VS_0966	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.37	7.55E-03
VS_3005	-	O-methyltransferase-related protein	Unknown function	2.36	1.13E-05
VS_0191	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.33	5.29E-03
VS_0848	-	hypothetical protein	Unknown function	2.3	4.47E-04
VS_1063	-	hypothetical protein	Unknown function	2.3	1.90E-02
VS_II0027	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.3	4.83E-03
VS_0621	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.28	4.61E-04
VIBSP1_CDS34891D	-	conserved inner membrane peptide of unknown function	Unknown function	2.2	6.45E-03
VS_2361	-	acetyltransferase-related protein	Unknown function	2.18	4.08E-05
VS_0969	-	hypothetical protein	Unknown function	2.17	4.56E-02
VS_1367	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.17	1.50E-02
VS_1092	-	Hypothetical protein	Unknown function	2.16	1.39E-02
VS_2915	-	putative periplasmic protein	Unknown function	2.16	1.86E-04
VS_3115	-	Putative carbonic anhydrase, family 3	Unknown function	2.14	1.96E-02
VS_1960	-	Conserved protein of unknown function; putative dsDNA mimic	Unknown function	2.1	1.51E-02
VS_II0996	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	2.1	1.69E-02
VS_II1106	-	hypothetical protein	Unknown function	2.07	2.95E-02
VS_1111	-	hypothetical protein	Unknown function	2.06	3.38E-03
VS_1413	-	Putative membrane protein	Unknown function	-2.01	4.34E-02
VS_1776	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.01	1.53E-02
VS_2328	-	SAM-dependent methyltransferase	Unknown function	-2.01	7.64E-03
VS_II0425	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.01	4.72E-02
VS_II0033	-	Amidase related to nicotinamidase	Unknown function	-2.02	1.10E-02
VS_II0152	-	Ferredoxin--NADP reductase	Unknown function	-2.03	4.14E-02
VS_II1155	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.04	2.52E-02
VS_0687	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.05	2.91E-02
VS_1261	-	Putative conserved membrane GTPase	Unknown function	-2.05	2.41E-02
VS_1399	-	Inner membrane protein	Unknown function	-2.05	2.96E-03
VS_2772	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.08	1.11E-02
VS_1295	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.1	5.57E-03
VS_1486	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.1	2.45E-02
VS_II0310	-	Outer membrane protein	Unknown function	-2.12	9.82E-03
VS_II0281	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.13	2.95E-02
VS_0582	ppx	exopolyphosphatase	Unknown function	-2.16	2.66E-02
VS_1868	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.17	2.98E-02
VS_2314	-	Predicted membrane protein	Unknown function	-2.17	1.63E-02
VS_II1206	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.17	2.53E-02
VS_1482	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.18	1.41E-02
VS_1189	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.2	9.91E-03
VS_0909	lysR	transcriptional regulator, LysR family	Unknown function	-2.22	4.65E-03
VS_0632	-	Predicted membrane protein	Unknown function	-2.27	1.04E-02
VS_2303	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.27	2.27E-02
VS_II0484	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.27	3.62E-02
VS_II0664	-	hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-2.27	4.69E-02
VS_2297	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.28	1.53E-02
VS_2791	-	Uncharacterized membrane-associated protein	Unknown function	-2.28	1.36E-02
VS_II0616	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.28	1.34E-02
VS_II1077	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.29	2.55E-02

VS_1870	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.3	1.92E-02
VS_0723	phoH	Phosphate starvation inducible protein PhoH	Unknown function	-2.31	2.28E-03
VS_1779	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.31	4.02E-03
VS_II1383	-	Transcriptional regulator	Unknown function	-2.31	1.67E-02
VS_2310	-	Predicted redox protein	Unknown function	-2.33	1.31E-02
VS_2679	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.33	8.41E-03
VS_II0663	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.34	4.09E-02
VS_II0928	-	Putative metal-dependent hydrolases	Unknown function	-2.34	4.81E-02
VS_2221	-	hypothetical hydrolase	Unknown function	-2.35	4.62E-03
VS_0385	-	Putative glycosyl transferase	Unknown function	-2.4	6.26E-03
VS_2074	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.4	3.79E-03
VS_0891	-	Putative acetyl transferase	Unknown function	-2.41	3.88E-02
VS_II0250	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.41	2.02E-02
VS_II0313	-	putative transport protein	Unknown function	-2.41	3.58E-03
VS_0917	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.43	4.55E-03
VS_1983	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.44	4.57E-02
VS_2276	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.46	1.36E-02
VS_1762	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.49	1.55E-02
VS_3141	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.53	5.99E-04
VS_II1073	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.55	1.48E-02
VS_1473	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.56	7.82E-03
VS_2723	-	HD-GYP domain protein	Unknown function	-2.56	8.33E-03
VS_II1480	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.56	2.33E-03
VS_2081	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.6	3.80E-04
VS_2852	-	Putative alcohol O-acetyl transferase	Unknown function	-2.61	4.03E-03
VS_II0916	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.61	7.98E-03
VIBSP1_CDS782366R	-	Conserved protein of unknown function; DUF3149 family	Unknown function	-2.63	1.94E-04
VS_1191	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.63	2.23E-02
VS_2161	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.64	3.56E-02
VS_2223	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.64	2.21E-03
VS_II1429	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.64	2.68E-02
VS_II0842	-	Putative transcriptional regulator, AraC/XylS family	Unknown function	-2.65	3.13E-02
VS_II0873	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.65	8.50E-03
VS_0999	-	Hypothetical membrane protein	Unknown function	-2.66	9.08E-04
VS_1855	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.66	2.96E-03
VS_II0112	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.66	3.58E-04
VS_2356	-	Hypothetical UPF0325 protein	Unknown function	-2.67	1.14E-03
VS_II1381	-	hypothetical protein; putative exported protein	Unknown function	-2.68	4.02E-02
VS_0640	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.69	2.32E-03
VS_II0129	-	Conserved outer membrane protein of unknown function, putative calcium binding protein	Unknown function	-2.71	6.68E-03
VS_II0527	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-2.71	1.09E-02
VS_II1423	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.72	9.29E-03
VS_2098	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.73	1.48E-02
VS_2273	-	Putative phosphodiesterase yfcE	Unknown function	-2.74	3.06E-03
VS_II0731	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.74	2.84E-03
VS_1245	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.75	4.99E-03
VS_II1384	-	Putative glucosylceramidase	Unknown function	-2.75	4.73E-03
VS_3082	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.76	6.21E-05
VS_2552	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.77	4.37E-03
VS_1815	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.78	1.14E-04
VS_II1164	-	Aldehyde reductase	Pyruvate metabolism	-2.78	2.84E-04
VS_1820	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.8	2.44E-03
VS_2424	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.82	1.53E-03
VS_0296	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.83	8.13E-04
VS_2165	-	hypothetical lipoprotein-related protein	Unknown function	-2.84	1.34E-03
VS_II0125	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.87	1.76E-02
VS_II1017	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.87	4.24E-03
VS_1800	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.88	9.42E-04
VS_1871	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.88	2.90E-03
VS_II0672	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.88	1.69E-03
VS_2686	-	Hypothetical protein	Unknown function	-2.89	2.07E-03
VS_II0794	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.91	4.08E-04
VS_II0526	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-2.92	5.22E-03
VS_II0549	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	-2.92	8.71E-03
VS_1488	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.93	6.93E-04
VS_2279	-	Hypothetical oxidoreductase ybbO	Unknown function	-2.94	2.65E-03
VS_2465	-	putative Mg-dependent DNase	Unknown function	-2.94	1.36E-02
VS_2709	-	hypothetical protein	Unknown function	-2.95	1.47E-03
VS_II1101	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-2.96	3.02E-04
VS_II1498	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-2.98	2.19E-02
VS_II0888	-	Putative transporter, LysE family	Unknown function	-3	1.96E-02
VS_II1092	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3	7.24E-04
VS_II0454	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.02	2.68E-05
VS_1168	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.06	9.96E-04
VS_1286	-	Conserved hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-3.07	8.30E-03
VS_2163	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.08	5.45E-04
VS_II0730	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.08	1.15E-03
VS_II1432	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.08	1.16E-04
VS_II0508	-	Putative acetyltransferase	Unknown function	-3.1	1.66E-02
VS_II0874	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.11	4.99E-03
VS_1431	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.12	4.06E-04
VS_2931	-	transcriptional regulator, LuxR family	Unknown function	-3.12	5.33E-04
VS_II1134	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-3.13	3.87E-04
VS_II0791	-	similar to conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.14	1.70E-02
VS_0550	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.15	1.50E-03



VS_0923	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.15	1.57E-03
VS_II1074	-	Putative membrane protein	Unknown function	-3.16	4.41E-03
VS_II1205	-	putative transport protein	Unknown function	-3.16	4.23E-04
VS_II1065	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.19	3.09E-04
VS_II0615	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.22	4.41E-02
VS_3028	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.27	5.98E-04
VS_1169	-	hypothetical protein; putative exported protein	Unknown function	-3.31	1.74E-04
VS_II1249	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.31	3.43E-04
VS_1581	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.33	9.23E-04
VS_II1335	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.36	3.21E-04
VS_II0462	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.43	4.20E-04
VS_II0878	-	Putative exported tetratricopeptide repeat protein	Unknown function	-3.46	4.47E-04
VS_II0701	-	putative permease	Unknown function	-3.48	1.09E-04
VS_1495	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.5	3.20E-04
VS_1872	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.5	1.25E-04
VS_II1373	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.5	1.57E-03
VS_2274	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.52	1.94E-04
VS_II1527	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.52	1.11E-05
VS_1042	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.53	1.04E-02
VS_II1172	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.53	4.40E-05
VS_1035	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.54	8.85E-05
VS_1170	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.54	5.90E-05
VS_II1075	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.54	7.84E-04
VS_II0315	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.56	8.16E-03
VS_II0374	-	Putative transcriptional regulator; lambda repressor family	Unknown function	-3.56	6.40E-03
VS_1078	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	-3.59	1.47E-04
VS_II0586	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.66	2.39E-04
VS_2222	-	Outer membrane lipoprotein Slp family	Unknown function	-3.67	2.12E-05
VS_II0872	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.68	2.71E-04
VS_II1076	-	Putative secretion protein	Unknown function	-3.7	1.81E-04
VS_0240	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.71	6.84E-05
VS_2632	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.75	3.59E-05
VS_1388	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.76	8.44E-05
VS_II0299	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.78	7.44E-04
VS_II0458	-	Hypothetical protein	Unknown function	-3.79	1.02E-05
VS_II0859	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.79	1.07E-04
VS_0624	-	Putative metal-dependent hydrolase	Unknown function	-3.87	1.49E-05
VS_1984	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.87	8.72E-05
VS_II1530	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.89	4.17E-05
VS_2131	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.91	3.95E-03
VS_II1422	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-3.91	3.10E-04
VS_II0273	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.94	1.62E-04
VS_0110	-	hypothetical protein	Unknown function	-3.99	6.92E-04
VS_II1392	-	Transcriptional regulator	Unknown function	-3.99	2.11E-05
VS_II0936	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.02	1.86E-05
VS_2851	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.06	1.33E-05
VS_II0199	-	Putative outer membrane lipoprotein	Unknown function	-4.06	3.51E-05
VS_II0893	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.06	9.90E-05
VS_II1208	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.06	1.90E-05
VS_1386	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.12	1.94E-05
VS_1526	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.13	1.11E-05
VS_1919	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.13	1.33E-05
VS_II1251	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.17	7.95E-06
VS_II1147	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.19	6.87E-05
VS_2278	-	Putative sugar nucleotide epimerase	Unknown function	-4.23	1.08E-05
VS_II0876	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.24	1.08E-03
VS_II0102	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.28	2.03E-05
VS_II0459	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.28	3.78E-06
VS_0491	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.3	1.39E-05
VS_0719	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.33	3.62E-06
VS_2110	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.33	1.10E-05
VS_0686	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.4	9.10E-03
VS_II1193	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.4	1.39E-05
VS_II0444	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.45	6.01E-06
VS_II1140	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-4.46	2.05E-06
VS_1301	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.47	1.67E-06
VS_II0259	-	Transcriptional regulators, LysR family protein	Unknown function	-4.49	2.80E-06
VS_II0892	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.49	1.22E-05
VS_II1210	-	Putative prolyl 4-hydroxylase alpha subunit homologue	Unknown function	-4.51	2.04E-03
VS_1801	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.54	1.66E-06
VS_II0851	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.56	6.16E-06
VS_1514	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.58	4.49E-06
VS_II0852	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.59	6.46E-06
VS_II0031	-	Predicted membrane-associated, metal-dependent hydrolase	Unknown function	-4.63	1.35E-06
VS_II1079	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.63	5.49E-05
VS_II0349	-	putative orphan protein	Unknown function	-4.66	3.36E-02
VS_1515	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.68	5.25E-06
VS_II0854	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.72	6.76E-07
VS_2209	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-4.74	1.16E-05
VS_2908	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.74	1.84E-06
VS_0965	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.77	6.15E-06
VS_2139	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.85	2.09E-06
VS_2431	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.88	2.87E-06
VS_2448	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-4.88	8.40E-07
VS_II0370	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.91	1.02E-05

VS_II0582	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.96	5.61E-06
VS_2194	-	hypothetical protein	Unknown function	-4.97	6.59E-07
VS_II0530	-	Hypothetical protein	Unknown function	-4.97	1.17E-06
VS_II0890	-	Putative transduction protein	Unknown function	-4.97	5.26E-07
VS_1513	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.07	6.91E-08
VS_II0889	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.11	7.27E-07
VS_1143	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.16	7.99E-07
VS_0349	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.2	4.67E-08
VS_1139	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.24	3.59E-07
VS_1134	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.28	4.04E-07
VS_II1162	-	conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.28	2.70E-07
VS_II0879	-	Putative arylsulfatase	Unknown function	-5.35	1.62E-06
VS_II0369	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.37	8.63E-07
VS_1916	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.41	1.36E-07
VS_2433	-	hypothetical protein; putative membrane protein	Unknown function	-5.43	2.42E-07
VS_II0347	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.43	2.81E-07
VS_0481	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.49	3.15E-07
VS_0662	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.5	1.66E-07
VS_II0866	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.51	1.46E-07
VS_1844	-	Putative outer membrane protein	Unknown function	-5.53	1.48E-07
VS_0791	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.54	7.51E-09
VS_1520	-	Outer membrane protein	Unknown function	-5.63	1.86E-07
VS_1896	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.64	2.91E-08
VS_1843	-	Outer membrane protein	Unknown function	-5.69	1.42E-07
VS_1973	-	hypothetical membrane protein	Unknown function	-5.69	1.33E-08
VS_II0350	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.7	2.08E-08
VS_1046	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.75	1.73E-07
VS_II0865	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.77	2.65E-08
VS_0575	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.78	4.92E-08
VS_2434	-	TPR-repeat-containing protein	Unknown function	-5.78	1.22E-08
VS_1045	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.82	1.37E-07
VS_2132	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.82	1.59E-07
VS_II0416	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-5.85	8.43E-08
VS_II0857	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.85	2.22E-07
VS_2724	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.88	1.80E-07
VS_0298	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.91	4.50E-08
VS_0521	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.92	2.28E-08
VS_1166	-	hypothetical protein	Unknown function	-5.92	1.80E-08
VS_0502	-	Hypothetical protein	Unknown function	-5.98	1.54E-08
VS_II0636	-	putative orphan protein	Unknown function	-6.1	5.04E-04
VS_II0869	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-6.1	2.85E-08
VS_0959	-	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	Unknown function	-6.19	2.62E-09
VS_2108	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.26	2.37E-07
VS_1672	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.32	3.32E-11
VS_2439	-	hypothetical protein	Unknown function	-6.51	2.22E-10
VS_II1410	-	Hypothetical protein	Unknown function	-6.68	3.74E-09
VS_II0667	-	Conserved hypothetical protein	Unknown function	-6.73	2.36E-09
VS_1790	-	Conserved protein of unknown function	Unknown function	-6.88	5.36E-13
VS_II1094	-	Hypothetical protein	Unknown function	-7.11	3.39E-07
VS_1418	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.21	1.82E-10
VS_2440	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.26	1.93E-11
VS_2441	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.37	5.82E-11
VS_2442	-	hypothetical protein	Unknown function	-7.62	5.12E-12

**Table S2. Strains, plasmids and oligonucleotides.**

Description/sequence	Reference	
<b>Bacterial strain</b>		
LGP32	<i>V. tasmaniensis</i> (Splendidus clade)	(Gay et al., 2004)
LMG20 012 <sup>T</sup>	<i>V. tasmaniensis</i>	(Thompson et al., 2003)
$\Delta copA$	LGP32 $\Delta copA$ (VS_0768, cation transport ATPase)	This study
$\Delta cusAB$	LGP32 $\Delta cusAB$ (VS_II0515/0516, cation efflux system protein)	This study
$\Delta sod$	LGP32 $\Delta sod$ (VS_2918, superoxyde dismutase)	This study
$\Delta ahpC$	LGP32 $\Delta ahpC$ (VS_2126, alkyl hydroperoxide reductase subunit C)	This study
$\pi 3813$	<i>E. coli</i> , <i>lacIQ</i> , <i>thi1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA462</i> <i>zei298::Tn10</i> [Tc <sup>R</sup> ] $\Delta thya::(erm-pir116)$ [Erm <sup>r</sup> ]	(Le Roux et al.2007)
$\beta 3914$	<i>E. coli</i> (F <sup>-</sup> ) <i>RP4-2-Tc::Mu <math>\Delta dapA::(erm-pir)</math> [Km<sup>R</sup> Em<sup>R</sup>]</i> <i>zei298::Tn10</i>	(Le Roux et al.2007)
$\beta 2163$	<i>E. coli</i> (F <sup>-</sup> ) <i>RP4-2-Tc::Mu <math>\Delta dapA::(erm-pir)</math> [Km<sup>R</sup> Em<sup>R</sup>]</i>	(Demarre et al., 2005)
<b>Plasmids</b>		
pSW7848	<i>oriV</i> <sub>R6Kv</sub> ; <i>oriT</i> <sub>RP4</sub> ; <i>araC-P</i> <sub>BAD</sub> <i>ccdB</i>	(Le Roux et al.2007)
pMRB-HC <i>gfp</i>	<i>oriV</i> <sub>R6Kv</sub> ; <i>oriT</i> <sub>RP4</sub> ; <i>oriV</i> <sub>MRB</sub> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB</i> resistant, [Cm <sup>R</sup> ], <i>high copy</i>	(Le Roux et al.2011)
pMRB-LC <i>gfp</i>	<i>oriV</i> <sub>R6Kv</sub> ; <i>oriT</i> <sub>RP4</sub> ; <i>oriV</i> <sub>MRB</sub> ; <i>auxotroph dap</i> ; <i>pir+</i> ; <i>ccdB</i> resistant, [Cm <sup>R</sup> ], <i>low copy</i>	(Le Roux et al.2011)
<b>Oligonucleotides</b>		
<b>Mutagenesis</b>		
$\Delta VS-0768$		
CopA-1	5'-GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCATGTCAAATGCTCTAAAACGACAAATTC-3'	This study
CopA-2	5'-GTCGATACCGACGTTTTTACAGCTCGGATTCTGAAAGCAG-3'	This study
CopA-3	5'-CTGCTTTCAGAATCCGAGCTGTAAAAACGTCGGTATCGAC-3'	This study
CopA-4	5'-CCCCGGGCTGCAGGAATTCACGAATCATGGTTAACCTCATG-3'	This study
$\Delta VS-II0515/0516$		
CusAB-1	5'-GCCCGAATCCCGTCAAGCCAATAACATGG-3'	This study
CusAB-2	5'-GTAAGGGCTAATAATCAATACGTGTCTATTCCCTTATTGATTGG-3'	This study
CusAB-3	5'-CCAATCAATAAGGGAATAGACACGTATTGATTATTAGCCCTTAC-3'	This study
CusAB-4	5'-TGCTCTAACTGCTCTGAAGC-3'	This study
$\Delta VS_2918$		
SodA-1	5'-GCCCGAATCTTTGAAGCTGAACAGATGGG-3'	This study
SodA-2	5'-GAGTACAGTTCACCACCATTGGCGGTAAATCCTCCTTAATTAGAGG-3'	This study
SodA-3	5'-CCTCTAATTAAGGAGGATTTACCGCCAATGGTGGTGAAGTGTACTC-3'	This study
SodA-4	5'-GCCCGAATCCGCGTTAGATAGGTTGAGGC-3'	This study
$\Delta VS_2126$		
AhpC-1	3'-GTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGAGTATATGGAGATACGACG-3'	This study
AhpC-2	5'-GAGTACAGTTCACCACCATTGGCGGTAAATCCTCCTTAATTAGAGG-3'	This study
AhpC-3	5'-CCTCTAATTAAGGAGGATTTACCGCCAATGGTGGTGAAGTGTACTC-3'	This study
AhpC-4	5'-CCCCGGGCTGCAGGAATTCGCTGCTGCGTTATCATCTCG-3'	This study
pSW-R	5'-GAATTCGATATCAAGCTTATCGATAC-3'	This study
pSW-F	5'-GAATTCCTGCAGCCCGGGG-3'	This study
<b>Complementation</b>		
<b>Gibson method</b>		
pMRB-F	5'-CTCGAGCTGCAGACGCGTCG-3'	This study
pMRB-R	5'-GGGCCCTTCCTTTGTTATCCGCTCAC-3'	This study
Sod-F	5'-CGCGTCTGCAGCTCGAGTTACGCTTTATTTCGCGAGTG	This study
Sod-R	5'-GTGAGCGGATAACAAAGGAAGGCCCATGTCACACTCTTTTCCTGC-3'	This study
CusAB-F	5'-CGCGTCTGCAGCTCGAGTTATTTGTTGTCTCGTTTTGGC-3'	This study
CusAB-R	5'-GTGAGCGGATAACAAAGGAAGGCCCATGAGTTTCAGTAAAAGTAGCAAC-3'	This study
<b>Restriction method</b>		
CopA-F	5'-GGGCCCATGTCAAATGCTCTAAAACGACAAATTC-3'	This study
CopA-R	5'-CTCGAGTTACGAATCATGGTTAACCTCATG-3'	This study
<b>PCR/Sequencing</b>		
VS_0768F	5'-GAATAGCCAAGAGTAAAGTGC-3'	This study
VS_0768R	5'-CGTAACCGTGCATCTCTGC-3'	This study
VS_II0515F	5'-CGGCTAAATCTCAAAAAGACAC-3'	This study
VS_II0516R	5'-AATGGTCCATCTTTCCATCC-3'	This study
VS_2918F	5'-AGTGCATTGTCACACAGC-3'	This study
VS_2918R	5'-AGCAAAGATGCGGAAGTCAC-3'	This study
VS_2126F1	5'-AGATACGCACGCCAATAGAGT-3'	This study
VS_2126R1	5'-CATCCAGGCTAAGGACTAACT-3'	This study

**Table S3. Oligonucleotides for qPCR**

Primers	Sequence	Description
0886-VSII1062-F1	5'-TCTCATTTCGATCCGGGTTTG-3'	PrtV/inhA (M6 metalloprotease)
0887-VSII1062-R1	5'-ATTGCATTCTGGTCGGCATC-3'	
0890-VS0768-F1	5'-AGACATTGGCGCGGACTTTA-3'	copA (Cation transport ATPase)
0891-VS0768-R1	5'-ACGCGTCTGAAATGCCAAAT-3'	
0896-Vsr242-F1	5'-ACGAACCGCAAGGAGAAGTG-3'	sRNA (IGR VS_II0566-VS_II0567)
0897-Vsr242-R1	5'-TCAGTACGCCTCACCCCTCGT-3'	
0900-VS0852-F1	5'-ATTGCCGCCTTTATCGGTTT-3'	CcmC (Cytochrome c-type biogenesis protein)
0901-VS0852-R1	5'-CAAGCACCCACATTGGTTT-3'	
0902-VS2913-F1	5'-GCCGCTACTGTGGTGACCTT-3'	6PKF (6-phosphofruktokinase)
0903-VS2913-R1	5'-TGCTTCTTGCCTTTTCGCAAT-3'	
0912-VS0220-F1	5'-TGGGGGTGCGCTTTACATGAG-3'	O-antigen polymerase Wzy
0913-VS0220-R1	5'-AAGGCTCTCAAACCTGTCAATGTT-3'	
0914-VS2591-F1	5'-ATTCCGCTTTCGTGACCTT-3'	MalC (Maltose permease)
0915-VS2591-R1	5'-TTTTGCGGTGAAAGGGTCTG-3'	
0916-VS2260-F1	5'-TTCCTGAGTGGCTGGCTTTC-3'	PTS system N-acetyl glucosamine
0917-VS2260-R1	5'-AACACCAGGCCAAACCACAC-3'	
0918-VSII1414-F1	5'-CTTCTACGGCGGTTGGAACA-3'	Chitinase
0919-VSII1414-R1	5'-GCAATTGGATGCCGTTGTCT-3'	
0920-VS2446-F1	5'-TGGGTCGGTGTATTCTTTTG-3'	CpaA (pilin prepeptidase)
0921-VS2446-R1	5'-TTGTCCCCACCCCAAATACA-3'	
0922-VS1460-F1	5'-CGTCCTTTCGCTCTGAAACT-3'	CytC (cytochrome C oxydase)
0923-VS1460-R1	5'-GAACACGGTGCCACTCATCA-3'	
0924-VS0696-F1	5'-CGGTCTTGTTACGGTTTCG-3'	NADH quinone reductase
0925-VS0696-R1	5'-ACCAACCACCGTTGCTCACT-3'	
0926-VS2382-F1	5'-CCGCAAGCTACACATCACGA-3'	MetN (methionine transport)
0927-VS2382-R1	5'-ATGTCGCCAACTGTGCCTT-3'	
0928-VSII0148-F1	5'-GCGCTTCAACAAATACCCAT-3'	Catalase
0929-VSII0148-R1	5'-CGATCACTTGTGCCGCTTCT-3'	
0930-VS2126-F1	5'-TCTCACAAGCATGGCACGA-3'	AhpC (alkyl hyperoxide reductase subunit C)
0931-VS2126-R1	5'-CCGATGCCTTCAGCTGTGAT-3'	
0932-VS2918-F1	5'-TTCAGGCTTGTGTTGGTGG-3'	SOD (superoxide dismutase)
0933-VS2918-R1	5'-GCGACGGTTTTGGTAGCTGA-3'	
0934-VS3101-F1	5'-TGAAACTGCACCCTCCACT-3'	CueO (copper oxydase)
0935-VS3101-R1	5'-GGGCGTTTCCCATTTTCTTT-3'	
0936-VSII0514-F1	5'-GACGAAGACCCGATGACCAA-3'	CusC ( cation efflux system protein)
0937-VSII0514-R1	5'-TGCGTCATGCTATTTCGCAAC-3'	
0938-VS1124-F1	5'-TTGTGCGTGTGTTGCTTGC-3'	ViuD (ABC transporter; Iron-siderophore uptake, Vibriobactin)
0939-VS1124-R1	5'-GCCGGGATCAAGACATCGTA-3'	
0940-VSII1133-F1	5'-CGCCTTGATGCAACGCTATT-3'	PvsE (Vibrioferrin biosynthesis protein)
0941-VSII1133-R1	5'-TCGCAAAACTCCATCCAAGG-3'	
0942-VSII0149-F1	5'-CACCGTGCTTCTCTGGTGGT-3'	Phospholipase
0943-VSII0149-R1	5'-TCTGCGGCTTCATTTCGGTAG-3'	
0944-VSII0510-F1	5'-TTTCATTTCGAGCCGCATACC-3'	RTX toxin VCBS repeat transporter
0945-VSII0510-R1	5'-ACGCTTTCCTCCACCATTT-3'	
0946-VSII0512-F1	5'-TCGGGTTCTTGATGGGTCTG-3'	RTX toxin VCBS repat
0947-VSII0512-R1	5'-ATCACACCCTGCTCCACCAC-3'	
0948-VSII0870-F1	5'-TGTGGTATTTGCACCGCGTA-3'	Alkaline phosphatase
0949-VSII0870-R1	5'-TATGGCGTGACTGGACGTGA-3'	
0950-VSII0905-F1	5'-ATGGAATCGTGAACGCACAA-3'	Endoribonuclease
0951-VSII0905-R1	5'-CAATTGGAATCTGCGCTGTG-3'	
0952-VSII0853-F1	5'-ACCGTTCGCTTACCTGCTCA-3'	RpoQ (RpoS-like sigma factor)
0953-VSII0853-R1	5'-AAAACCGCTTAACGCAACCA-3'	
0954-VSII0659-F1	5'-GGGATTCAAGGGCCTGTTTT-3'	AOX (arsenite oxydase)
0955-VSII0659-R1	5'-GCAGCCCTTATCGACCAGA-3'	
0956-VSII1055-F1	5'-CTTTATGCAACGGCACGAC-3'	MGS (methyl glyoxal synthase)
0957-VSII1055-R1	5'-GGTCGTGTGGTACGGCATTTA-3'	
0958-VS0882-F1	5'-TGACTCGTACAACCCAGCA-3'	minD
0959-VS0882-R1	5'-CCTTGTTCGACGCGTTCAGT-3'	
0960-Vsr217-F2	5'-GCGTTGACGCATTGTTTCTTT-3'	sRNA (IGR VS_II0219-VS_II0220)
0961-Vsr217-R2	5'-TTTCCCCACATCCAGCTAA-3'	

## Principaux résultats

Ce travail nous a permis de mieux appréhender la dynamique de l'interaction *V. tasmaniensis* LGP32 / hémocyte. Notamment, nous avons montré que LGP32 exerce **un effet cytotoxique** (visualisé ici par la perméabilité des membranes hémocytaires au Sytox Green) pour les hémocytes qui est **dépendant de l'internalisation par les hémocytes**. Cette perméabilisation accroit de manière très importante 5-7 heures après phagocytose, à un moment où LGP32 induit un décollement des hémocytes ayant phagocytés les vibrios et une libération massive des bactéries dans l'espace extrahémocytaire. Ceci montre que l'entrée dans les hémocytes est un élément essentiel à la cytotoxicité de LGP32. Cela suggère également que l'entrée puis la libération des LGP32 des hémocytes participe à leur prolifération et leur dissémination dans les tissus de l'huître.

En accord avec l'hypothèse d'une répllication intracellulaire de LGP32 que semble indiquer l'augmentation de la fluorescence des vibrios dans les premières heures qui suivent la phagocytose (avant lyse hémocytaire), le RNAseq a révélé une forte activation du métabolisme de LGP32 dans la condition intracellulaire. L'analyse RNAseq du transcriptome intracellulaire de LGP32 a également mis en évidence l'induction massive de certaines fonctions liées en particulier à l'homéostasie des métaux et à la réponse anti-oxydante, des fonctions susceptibles d'être impliquées dans la survie intraphagosomale. Elle révèle aussi la surexpression de métalloprotéases et de phospholipases susceptibles d'être des facteurs de virulence potentiels.

Parmi les gènes surexprimés, ont été identifiés une superoxyde dismutase à manganèse (VS\_2918), une catalase (VS\_II0148) et les sous-unités C et F d'une alkyl hydroperoxide reductase (VS\_2126 et VS\_2127) pouvant être impliquées dans la réponse anti-oxydante. Nous avons aussi retrouvé une pompe à efflux de cuivre CusCBAF (VS\_II0514 à VS\_II0517) et une cation-transport ATPase copA (VS\_0768) pouvant être impliquées dans la survie intraphagosomale. Nous avons pu montrer par qPCR que les gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante, *ahpC* (VS\_2126), *catalase* (VS\_II0148) et *sodA* (VS\_2918), étaient surexprimés spécifiquement en condition intracellulaire. En revanche, les gènes impliqués dans l'efflux de cuivre, *copA* (VS\_0768) et *cusC* (VS\_II0514) sont surexprimés dès le contact des vibrios avec le plasma d'huître qui est un compartiment très riche en cuivre.

La génomique fonctionnelle a permis de montrer que les mutants  $\Delta copA$  et  $\Delta cusAB$  étaient plus sensibles au cuivre que la souche sauvage et que les mutations de *copA*, *cusAB* et *sod*

entraînaient une diminution de la survie intracellulaire et de la cytotoxicité envers les hémocytes. De manière attendue, la complémentation plasmidique de chaque mutant restaure les phénotypes de survie et de cytotoxicité. Nous avons également démontré que *copA* et *cusAB* étaient nécessaires à la virulence en infections expérimentales chez l'huître.

Ainsi, cet article met en évidence pour la première fois chez un *Vibrio* le rôle essentiel de l'efflux du cuivre et de la réponse anti-oxydante dans la survie intracellulaire. Nous montrons aussi que ces deux fonctions qui contribuent à la survie au sein de l'hémocyte sont nécessaires à l'expression du phénotype de cytotoxicité. Parce que diverses espèces de vibrios comme *V. parahaemolyticus* et *V. shiloi* (Rosenberg and Falkovitz, 2004; de Souza Santos and Orth, 2014) adoptent des stades intracellulaires essentiels à leur processus infectieux, les mécanismes de survie intracellulaire identifiés chez *V. tasmaniensis* LGP32 pourraient également contribuer à la survie de ces autres espèces qui possèdent également ces gènes très conservés chez les bactéries à Gram négatif.

## Données supplémentaires

Les mutants des gènes codant pour les antioxydants (*sod*, *ahpC*) et les efflux du cuivre (*copA*, *cusAB*) ont été délétés du codon ATG au codon STOP. Les PCR de vérification de la délétion des gènes ont été réalisées sur les mutants à l'aide d'amorces oligonucléotidiques externes à la séquence codante des gènes (Tableau 1).

Gènes	Primers	Taille attendu (pb)		Différence (pb)
		WT	mutant	
VS_0768 <i>copA</i>	Sens 5'-GAATAGCCAAGAGTAAAGTGC-3' Antisens 5'-CGTAACCGTCGATCTCTGC-3'	3422	1947	1475
VS_II0515/16 <i>cusAB</i>	Sens 5'-CGGCTAAATCTCAAAAAGACAC-3' Antisens 5'-AATGGTCCATCTTTCCATCC-3'	5498	648	4850
V_2918 <i>sod</i>	Sens 5'-AGTGCGATTCGTCAACACAGC-3' Antisens 5'-AGCAAAGATGCGGAAGTCAC-3'	1113	496	617
VS_2126 <i>ahpC</i>	Sens 5'AGATACGCACGCCAATAGAGT 3' Antisens 5'CATCCAGGCTAAGGACTAACT 3'	1136	578	558

Tableau 1. Amorces utilisées pour le séquençage des souches mutantes

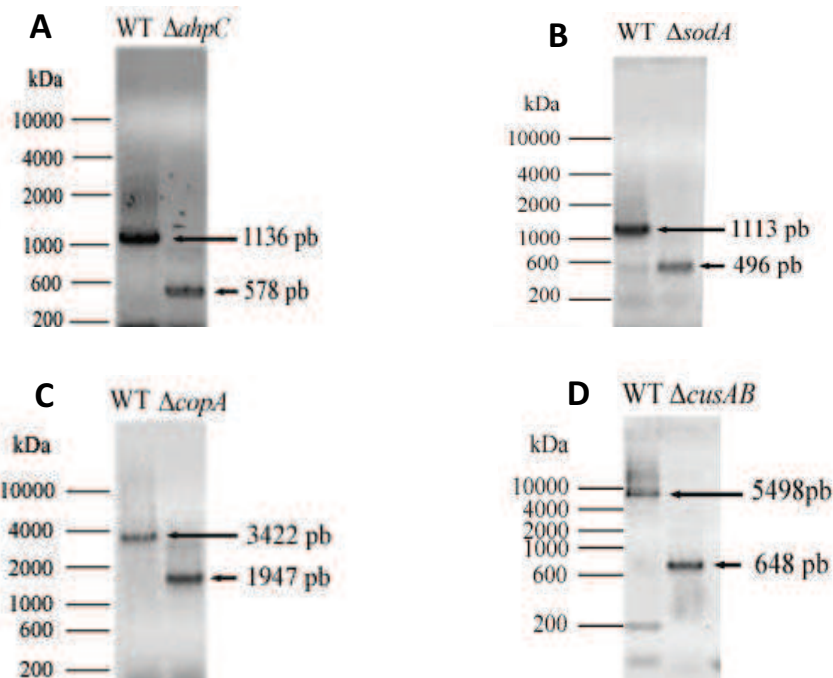


Figure 30. Contrôle des délétions par PCR.

Amplification PCR des régions délétées pour les mutants (A)  $\Delta$ *ahpC* (VS\_2126), (B)  $\Delta$ *sodA* (VS\_2918), (C)  $\Delta$ *copA* (VS\_0768) et  $\Delta$ *cusAB* (VS\_II0515/VS\_II0516). L'ADN extrait à partir de la souche WT et des mutants a été amplifié en utilisant les amorces listées dans le Tableau 1. Le poids moléculaire est représenté sur la gauche.

Comme attendu, la migration sur gel d'agarose des produits de PCR a montré que la taille de les amplicons des gènes délétés était inférieure à ceux de la souche sauvage (Figure 30). Ces produits d'amplification ont ensuite été séquencés par la Plateforme de Génomique Environnementale (PGE/Labex), ce qui a permis de confirmer la délétion ATG-Stop des gènes ciblés (Figure 31).

A

WT LGP32	<u>CCATGATGCC</u>	<u>TAGGTGATTC</u>	ATTTTCATAA	CTTGCTCCAA	ATTGGTTTTA	AATTCTGTGC	TTTTGGAAGT	CTAGCTTCGA	TGTTTCGTTT	CGATGAAGAG	100
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
WT LGP32	AGTATATGGA	GATAAGCAAG	TTAAATGAAA	TTATCATAAI	TTATATTAAT	GATAATATTT	TGTTATTIAC	AGTTTGGTAT	ARCAACTCAA	CTCACGTATA	200
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
WT LGP32	GACACCATAT	CTACCOCTIAC	CTACATAGAC	ACATAGATAAC	GCAAGCCAAI	AGAGATAAGC	CCAATAGAGA	GAACAACCTA	AAGAGCATAG	CTACTCAAAT	300
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----AAT	AGAGATAAGC	CGAATAGAGA	GAACAACCTA	AAGAGCATAG	CTACTCAAAT	53
WT LGP32	TGAGGGTTGC	TGATGTTTGA	TGGCTTTTGT	TAATCATTTT	T-STCGATAG	CTTTTTCCGA	TAGCTTTCTT	CTATCAAAGA	TAGGATTTGC	CTATTGAAIC	399
delta ahpC	TGAGGGTTGC	TGATGTTTGA	TGGCTTTTGT	TAATCATTTT	TTGTCGATAG	CTTTTTCCGA	TAGCTTTCTT	CTATCAAAGA	TAGGATTTGC	CTATTGAAIC	153
WT LGP32	TATAGAAATG	TCCGATTTCA	CTAATTTCCG	GTGCGAATGC	AATATAGCTC	CATCGACGCG	GGATAGCGTT	AAACACTACA	AATTAGAARG	AGAGTCGAAT	499
delta ahpC	TATAGAAATG	TCCGATTTCA	CTAATTTCCG	GTGCGAATGC	AATATAGCTC	CATCGACGCG	GGATAGCGTT	AAACAC----	-----	-----	229
WT LGP32	<u>CATGATCAAC</u>	ACAGAAATCA	AACCATTCAA	CGCAACAGCA	TTCAAAAAG	GCGAATTOGT	AGAAATCACT	GAGCAAGACG	TTAAAGGCAA	GTGGCTGTGA	599
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	TTCITCTTCT	ACCCAGCAGA	CTTCAAGTTT	GTATGTCCAA	CTGAGCTAGT	TGACCTACAA	GACAAATACG	CAGAGCTTCA	ATCTGCGGCG	GTAGAAGTTT	699
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	TCTCCGTATC	AACAGACAG	CACCTTCTCT	ACAAAGCATG	GCAAGATACT	TCTGACAAAA	TGGCCACTAT	CGAATACTTC	ATGGTCGGCG	ACCAACACGG	799
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	CAACATCACA	AACAACCTCA	ACGTTATGCG	TGAAGSTCAA	GCCCTTGACG	ACCGTGCAAC	GTTCCTAATC	GAACCTGAAG	GCGTTATCCA	AGCAATGGAA	899
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	ATCACAGCTG	AAGGCATCGG	CGGTGAAGCT	GAAGAOCCTAC	TACGCAAGGT	TAAGACAGCA	CAATACGTAG	CCGCTAACCC	AGGTGAAGTT	TGCCAGCTGA	999
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	AATGGAAAGA	AGGCGAAGAG	ACTCTAGCGC	CATCTCTAGA	CCTAGTAGGC	AAGATTGGAT	CTAAGCCTAG	CTAAACAAGA	ATAGCCAAGA	AAGAAGAGT	1099
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	229
WT LGP32	AAAAACAGACC	AGTTAAACGG	TTCTACAGGC	GCGCTTCGCG	CCCCCTCCTA	AAGGGCAGTC	GCGGCCCAAC	CTTTCAAAAC	ATCAACACCA	CAATATTTGC	1199
delta ahpC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	318
WT LGP32	CGACTTGCBC	CCACTTTTTA	TTTTCCTTTT	TCAGCAAGAA	GSTATTGGTC	AATACCAAGA	CACCGAATTT	AAGAGCAGGC	ACGATTATGT	TGATCAAGC	1299
delta ahpC	CGACTTGCBC	CCACTTTTTA	TTTTCCTTTT	TCAGCAAGAA	GSTATTGGTC	AATACCAAGA	CACCGAATTT	AAGAGCAGGC	ACGATTATGT	TGATCAAGC	418
WT LGP32	AATGAAGCAG	CAGCTAAAAG	CATACCTAGA	AAACCTAAAA	ACCAATGTTT	AGTTAGTCTT	TAGCTTGGAT	G 1370			
delta ahpC	AATGAAGCAG	CAGCTAAAAG	CATACCTAGA	AAACCTAAAA	ACCAATGTTT	AGTT-----	-----	-----	-----	-----	472



B

WT LGP32	<u>AGTGGGATTC</u>	<u>GTCAACACAG</u>	<u>CGGAACCATC</u>	ACTGCAAGCC	GTAGCCAGCT	CGTGGGATTA	CAACTCAAAA	TCACCCTGCC	TATCCTGCCA	GTGTAATACC	100
delta sod	-----	-----ACAG	CGGAACCATC	ACTGCAAGCC	GTAGCCAGCT	CGTGGGATTA	CAACTCAAAA	TCACCCTGCC	TATCCTGCCA	GTGTAATACC	84
WT LGP32	CCTACAAAGA	TCACAGTTGA	TAATGATTTT	CATTATCATT	ATGGAAGTC	CTCTAATTA	GGAGGATTTA	<u>CGATGTCACA</u>	CTCTTTTCT	GCTCTACCOCT	200
delta sod	CCTACAAAGA	TCACAGTTGA	TAATGATTTT	CATTATCATT	ATGGAAGTC	CTCTAATTA	GGAGGATTTA	CCG-----	-----	-----	157
WT LGP32	ACGCCTAAGA	CGCCCTAGAA	CCTTACATTG	ACGCTAAGAC	GATGGAAGTG	CACTACAGCA	AGCACCATAG	AACCTACTAC	GATAAGTTTG	TTGCGCGGAT	300
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
WT LGP32	TTCTGGCAGT	GAACTTGAGC	AGCAATCTCT	GACOGAGATC	TTGCTAACA	TCTCTCAGCA	CAGCCCTGCC	GTTCGCAACA	ATGGCGCGG	TTACTACAAC	400
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
WT LGP32	CATATTTTAT	ATTGGAACGT	CATGGCTCAA	GATGGCGGG	GTGAACCAGC	AGGTAAACTT	GGCGACGCGA	TCCAAAGTAC	TTTCGGAGAT	TTGAGAGCGT	500
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
WT LGP32	TCCAAGATCA	GTTCGCTCAA	CGCGCAATCA	ATACCTTCGG	TTCAGGCTTT	GCTTGGTTGG	TAGTAGAAGA	AGGACAACCTG	AAAATCATCT	CGACCTCAAA	600
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
WT LGP32	CCAAGACAAC	COGTGGATGG	ATACCATCGC	CAGCAACGGT	GAGCCGATTC	TTGCACTGGA	TGTCTGGGAA	CAGCCCTACT	ACATCAGCTA	CCAAAACCGT	700
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	157
WT LGP32	CGCCCTGATT	ACATCAATGC	ATGGTGGAAC	GTGGTGAATT	GGAATCGCGT	TTCTGAAAAC	TACGCACAAG	CACTCGCGAA	TAAAGCCTAA	GCCAATGGTG	800
delta sod	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	166
WT LGP32	GTGAACGTGA	CTCACTCAGC	TTGCCACCGT	ATACTCTGCG	TATCTTTGAT	TATCTTTGTC	AACCAACATG	TTTGATATCG	CTCTATACGA	ACCTGAAATT	900
delta sod	GTGAACGTGA	CTCACTCAGC	TTGCCACCGT	ATACTCTGCG	TATCTTTGAT	TATCTTTGTC	AACCAACATG	TTTGATATCG	CTCTATACGA	ACCTGAAATT	266
WT LGP32	GCGCCAATA	CGGGTAACAT	CATCCGCTTA	TGTGCTAAT	CGCGCGCAAA	CCTGCACCTG	ATTGAGCCCG	TTGGCTTTGA	TTTTGAAGAG	AAGAAAGTTC	1000
delta sod	GCGCCAATA	CGGGTAACAT	CATCCGCTTA	TGTGCTAAT	CGCGCGCAAA	CCTGCACCTG	ATTGAGCCCG	TTGGCTTTGA	TTTTGAAGAG	AAGAAAGTTC	366
WT LGP32	GTGCTGCTGG	CTTGGATTAC	CACGACCTAG	CGCGTGTAA	CGCTCACAAG	AACCTAGAAG	CCTTTCTTGA	GTATCTAGAG	AATGAACCGG	AGGGTGCATT	1100
delta sod	GTGCTGCTGG	CTTGGATTAC	CACGACCTAG	CGCGTGTAA	CGCTCACAAG	AACCTAGAAG	CCTTTCTTGA	GTATCTAGAG	AATGAACCGG	AGGGTGCATT	465
WT LGP32	<u>CCGCATCTTT</u>	<u>GCT</u>	1113								
delta sod	-----	---	465								

C

WT LGP32	<u>GAATAGCCAA</u>	<u>GAGTAAAGTG</u>	<u>CAGTACGTGC</u>	ACCACCAACG	TGAAGATAGC	CAGTTGGGCT	AGGAGCAAAA	CGAGTTTTAA	COGTCATTTA	AATACTTGA	100
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----GGGCT	AGGAGCAAAA	CGAGTTTTAA	COGTCATTTA	AATACTTGA	44
WT LGP32	TTATGTAGGT	GATTCITTTA	GTGATTGCCA	TTACAAAGCC	TGCAACAGAA	AAATATCACT	AAATTTTGGG	CGCTATTTTA	TCACCACCGC	TTAAATCTAC	200
delta copA	TTATGTAGGT	GATTCITTTA	GTGATTGCCA	TTACAAAGCC	TGCAACAGAA	AAATATCACT	AAATTTTGGG	CGCTATTTTA	TCACCACCGC	TTAAATCTAC	144
WT LGP32	AATCAGTAGT	GAATGATTAA	TGCGCTGATC	TTGTACGAAA	GCTATCGTAG	AAGGAGCAAA	CCAATAGCTC	AAGCACATGT	CAAAATGCTC	AAAACGACAA	300
delta copA	AATCAGTAGT	GAATGATTAA	TGCGCTGATC	TTGTACGAAA	GCTATCGTAG	AAGGAGCAAA	CCAATAGCTC	AAGCACATGT	CAAAATGCTC	AAAACGACAA	244
WT LGP32	ATTCCTGCCA	CGCTCGCGAT	AAAACCTATC	TATTCATCA	CTCAATATTC	CAGCAAATAT	CAAATTCCTG	AAITTTATGT	TGACCTTACC	CTTACGGGAA	400
delta copA	ATTCCTGCCA	CGCTCGCGAT	AAAACCTATC	TATTCATCA	CTCAATATTC	CAGCAAATAT	CAAATTCCTG	AAITTTATGT	TGACCTTACC	CTTACGGGAA	344
WT LGP32	GGTTTTATGT	AGGGCTAGAT	GAAAATTGGA	GTATCGATAT	GAACCAATTAC	ACAGCTGTGC	TCAACGGGCT	AAATTCATG	GGGTGTGCTA	AGAAGTTCGG	500
delta copA	GGTTTTATGT	AGGGCTAGAT	GAAAATTGGA	GTATCGATAT	GAACCAATTAC	ACAGCTGTGC	TCAACGGGCT	AAATTCATG	GGGTGTGCTA	AGAAGTTCGG	444
WT LGP32	CACATTGTTT	GACGATCTCG	ATAATACGAC	GATCAACGAC	ATATCGCGGA	CCTACATCGA	TATTTCTACT	CCTTTTATGT	ACGTTCAACT	CAACCAACAG	600
delta copA	CACATTGTTT	GACGATCTCG	ATAATACGAC	GATCAACGAC	ATATCGCGGA	CCTACATCGA	TATTTCTACT	CCTTTTATGT	ACGTTCAACT	CAACCAACAG	544
WT LGP32	TTAGCGACCC	TTGGTTATTC	CATGGTAAAT	TCGCTGCACC	TTTCGTTATC	CGGTCTTAGC	TGCGGTAAAT	GGGTGAACAA	GCTGACACAA	CGCCTTGAGC	700
delta copA	TTAGCGACCC	TTGGTTATTC	CATGGTAAAT	TCGCTGCACC	TTTCGTTATC	CGGTCTTAGC	TGCGGTAAAT	GGGTGAACAA	GCTGACACAA	CGCCTTGAGC	644
WT LGP32	AGACCGAGCA	AATCTCAGAC	CTAGAAGTCA	GCAAAACATGA	ATTGTCCCTG	GTTACTCTGC	TTTCAGAATC	CGAGCTTATT	GAGCTAATCG	AAAGTGTGGG	800
delta copA	AGACCGAGCA	AATCTCAGAC	CTAGAAGTCA	GCAAAACATGA	ATTGTCCCTG	GTTACTCTGC	TTTCAGAATC	CGAGCTTATT	GAGCTAATCG	AAAGTGTGGG	704
WT LGP32	TTATCAAGCG	GCTCCCTACT	CTGAGSTTAA	TGAGCCCTTA	TCTAATTCAG	AAGAAGATAA	AAAAACAGCG	CCAGTGGAGC	AGACACAAGA	TAAACCTGCT	900
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GCTAGCCAA	ATAACCTATCA	CCTTGTCTCT	GAGGGAATGA	CGTGTGCGAG	TTGTGTTTCT	TGGTAGAGA	AAGCGCTGAA	AAAGAATGAG	TTCTGCGACC	1000
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	AAGCICAGAT	CAACCTCGCT	GAACAGACAG	CCTTGGTCTT	CACATCTGAA	ACACGTGAGC	TCACTGAGAG	CGCGCTAATA	GAGTCGGTGA	AAAACGACAG	1100
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	TTACGGTGCC	GAGTTGGTGG	ATGACGGCGC	AACTCAACAA	CAAAAACAGC	AAGAACAACA	ACTTCGTACC	CAAAAAGCTT	TCCTAAAGAA	TTCAGTAAGC	1200
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GCGCTGCTGA	TCGGTGTCC	ACTGATGGCG	TGGGTCTGT	TGGTGGCAG	CATGACCAAT	GCTACATTTA	ACGACCAATT	GGCTTGGGCG	TTAATAGGTG	1300
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	TGCTGTGTTT	GCTACTGCTT	GCGACCTCAG	GACGAGCTT	CCTTACTAAC	GCTTGGCAAT	CACTGATGCA	CAAGCGTCCA	ACCATGGATA	CCTTGGTCCG	1400
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704

WT LGP32	TC TAGGC ACT	GG GCGCG GGT	GG TTTCTACTC	AATGCTG GTT	GTGCTAATTC	CATCATG GTT	TCCAGAA CCA	TGGCGCATG	TCTATTTTGA	AGCGAGCGCC	1500
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	ATGATTG TTG	GCCTTATATC	TTTGGGT CAC	TACATTGAAG	CCAAAAG CAA	GGCAGGCACC	ACCAAATCTT	TGCAGGC ACT	GATTAATTTA	CAACCTCAAA	1600
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	AAGCGTGGT	TATCGTCGAT	GGTAAAGAAC	AAACCATGCG	CGTGAAGCT	ATTCAAAGTCG	GATGCAAGT	ACGAGTGAAA	CGGGAGAGAA	AAGTCCCTGT	1700
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	CGATGGTGC	GTGGTATCTG	GCGAATCTTA	TATCGATGAG	TGGATGCTGA	CTGGCGAACC	ACTTCCCAAC	GTTAAATCAA	TAAATGATGG	CGTTTCTGCT	1800
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GGTACCATCA	ATGGTGATGG	TAGCTTAGTT	ATTGAAGCGA	CAGGAATGG	TTCAAGCACC	ATGTTGGCTC	GAATCATTCA	GATGGTTGCG	CAAGCACAAA	1900
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GCAGCAAGCC	TGCGATTGCG	AAGCTTGCOC	ACTCTATCTC	TGCGSTTTTC	GTACCAGTTG	TGGTGGCAAT	CGCAGOCATT	GCCGOCCTAG	TTTGGTTTTT	2000
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	TGTTGGACCA	CAACCGAGTG	CAAGTTACAT	GCTCGTGGTA	TCAACCACTG	TACTGATCAT	CGCCGTGCCA	TGTGGCTTGG	GCTTAGCGAC	ACCGCCTCTC	2100
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	ATTACTGTG	CGTGGGCAA	AGCGGCTGAG	TTTGGTGTTC	TGATCAAGGA	TGCGGATGTG	TTGCAATCTG	CAAGCAAAAT	CGATGCTGTC	GTATTTGATA	2200
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	AAACAGGCAC	CCTAACCCAA	GGTAAGCCAA	CGGTCAGCA	GGCCTTTTAT	GGGAGCTTAT	CAGAACAGGA	ACTGCTGGCT	TACGCCATT	CGGTAGAGGT	2300
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	AGGCTCAGAA	CAOCCATTAG	CGAAAGCGGT	TTGCCAATAT	GCTGAGAGCT	TACAAGTTTC	AGCGCTACCC	CACAGOGAAT	TGGAAAACCA	AAGAGGGCTT	2400
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GGAGTACAGG	CAATAATTAG	CGGCAAAAAC	GTTCAAAGTAG	GCTCACTTAA	GTACCTCACC	CAACTCGGCA	TCAATACAGA	CATTGGGCGG	GACTTTTATG	2500
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	AGCTTTGTG	AACCAAGCA	TGGACAACCA	TCTTCGTTGT	AATCGATCAA	AAACTGGGAG	GCATATTTGG	CATTTGAGAC	GCGTAAAAAA	TAGATAGCAA	2600
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	ACAAGCCATT	ACTCAACTAA	AATCGGCGGG	AATTCCACAG	GTACTATTAA	CGGGGCGACAA	CGACTCTGTG	GCTCAAGCAA	TAGGTAAAAA	CGTCGGTATC	2700
delta copA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	704
WT LGP32	GACGAGGTTA	TCTCGGAAGT	ACTACCAGAG	CAGAAAGCTC	AGCATATTGT	TCAGCTTCAA	CAACAATATA	AGAGGGTTGC	CATGGTGGGA	GACGGTATTA	2800
delta copA	-----	---CGGAAGT	ACTACCAGAG	CAGAAAGCTC	AGCATATTGT	TCAGCTTCAA	CAACAATATA	AGAGGGTTGC	CATGGTGGGA	GACGGTATTA	781
WT LGP32	ACGATGCACC	AGCTCTTCT	CAAGGGGATA	TAGGAATGCG	AATGGGTAGC	GGCAGGATG	TGGGATTTGA	AAGTGGGCAA	ATGACACTAC	TCAACTGGTC	2900
delta copA	-----	AGCTCTTCT	CAAGGGGATA	TAGGAATGCG	AATGGGTAGC	GGCAGGATG	TGGGATTTGA	AAGTGGGCAA	ATGACACTAC	TCAACTGGTC	891
WT LGP32	GCCCTTATG	GTCAGTAAAG	CGATAGAGCT	TTCGCAAGCA	ACAGTGAAG	ACATGAAGCA	AAACTCTTTT	GGTGGCTTTA	TCTATAATTC	ACTTGGTATT	3000
delta copA	-----	GTCAGTAAAG	CGATAGAGCT	TTCGCAAGCA	ACAGTGAAG	ACATGAAGCA	AAACTCTTTT	GGTGGCTTTA	TCTATAATTC	ACTTGGTATT	991
WT LGP32	CCAATTGCGG	CTGGTGTGCT	CTATCCATTTC	TTTGGATTTT	TACTTAGCCC	TGTCGTTGCA	GGCGCTGGCA	TGGCGATGTC	ATCAATCACC	GTAGTCAGCA	3100
delta copA	-----	CTGGTGTGCT	CTATCCATTTC	TTTGGATTTT	TACTTAGCCC	TGTCGTTGCA	GGCGCTGGCA	TGGCGATGTC	ATCAATCACC	GTAGTCAGCA	1091
WT LGP32	ATGCCAATAG	ATTAAGACTG	TTCAAAACCA	CTCATTCTAA	TATCAACAAA	AACCATATTC	ATGAGGTTAA	CCATGATTGG	TAAAGTTATG	ACTCTTACTG	3200
delta copA	-----	ATTAAGACTG	TTCAAAACCA	CTCATTCTAA	TATCAACAAA	AACCATATTC	ATGAGGTTAA	CCATGATTGG	TAAAGTTATG	ACTCTTACTG	1191
WT LGP32	CACTCGCTGC	AATCTCAGGA	CAAGCTCTCG	CTACTGATGT	TCTGAACCAT	AAGTCTCCAT	ACTGTGGCTG	CTGCACAGAG	TGGACAGAAC	ACATGCAAGA	3300
delta copA	-----	AATCTCAGGA	CAAGCTCTCG	CTACTGATGT	TCTGAACCAT	AAGTCTCCAT	ACTGTGGCTG	CTGCACAGAG	TGGACAGAAC	ACATGCAAGA	1291
WT LGP32	CGCAGGTTTC	GATGTCACAG	AGAAACTCCA	TGATGACATG	AACCCAATCA	AGCAGAAAGT	AGGAGTAAAG	CCAGAGCTGG	CTTCTTGCCA	TACGGCAGAG	3400
delta copA	-----	GATGTCACAG	AGAAACTCCA	TGATGACATG	AACCCAATCA	AGCAGAAAGT	AGGAGTAAAG	CCAGAGCTGG	CTTCTTGCCA	TACGGCAGAG	1348
WT LGP32	ATCGAGGTTT	ACG	3413								
delta copA	-----	---	1348								

D

WT LGP32	OGGCTAAATC	TCAAAAAAGAC	ACCTTACTTT	CTCAAATGAA	CGCGCAAGTG	AATGCATTGC	TGGTGGACAG	ATCAAATCTG	ATCCAGOGAT	TAGATCGCTA	100
delta cusAB	-----	-----	-----	---AAATGAA	CGCGCAAGTG	AATGCATTGC	TGGTGGACAG	ATCAAATCTG	ATCCAGOGAT	TAGATCGCTA	67
WT LGP32	TCAAACGTCC	TTGCTTCCTC	AAACCGCAGC	ACGAATCAGC	GCGGTTGAAA	GGGGCTATCA	AAACAATACC	GCCCCAGTTA	ACGATGTCAT	TTTAGCAACG	200
delta cusAB	TCAAACGTCC	TTGCTTCCTC	AAACCGCAGC	ACGAATCAGC	GCGGTTGAAA	GGGGCTATCA	AAACAATACC	GCCCCAGTTA	ACGATGTCAT	TTTAGCAACG	167
WT LGP32	ACCGATGAGC	TGGCGCTTAA	GTTAGAGCAA	CAACGTTTGA	TCACOGATCT	CAACATCGTT	AACAGCAAAC	TGGCGGCGTT	AGTCAGTGGC	TTTGAATACC	300
delta cusAB	ACCGATGAGC	TGGCGCTTAA	GTTAGAGCAA	CAACGTTTGA	TCACOGATCT	CAACATCGTT	AACAGCAAAC	TGGCGGCGTT	AGTCAGTGGC	TTTGAATACC	267
WT LGP32	AAGTAAACCA	ACCACAGCTC	AATTCAAGCG	CAACTAAACA	CACAGCCAAT	CAATAAGGGA	ATAGACAATG	AGTTTCAGTAA	AAGTAGCAAC	AATCGCTTTA	400
delta cusAB	AAGTAAACCA	ACCACAGCTC	AATTCAAGCG	CAACTAAACA	CACAGCCAAT	CAATAAGGGA	ATAGACA---	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TTGGTCGGTG	GTGCATTGGG	TTTTGGTGTG	AACCATTTC	TGATTAATCC	AGCACACGAC	ATGTCACCAA	TGGCAACGAG	TACAGAAGCC	AGOGATGAAC	500
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CTTTGTATTG	GGTGGCTCCG	ATGGACCCAA	ATTATCAGCG	AGACAAGCCG	GGTCAGTCAC	CTATGGGGAT	GGATTTAATC	CCTGTTTACG	CGGATGACTC	600
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	AAGTGGTGT	AAAGATGAGC	CCGGTACCCT	GTTTCATGAT	TCGTGGTGTG	AAAATAATCT	GGTGTCAA	ACAGCGAAG	TTAAGTTCGA	AACGCTATCT	700
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CCTCGGATG	AAACCGTGGG	TTATGTGGCG	TTGATGAAA	GTACATTGTG	GCAAACCAAC	GTAAGAGCAG	CTGGTTGGGT	TGAGAAGCTC	TACATCAACG	800
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CAGTGGGTGA	GAAGGTAAC	AAAGGTGATG	TGCTTTTCAC	ACTCTATTCT	CCAGAGCTTG	TTAAAGCACA	AGAAGAGTTG	ATCAGTGCCT	ATAAAACGGG	900
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TCGTAAGGT	TTGATCAAGG	GCTCGACTGA	ACGCTTAATT	ACTTTGGGTG	TTGATAAGAC	TCAAATCCG	TCTATTACGC	GCAAAGGCAA	AGCCTCGCAA	1000
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ACCATTGAAG	TTAAAGCGCG	AGCCGATGGT	GTTATAGCGA	GTTTGAATAT	CCGAGAAGGT	GGTTATCTTT	CACCTGCACA	AGCGGTGATC	AGTGTCTGCC	1100
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CATTAGGOGA	AGTATGGGTT	GATGCAGAGG	TGTTTGAGCG	TCAAGCGCAC	TGGATCTGCT	CAGCGCAGAA	TGCGGTGATG	ACGCTAGATG	CCATTCTCTG	1200
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CAAAGAGTGG	TTGGGTAATG	TCGATTACGT	TTACCCAATC	CTTGATCCAA	AAACTCGAAC	CTTGCGCGTT	CGTTTGAAGT	TCTCCAATCC	AAATGCGGAG	1300
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CTTAAGCCAA	ATATGTTGCG	CAATATTGCG	CTGAAACCCA	TCAGTGATGA	AGCCGTTCTT	ACTATTCCAA	GATCTTCGGT	TATTCACCTC	GGTGGTCTGA	1400
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CTCGAGTGT	TTCTGGCA	AGTATCGTTC	TGCTCGTATT	GAGGTGGTCT	GTGAAGCTGG	CGAAAAATA	GAGGTGCTTC	AAGGGTAGA	-----	1500
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GCAAGGTGAG	AACATTGTCA	CTTCTGCGCA	CTTCATGTTG	GATTCTGAAT	CGAGCCAATC	CGCTGATCTG	TCAOGCATCA	ATGGTGTGTA	GGAAAGAGCT	1600
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GAAACCGTGT	GGGCAAACGG	TGAAATTTCC	GACGTTATCG	AAGGCAGCCG	TATGGTGAAG	ATTAACCATC	AGCCTGTCTC	TGAATGGGAT	TGGCCGGCCA	1700
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TGGTGTGAA	TTTCACTTTT	GCGGAAGGCT	TAGACATGAG	TGACGTGCAA	CGCGGTAAGG	CGATTGATTT	TGAGATGAGA	AAGACAGAGT	CAGGGCAGTA	1800
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CGAGGTTGTT	GATTACAAGG	TCAAACAACA	CAAGATCGCT	GGCGAAGTTT	GGGTAACAGG	TGACATCACT	ATGTTGATGG	CAGATTTTGG	CATGATCACC	1900
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GTAAAACATC	AGCCAGTCCC	TGAGTGGAA	TGSAAGCGG	GTGAAATGAA	TTTCCAAGCC	AGTGATGAGC	TTGATTATC	TGAGTTTGGC	GAGGTTCAAA	2000
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CCATTCCGTT	TCTAGTGGCG	AAGCAGGTTT	CTGATTATGT	GCTCAAATCT	TTAGAAGCGG	GTGAGGCGGA	ACTATGATCA	ATGCAATCAT	TCGCTGGTCT	2100
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ATTAGCAACC	GCTTCTTAGT	GCTGTTGCT	ACTGTAGCCA	TCGTATTGCG	CGGCTTATAC	AGCGTTAAAA	ATACACCGGT	CGATGCCATT	CCAGATTTAT	2200
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CAGATGTTC	GGTAATTATC	AAAACCAGTT	ATCCGGGACA	AGCGCCACAA	GTGGTTGAGG	ATCAGGTGAC	TTATCCATT	ACCACCGCCA	TGTTAGCTGT	2300
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ACCGGTTGCT	GAAACGGTTC	GTGGTTACTC	GTTCTTTGGT	GATTCTATG	TCTATATCAT	CTTCAATGAC	GATACTGATA	TGTACTGGGC	ACGTTACAGA	2400
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GTGCTGGAGT	ACCTAAGCCA	AGTTGCACCT	AACTTGCTTT	CGAGTGCTAA	GCCAAACACTA	GCGCCAGATG	CAACCGGTGT	GGGCTGGGTT	TACAGCTAGC	2500
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TGTTGCAAGA	TAAAACCGGT	CAGCAGACT	TAGCGGAAT	TCGTAGTTTG	CAAGATTGCT	TCTTGAAGTA	TGAATTGCAA	ACCGTAGAAG	CGGTGTCTGA	2600
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	AGTGGCGACC	GTTGGCGGCA	TGGTGAAGCA	GTATCAAGTA	CAGATTGATC	CTGCCAAGTT	ACGTGCATAT	GACCTGACGC	TTCAGCAAGT	CAACAAGGCA	2700
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ATCCAAGATG	GTAATCAAGA	AACCGTGCA	TCTGTTGTCG	AGATTGCCGA	AGCCGCAACAT	ATGGTTCTGA	CGACCGGTTA	CCTGACAAGC	ATCGAAGACA	2800
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TTCAATCCCT	GCCATTAAAA	GTGACCGACA	AGGGTACTCC	GCTGCTATTA	GGTGACATTG	CTGACATCAA	CCTTGGCCCG	CAAATGCGTC	GTGGTATCTC	2900
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TGAGCTGAAT	GGTGAAGGTG	AAGCCGTTGG	CGCGTPTATC	GTGATGCGCT	TTGTTGAAAA	TGCCAGTGAA	GTGATCGACT	CGGTGAAATC	CAAGCTCGCT	3000
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GAACTGCAAG	CTGGCTTGCC	TGATGGTGTG	GAGATTGTG	CAACTTATGA	CCGTTCTACT	TTGATTGATT	CAGCCGTTGA	AAACCTTTGG	AAGAAGCTGG	3100
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CTGAAGAGTT	TATCGTGGTC	GCCGTCGTGT	GTGCGCTGTT	CTTGTTCAT	ATCCGATCAT	CACTGGTTAT	CGCGCTAAGT	CTGCCTGTTG	GTATTTTAGG	3200
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TGCATTATC	GTCATGCAAT	GGCAGGTTAT	CAACGCCAAC	ATCATGTCTC	TTGGCGGGAT	CGCGATTGCG	ATTGGCGCCA	TGGTGGATGG	TGCCATAGTG	3300
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ATGATTGAGA	ACGTTTATA	ACACATTGAA	CGGACTCCGC	TCACTGACAA	AAACCGTTGG	CAAGTGATTG	GTAAGGCAGC	AGAAGAAGTC	GGGCACCGC	3400
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TGTTCTTCTC	TCTGATTATC	ATTACCTTGA	GTTTTGTGCC	TGTTTTCGCG	CTAGAAGGGC	AAGAGGGCAA	GATGTTCTCG	CCACTTGGCT	TTACCAAGAC	3500
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334

WT LGP32	GTATGCGATG	GCCGACGCG	CTGGTTGGC	TATCACGCTT	GTGCTGTGC	TAATGGGTTA	CTTCATTGCG	GGCAACGTGC	TACCTGAACA	CAAAAACCCA	3600
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GTCAACCGCA	GCCTAGTGGC	GATGTACAAA	CCGCTTCTGA	ACCTAAGCTT	AAAATATCCA	AAGGTGATGA	TTGTTATCGC	ACTTGGCTTA	ATGGCGTCTG	3700
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CTTATTACCC	AACCAAGTAA	CTTGGCAGCG	AGTTCATCC	TCCTTTGGAG	GAAGGAGATT	TGATGTACAT	GCCAAACCA	TATCCGGGCA	TCTCAATAGG	3800
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TAAGGCTCGT	GAGTTGTTC	AACAAAACCA	CAAGCTCATC	AAAACCATT	CAGAACTCGA	AACCAAGTGG	GGCAAAATTG	GCCGAGCAGA	GACAGCAACC	3900
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GATCCTGCGC	CACTGACTAT	GATTGAAACG	GTTATTGAGC	TTAAACCGCG	AGAACAGTGG	CGTGACGGTG	TCACTACGGA	GTCTCTGCGT	AAAGAGTTTG	4000
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ATGATCTGAT	TCAATTCCCC	GGTTTGACCA	ACGCTTGGGT	CATGCCAATC	AAAACGCGTA	TCGACATGTT	GGCGACCGGT	ATTAACACGC	CAATTGGTAT	4100
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CAAAATCGCA	GGCCAGATC	TGAGCGTAT	TGAGGACATT	GGCTCTCAAC	TTGAACCCAT	CCTCAATAGC	GTGAGTGGTA	CGGCTTCTGT	CTACGCTGAG	4200
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CGTGTTCGGG	GTGGTCGTTA	TGTGACGATA	GACATCAAAC	GTCTTCTGCG	TGCGCGATAT	GGCTTGAGCA	TTAAAGAAAT	GCAACAGGTT	ATTTGCACTG	4300
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CGGTTGGTGG	CATGAACGTG	GGTGAACCGG	TTGAGGGGCT	AGAGCGTTAC	CCAATCAATG	TCGGTTACCC	ACAAAGCTAT	CGTGATTCTG	TCGTTAAGTT	4400
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	GCAGAACCTG	CCGTTAGTGA	CACCAATGG	AGCGCGAATT	GCTTTGTCTG	ATGTTGCAGA	TATTCGCTAT	GAAGATGGAC	CACCAATGAT	TAAGACGGAG	4500
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	AAOCGCGCTC	CTAATGGCTG	GGTGTTCGTT	GACATOGAAG	GGCGCGACCT	TGGTCTTAT	GTGGCAGAGG	CGCAAAAGT	CGTTACAGAT	CAATCGTCT	4600
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TACCTGCGGG	TTATTCACTG	GGTGGTCTG	GTCAATACGA	ATACATGGAG	CGCGCCAAAG	AACGTTAAG	TGTCGTTGTTG	CCAATCACCA	TCGCCATCAT	4700
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CATGTTGTTG	CTCTATCTAA	GCTTCCGCGG	TGTCTGTGAG	GTGATGATGA	TCATGTCTGAC	ATTGCCACTC	GCGATGGTTG	GCGGCCTATG	GCTGATGCAT	4800
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ATCCTCAATT	ACAACCTTCT	GATTGCGGTG	GGTGTGGGCT	TTATCGGCT	TGCCGGGGTA	GCTGTTGAGA	TAGGTGTGAT	CATGTTGGTC	TACCTAAACC	4900
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	AAGCTTGGCA	CTACAAAAAA	TTGGATGCAG	AAGAGAACCA	GCAACACTT	CAGAGTGAAG	ACTTAACGGA	TGCGATTCTG	GAGGGGACAG	GACTGCGTGT	5000
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	TCGCCCTGTG	ATGATGACAG	TACTTACCGT	GATCATTGGC	CTCATTCCAA	TTATGTATGG	CGAGGGAAAC	GGCTCTGAAG	TGATGCAGCG	AATTGCTGCG	5100
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	CCGATGATAG	GCGGAATGGC	GTCTGCACTG	TTGCTTACCC	TACTGGTGT	GCCTGCAATC	TTTAAGCTCT	GGAAACAGCG	TGAGATCACG	CACAGCCAAA	5200
delta cusAB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	334
WT LGP32	ACGAGACAAA	CAAAATACCGT	ATTGATTATT	AGCCCTTACT	TACCAATACA	GAGTGAGTAA	GGGCGTACCA	CATGAACATG	TGAAACTAAC	AAATAAATAA	5300
delta cusAB	-----	-----CGT	ATTGATTATT	AGCCCTTACT	TACCAATACA	GAGTGAGTAG	GGGCGTACCA	CATGAACATG	TGAAACTAAC	AAATAAATAA	417
WT LGP32	CAGAATTAAT	CTAAGGAACG	ATCA-TGAAA	AAGACACTTA	TTGCGATTGC	ACTGACGTTA	ACTACTGCAA	CGGCTTTTGC	TGAAA-TGGA	CC-ATTGAA	5397
delta cusAB	CAGAATTAAT	CTAAGGAACG	ACCAATGAAA	AAGACACTTA	TTGCGATTGC	ACTGACGTTA	ACTACTGCAA	CGGCTTTTGC	TGAAAATGGA	CKKATTGAA	517
WT LGP32	TATGGACCAC	TCAAATATGG	ATCACTCGAT	GATGAAGAGT	GGAGAGATGG	ATCATTCAAA	AATGGATCAC	AGCATGATGA	AGGATGGAAA	GATGGACCAT	5497
delta cusAB	TATGGACCAC	TCAAATATGG	ATCACTCGAT	GATGAAGAGT	GGAGAGATGG	ATCATTCAAA	AATGGATCAC	AGCATGATG-	-----	-----	596
WT LGP32	I 5498										
delta cusAB	- 596										

Figure 31. Contrôle des délétions par séquençage.

Les produits PCR obtenus des mutants (A)  $\Delta$ ahpC (VS\_2126), (B)  $\Delta$ sodA (VS\_2918), (C)  $\Delta$ copA (VS\_0768) et  $\Delta$ cusAB (VS\_I10515/VS\_I10516) ont été séquencés. Les séquences ont été alignées à celle de la souche WT par ClustalW. Les gaps correspondant à la délétion entière de l'ORF sont indiqués par des tirets. Les amorces sens et anti-sens sont soulignées. Le codon ATG et les codons STOP des ORF sont surlignés en gris.



## **CHAPITRE III**

# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## **CHAPITRE III: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à caractériser les mécanismes moléculaires explicatifs de la survie intrahémocytaire de *V. tasmaniensis* LGP32 et de ses effets cytopathiques sur les hémocytes d'huître. Cette discussion met nos résultats en perspective de ceux trouvés dans la littérature dans d'autres modèles d'interactions.

### **Processus infectieux de *V. tasmaniensis* LGP32**

*Cette thèse a montré que LGP32 était un pathogène intravacuolaire qui induit la lyse des hémocytes. Ceci amène de nombreuses questions sur les effecteurs de ces effets cytopathiques. Plus généralement, si l'interaction LGP32/hémocytes commence à être bien décrite, on ignore encore si elle est suffisante pour causer la mort des huîtres ou s'il existe d'autres tissus cibles dans l'huître.*

Au cours ce travail, nous avons montré que *V. tasmaniensis* LGP32 était un pathogène intravacuolaire capable de survivre et de se multiplier dans les hémocytes de *C. gigas*. Les *Vibrio* sont généralement considérés comme des pathogènes extracellulaires. Mais depuis quelques années, les *Vibrio* peuvent adopter des stades de vie intracellulaire dans des phagocytes de l'environnement comme les amibes (Abd et al., 2005; Abd et al., 2007) mais également dans les cellules épithéliales et les phagocytes professionnels de l'hôte colonisé (Ma et al., 2009a; de Souza Santos and Orth, 2014) comme *V. cholerae* et de *V. parahaemolyticus*. Chez *V. cholerae*, la translocation d'effecteurs bactériens impliqués dans la virulence et la colonisation, est dépendante de l'internalisation dans les cellules phagocytaires de l'hôte. Plus récemment, il a été montré que *V. parahemolyticus* était capable de s'échapper de la vacuole de phagoctose pour se multiplier dans le cytosol puis lyser les cellules épithéliales. Nos images de microscopie électronique à 1h n'ont montré aucun *Vibrio* cytosolique. De plus, les images de microscopie à fluorescence montrent qu'à 3h les bactéries sont localisées dans les phagosomes. LGP32 est donc à ce jour le seul *Vibrio* décrit pour envahir des phagocytes professionnels et y adopter un mode de vie intravacuolaire. Si les contacts *Vibrio*/hémocytes n'ont été observés en microscopie électronique qu'à un temps précoce de l'infection, ils l'ont été sur des temps plus long en microscopie confocale. Aucune de nos images n'a permis d'observer l'échappement du pathogène dans le cytosol.

Par contre, il est apparu que LGP32 induisait la lyse des hémocytes 5-7 heures après phagoctose, permettant la libération massive des vibrios dans l'espace extracellulaire. Nous avons en effet montré que l'internalisation de LGP32 par les hémocytes induit la lyse des hémocytes et que



cette lyse est dépendante de l'internalisation. Si nous avons pu montrer que les systèmes d'efflux de cuivre et la réponse anti-oxydante étaient des éléments clés dans la virulence et la survie de la bactérie dans les hémocytes, il reste encore de nombreuses interrogations à résoudre comme déterminer les facteurs de virulence impliqués dans la cytotoxicité envers les hémocytes.

Nous avons montré que la cytotoxicité était dépendante de l'invasion hémocytaire (article II). Cette caractéristique n'est pas partagée par tous les pathogènes intracellulaires. Ainsi, chez *Salmonella*, la cytotoxicité vis-à-vis des macrophages n'est pas dépendante de l'invasion cellulaire (Chen et al., 1996) mais dépend de systèmes de sécrétion de type III utilisés pour injecter des effecteurs impliqués dans la mort cellulaires des macrophages. Chez *Shigella*, l'internalisation dans les cellules de l'hôte est une étape essentielle pour induire la nécrose des macrophages mais en revanche, l'apoptose des cellules est indépendante de l'invasion (Francois et al., 2000; Nonaka et al., 2003). Enfin pour les pathogènes *Bordetella bronchiseptica* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la cytotoxicité est dépendante de l'invasion cellulaire (Kato et al., 1995; Forde et al., 1999). La plupart de ces pathogènes utilisent des systèmes de sécrétion dédiés pour injecter des molécules toxiques aux cellules qu'ils envahissent chez leur hôte. A ce jour, on ignore ce qu'il en est chez LGP32. En effet, s'il possède les transporteurs T1SS, T2SS et T6SS, leur fonction dans le processus infectieux n'a pas été caractérisée.

Un intérêt particulier pourra être porté au T6SS. En effet les travaux de Mekalanos et collaborateurs ont montré que l'internalisation de *V. cholerae* était nécessaire pour la sécrétion des effecteurs Hcp et VgrR par le T6SS (Ma et al., 2009a; Ma and Mekalanos, 2010). De même, le pathogène *Campylobacter jejuni* utilise un T6SS pour l'adhésion et l'invasion des cellules et la colonisation *in vivo* (Lertpiriyapong et al., 2012). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, un T6SS est nécessaire à l'invasion dans les cellules épithéliales et la virulence (Sana et al., 2012). Chez *V. tasmaniensis* LGP32, il n'existe qu'une copie du T6SS et il n'est pas surexprimé en condition intracellulaire (article II, table S1). Le fait qu'il ne soit pas modulé ne veut néanmoins pas dire qu'il n'est pas impliqué dans le processus infectieux. Ainsi, par la suite, il sera intéressant de rechercher le rôle du T6SS dans processus infectieux de LGP32. Il faut noter que LGP32 ne possède pas de système sécrétion de type III (T3SS). Ce système est utilisé par certaines bactéries à mode de vie intracellulaire pour induire des effets cytotoxiques aux cellules de l'hôte et s'échapper du phagosome (Ham et al., 2011). Récemment, il a été montré que le T3SS était nécessaire à l'échappement du phagosome chez *V. parahaemolyticus* (de Souza Santos and Orth, 2014). Ce n'est donc pas un mécanisme conservé chez les vibrios intracellulaires facultatifs.

Il faudra également étudier le rôle des facteurs de virulence potentiels mis en évidence dans la cadre l'analyse transcriptomique du *Vibrio* intracellulaire. Participent-ils à la cytotoxicité hémocytaire *in vitro* et/ou à la virulence *in vivo* ? Parmi eux, on trouve des phospholipases et des métalloprotéases qui pourraient être impliquées dans les effets cytopathiques observés chez les hémocytes infectés. Ainsi, des mutants pour ces facteurs de virulence potentiels ont été construits par nos collaborateurs (équipe de Frédérique Le Roux, Roscoff) et vont être testés *in vitro* et *in vivo*. Il faut noter que les phospholipases peuvent entraîner la lyse cellulaire mais également être impliquées dans la résistance aux AMPs via PhoPQ comme évoqué plus loin dans cette discussion (Kawasaki et al., 2007; Dalebroux and Miller, 2014). Il en va de même pour la métalloprotéase InhA qui a été décrite pour son rôle dans l'échappement au macrophage ainsi que dans la résistance aux peptides antimicrobiens (Dalhammar and Steiner, 1984; Ramarao and Lereclus, 2005). Etant donné la très importante surexpression de ces effecteurs dans la condition intracellulaire, l'analyse des mutants apparait comme une priorité pour la compréhension des mécanismes de pathogénicité de LGP32. De même, on pourra s'interroger sur la fonction des petits ARNs régulateurs mis en évidence par Jacq et collaborateurs (Toffano-Nioche et al., 2012) dans cette vie intracellulaire. Leur surexpression intracellulaire laisse en effet supposer qu'ils puissent jouer un rôle majeur à cette étape du processus infectieux.

Alors que nous nous sommes concentrés dans cette thèse sur l'interaction LGP32/hémocytes, de nombreuses inconnues sur le processus infectieux de LGP32. En particulier, la route d'infection de LGP32 dans l'huître reste mal étudiée, les tests de virulence étant systématiquement effectués par injection intramusculaire. Ceci reste un obstacle majeur à la compréhension de la pathologie de l'huître. La thèse de Marylise Duperthuy (2010) a néanmoins permis de montrer que LGP32 colonisait efficacement l'hémolymphe de l'huître lorsqu'il est introduit dans l'eau de mer que filtre l'huître. Ainsi, après 6h de balnéation, les *Vibrio* se retrouvent dans l'hémolymphe des huîtres où circulent les hémocytes. On peut ainsi supposer que les *Vibrio* utilisent les hémocytes comme véhicules pour coloniser l'hôte. Cette stratégie est utilisée par d'autres pathogènes intracellulaire comme *Mycobacterium bovis* qui utilisent les neutrophiles pour se disséminer dans l'hôte (Abadie et al., 2005), *Mycobacterium marinum* qui utilisent les macrophages (Clay et al., 2007) ou encore *Francisella tularensis* et *Burkholderia pseudomallei* qui utilisent les cellules dendritiques (Bar-Haim et al., 2008; Williams et al., 2014). Des analyses histologiques d'huître balnées avec des *Vibrio* exprimant la GFP ou la luciférase apporteront des informations supplémentaires concernant la dissémination du pathogène dans les tissus de l'huître.

On pourra pour cela s'inspirer des travaux fait par l'équipe de Debra Milton sur *V. anguillarum* (Weber et al., 2010) ou Matt Waldor sur *V. cholerae* (Millet et al., 2014).

### **Rôle des OMVs dans l'interaction *V. tasmaniensis* LGP32/*Crassostrea gigas***

*Nous avons montré dans cette thèse que LGP32 libérait dans le phagosome des vésicules de membrane externe (OMVs) capables de véhiculer des facteurs de virulence aux cellules d'huître et de le protéger contre les peptides antimicrobiens qui participent aux défenses immunitaires de l'huître. Un aspect qui mériterait d'être étudié à la suite de cette thèse est celui de l'induction par les OMVs d'une réponse immunitaire chez l'huître.*

Un des résultats importants de cette thèse a été la mise en évidence la production de vésicules de membrane externes (OMVs) par *V. tasmaniensis* LGP32 lors de ses stades intracellulaire et extracellulaire, des OMVs qui jouent un rôle dans la virulence de la bactérie et dans sa résistance aux défenses de l'hôte.

### ***OMVs et virulence***

Les bactéries à Gram négatif produisent naturellement des OMVs durant toutes les phases de croissance et dans différents milieux. La plupart des études montrent que les bactéries produisent des OMVs en extracellulaire. Néanmoins, certains exemples montrent que cette production peut également être observée chez des bactéries intracellulaires comme *Legionella* et *Salmonella* qui produisent des OMVs à l'intérieur du phagosome (Garcia-del Portillo et al., 1997; Fernandez-Moreira et al., 2006) et *Francisella* qui produit des OMVs dans le cytosol de la cellule hôte (Golovliov et al., 2003). L'analyse de la composition des OMVs chez une grande variété de bactéries pathogènes a montré qu'elles pouvaient être porteuses de nombreux facteurs de virulence tels que des adhésines, des toxines et des enzymes. De plus, ces vésicules peuvent interagir avec les cellules de l'hôte (adhérence, fusion/endocytose) et agir comme des véhicules pour les facteurs de virulence (Ellis and Kuehn, 2010). Elles sont également capables de stimuler le système immunitaire de l'hôte (production de cytokine, réponse inflammatoire) qui reconnaît le LPS et les autres PAMPs qu'elles transportent (Bishop et al., 2010; Bielig et al., 2011b). Ainsi, depuis quelques années, les études sur les OMVs de bactéries à Gram négatif ne cessent d'augmenter.

Les études sur les vibrios pathogènes de l'huître ont montré que les ECPs (produits de sécrétion) étaient toxiques pour les huîtres et que des métalloprotéases étaient les principaux facteurs de toxicité des ECPs totales (Labreuche et al., 2006a; Binesse et al., 2008; Labreuche et al., 2010). Parce qu'un grand nombre de vésicules avaient été observées dans le phagosome des

hémocytes infectés par LGP32, nous nous sommes intéressés à la fraction vésiculaire des ECPs qui n'avait jamais été étudiée jusqu'à présent chez les pathogènes de l'huître. L'analyse protéomique des OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 a mis en évidence un certain nombre d'enzymes qui pourraient être impliquées dans la virulence de la bactérie, comme des métalloprotéases, des hémolysines, des sérines protéases et des phospholipases.

L'association de facteurs de virulence aux OMVs est décrite chez un grand nombre de pathogènes humains comme les *Legionella* (Fernandez-Moreira et al., 2006; Galka et al., 2008), les *Salmonella* (Wai et al., 2003; Kitagawa et al., 2010) et les *Shigella* (Kadurugamuwa and Beveridge, 1998; Dutta et al., 2004). Il en est de même pour les pathogènes de vertébrés du genre *Vibrio* comme *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. anguillarum*. Ainsi, chez *V. cholerae*, la toxine RTX, la toxine cholérique, et la cytolysine VCC sont retrouvées associées aux OMVs qui peuvent être internalisées par les cellules épithéliales intestinales humaines (Boardman et al., 2007; Chatterjee and Chaudhuri, 2011; Elluri et al., 2014). De même, les OMVs de *V. vulnificus* délivrent l'hémolysine/cytolysine VvhA aux cellules épithéliales et sont cytotoxiques (Kim et al., 2010). Enfin, les OMVs de *V. anguillarum* présentent des activités enzymatiques de phospholipase, d'hémolysine et de métalloprotéase (Hong et al., 2009).

Les travaux que nous avons menés sur les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 ont permis de mettre en évidence l'encapsulation de protéases dans les vésicules dont la sérine protéase Vsp nécessaire à la virulence en infections expérimentales d'huître. Cette étude est la première qui démontre l'encapsulation de protéases dans les OMVs. De plus, il s'agit de la description d'un nouveau mécanisme impliqué la virulence chez *V. tasmaniensis* LGP32 chez l'huître.

Chez les pathogènes du genre *Vibrio*, on retrouve des sérines protéases décrites comme des facteurs de virulence. Ainsi, la sérine protéase de *V. parahaemolyticus* entraîne une hémorragie des tissus ainsi que la mort des souris après une injection (Lee et al., 2002a). De même, *V. alginolyticus* sécrète une sérine protéase qui est létale pour les crevettes et qui possède ayant des propriétés anticoagulantes (Lee et al., 1997; Chen et al., 1999, 2000). Enfin, la sérine protéase de *V. cholerae* provoque des hémorragies de l'intestin grêle chez le lapin (Syngkon et al., 2010). Cette espèce produit également une sérine protéase VesA qui est nécessaire à la maturation de la sous-unité A de la toxine cholérique et elle est retrouvée dans la fraction vésiculaire de *V. cholerae* (Sikora et al., 2011). De manière intéressante, la sérine protéase Vsp est homologue VesA. On peut donc supposer que la sérine protéase de *V. tasmaniensis* LGP32 soit également impliquée dans la maturation d'un facteur de virulence non caractérisé.

Un point important de notre étude a été de montrer que les OMVs pouvaient être à la fois internalisées par les cellules de l'huître (Article I, Fig.5E&F) et produites à l'intérieur du phagosome (Article I, Fig. 5B). Ceci indique que les OMVs peuvent effectivement jouer un rôle important dans la **délivrance de facteurs de virulence comme la Vsp aux cellules de l'hôte**. De manière intéressante, alors que la souche LGP32 dépend de la porine OmpU pour son entrée dans les hémocytes dans un processus de phagocytose dépendant de la  $\beta$ -intégrine (Duperthuy et al., 2011), nous avons montré que les OMVs du mutant  $\Delta ompU$  étaient internalisées de la même manière que celle de la souche WT (données non présentées). Dans d'autres espèces bactériennes, l'entrée des OMVs de *Porphyromonas gingivalis* et d'*E. coli* ETEC chez des cellules épithéliales se fait par la voie de l'endocytose (Kesty et al., 2004; Furuta et al., 2009). Il est vraisemblable qu'il en soit de même dans notre modèle.

Malgré de nombreuses expériences tentées dans ce sens, nous n'avons pas pu identifier dans le cadre de cette thèse un mécanisme cellulaire susceptible d'expliquer le rôle des OMVs dans la virulence *in vivo*. Par exemple, nous n'avons pas observé d'effet cytotoxique reproductible sur les hémocytes d'huître. La composition des OMVs peut varier en fonction de la phase de croissance de la bactérie (Tashiro et al., 2010) et des conditions de culture (anaérobie / aérobie) (Kan et al., 2004; Starck et al., 2004). Nous avons de même constaté que les milieux de culture (LB versus Zobell, solide versus liquide) influençaient de manière significative la composition des OMVs de LGP32 (Données non montrées). Nos essais *in vitro* ayant toujours été faits à l'aide d'OMVs issues de cultures aérobies de 16h en milieu Zobell agar (par souci de standardisation), il se peut que des facteurs de virulence importants exprimés seulement dans la condition intracellulaire aient été absents de nos préparations d'OMVs. Etant donné la difficulté à isoler les OMVs présentes dans les phagosomes, il serait intéressant de produire des OMVs en conditions d'hypoxie et de les tester sur des hémocytes. De plus, nous avons montré que les bactéries dans le plasma d'huître produisaient de grande quantité de vésicules sûrement en réponse aux protéines plasmatiques. Il serait intéressant de produire des OMVs en présence de composé de l'hémolymphe pour stimuler éventuellement la sécrétion de protéines spécifiques impliquées dans la résistance aux AMPs par exemple.

Enfin, nous avons montré que la cytotoxicité de LGP32 vis-à-vis des hémocytes d'huîtres était dépendante de son internalisation (article II). Ainsi, au-delà de la composition des OMVs, leur mode de délivrance aux cellules de l'hôte pourrait à lui seul expliquer l'absence de phénotype observé *in vitro*. Il se peut en effet que la délivrance extracellulaire des OMVs ne permet pas de véhiculer les

OMVs chargés en facteurs de virulence dans des compartiments cellulaires permettant l'expression de la cytotoxicité.

### **OMVs et survie intracellulaire : rôle dans la résistance aux AMPs**

La mise en évidence de la sécrétion intracellulaire des OMVs par LGP32 laisse supposer qu'elles puissent jouer un rôle dans la survie de la bactérie dans le phagosome des hémocytes. En effet, des auteurs ont montré que les OMVs pouvaient **inhiber la fusion phagosome-lysosome** chez *Legionella* (Fernandez-Moreira et al., 2006). Un tel rôle des OMVs dans l'interaction LGP32/hémocytes pourrait être étudié. En effet, les travaux de l'équipe ont montré que LGP32 interférait avec la maturation du phagosome en altérant la formation de vacuoles acides (Duperthuy et al., 2011). Plus proches de nos évidences expérimentales, des travaux récents chez deux espèces de bactéries extracellulaires *Vibrio cholerae* et *E. coli* entérotoxigénique (ETEC) ont montré, comme dans notre étude, que les OMVs pouvaient jouer un rôle important dans la **protection contre les peptides antimicrobiens**. La sécrétion intracellulaire d'OMVs dans la lumière du phagosome pourrait donc jouer un rôle déterminant pour sa survie intracellulaire dans un compartiment où viennent se déverser des granules cytoplasmiques chargés de peptides antimicrobiens.

Il est aujourd'hui montré dans diverses espèces, y compris *V. cholerae*, que **le stress membranaire y compris l'exposition à des AMPs entraîne une hypervésiculation des bactéries** (Manning and Kuehn, 2013). Dans notre cas, une hypervésiculation de LGP32 a pu être mise en évidence lors d'un contact avec le plasma d'huître. Il est probable qu'en activant le relargage de vésicules membranaires, les bactéries se protègent, en les éliminant, des agents membranolytiques qui interagissent avec leurs membranes. En effet, comme chez *V. tasmaniensis* LGP32, les travaux récents de Duperthuy *et al.* chez *V. cholerae* ont montré que des OMVs produites en présence de dose sub-léthales pour la PmB conféraient une résistance croisée contre la cathelicidin LL-37, un peptide antimicrobien produit par les phagocytes et epithelia humains. Cette résistance est due à la présence de Bap1 associée à la surface des OMVs dont la production est fortement induite en présence de PmB. La protéine Bap1 liant le peptide LL-37, elle titre le peptide et augmente la résistance de *V. cholerae* contre la protéine LL-37 (Duperthuy et al., 2013). Dans le cas des OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32, nous avons montré que les OMVs non traitées suffisaient à protéger la bactérie contre la polymyxine B dans un mécanisme de résistance dose-dépendant basé également sur la titration (et non la dégradation) des peptides. Nos études décrivent donc un nouveau mécanisme de résistance aux AMPs chez les *Vibrio* dans lequel la titration passe vraisemblablement par l'insertion membranaire des peptides dans les OMVs. Néanmoins, dans les deux espèces de

*Vibrio*, il apparaît que **la sécrétion d'OMVs est un mécanisme d'adsorption des AMPs hautement efficace permettant de limiter leur interaction avec les bactéries elles-mêmes.**

Comme décrit en rappels bibliographiques, l'huître produit une grande diversité de peptides et de protéines antimicrobiennes (Schmitt et al., 2012b). Certains de ces AMPs ont des activités contre les bactéries à Gram négatif comme la *Cg*-BPI qui lie le LPS et perméabilise les membranes bactériennes (Gonzalez et al., 2007). Il est fort probable que les OMVs confèrent une protection contre les protéines antimicrobiennes à activité membranaire de l'huître comme la *Cg*-BPI. Mais les peptides/protéines antimicrobiens sont des molécules multifonctionnelles impliquées dans de nombreux processus biologiques. Il est ainsi décrit dans la littérature que la BPI humaine servirait d'osponine pour l'internalisation des OMVs dans des cellules dendritiques (Schultz et al., 2007). Dans notre cas, l'utilisation d'un anticorps contre la BPI de l'huître a permis de montrer qu'elle était capable de se lier à la surface de LGP32 (Données non publiées). Il est donc vraisemblable, que comme la BPI humaine, la BPI d'huître ait la capacité de se lier aux OMVs de LGP32 grâce à ses propriétés de liaison au LPS. Nous ignorons à ce jour si elle peut promouvoir l'entrée des OMVs dans les phagocytes d'huître. Par contre nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la *Cg*-BPI mais aussi la PmB pourraient permettre de lyser les OMVs et de libérer ainsi le contenu des OMVs riche en facteurs de virulence (comme la protéase Vsp caractérisée dans cette étude). Néanmoins, même à des concentrations élevées en *Cg*-BPI et PmB, nous n'avons pas réussi à libérer l'activité protéase intravésiculaire liée à la Vsp comme nous avons pu le faire avec de faibles concentrations de triton (article I). **Nous ne sommes donc pas en mesure à ce jour d'étayer l'hypothèse d'une lyse des OMVs au sein du phagosome, ayant pour conséquence la libération des facteurs de virulence du *Vibrio*.**

#### ***Autres mécanismes de remodelage membranaire conférant une résistance aux AMPs***

Au-delà du remodelage membranaire associé à la production d'OMVs, la **modification de charge de la membrane bactérienne** est un mécanisme hautement protecteur contre les AMPs récemment caractérisé en détails chez *V. cholerae*. Celui-ci passe très largement par l'addition d'amines libres portées par les chaînes d'acides gras secondaires du LPS (Hankins et al., 2012). Alors qu'on ne connaît pas les signaux régulateurs de ce remodelage chez les vibrios, il est montré dans d'autres espèces bactériennes que celui-ci est largement contrôlé par **le système à deux composants PhoPQ**. Ceci a par exemple été montré chez des espèces du genre *Salmonella* (Guo et al., 1998; Ernst et al., 2001; Groisman and Mouslim, 2006; Dalebroux and Miller, 2014) ou *Photobacterium* (Derzelle et al., 2004). Les travaux de thèse de Marylise Dupertuy avaient également montré un rôle de PhoPQ dans la résistance aux AMPs cationiques chez LGP32 (Dupertuy, 2010). Néanmoins, à ce moment-là,

on ignorait les capacités de LGP32 à envahir les hémocytes et à survivre au sein des vacuoles de phagocytoses. Cette connaissance permet de faire un parallèle très intéressant avec les salmonelles et leur résistance à l'élimination intracellulaire.

Plusieurs signaux peuvent induire le système PhoP-PhoQ chez les salmonelles : le pH, les cations divalents ( $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) ou la présence d'AMPs (Gunn and Richards, 2007) (Alpuche Aranda et al., 1992; Martin-Orozco et al., 2006), autant de signaux que LGP32 est susceptible de rencontrer dans l'hémocyte d'huître. Nous avons développé ici des tests de survie intracellulaire (article II) qui devraient nous permettre de vérifier le rôle du système PhoPQ dans la survie intracellulaire de LGP32. Il serait également intéressant de vérifier si l'induction massive d'une acyltransférase (phospholipase VS\_II0149) dans le transcriptome intracellulaire de LGP32 (article II, Table S1), n'est pas régulée par PhoPQ. Il est en effet montré dans d'autres espèces, que l'acyltransférase PagL qui appartient au régulon phoP est un déterminant majeur de la résistance aux AMPs par son rôle dans l'acylation du LPS (Kawasaki et al., 2007). Si cette hypothèse est vérifiée, une comparaison structurale du LPS de LGP32 et de son mutant « *Δphospholipase* » serait à envisager.

### **OMVs et système immunitaire des huîtres**

Un aspect que nous n'avons pas exploré dans cette thèse est celui de la fonction immunitaire des OMVs. Or chez les mammifères, des études ont montré qu'une injection d'OMVs de bactéries pathogènes humaines entraînait une immunisation des souris comme les *Shigella flexneri* (Camacho et al., 2011), *E. coli* (Kim et al., 2013), *Neisseria meningitidis* (Gonzalez et al., 2006) ou *V. cholerae* (Schild et al., 2008; Bishop et al., 2012). Par leur richesse en PAMPs, les OMVs sont ainsi souvent vues comme une piste vaccinale. L'huître est un invertébré, et à ce titre, elle ne produit pas d'anticorps. Néanmoins, il est aujourd'hui montré qu'on peut induire un priming immunitaire chez l'huître. Il serait intéressant de tester si une pré-injection d'OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 entraîne une « immunisation » chez l'huître. Une étude récente chez l'huître a montré qu'une pré-injection de *V. splendidus* (Clade), tuées par choc thermique, à des huîtres juvéniles induisait une réponse immunitaire protectrice contre une seconde injection de LGP32 vivants (Zhang et al., 2014). Par ailleurs, le même effet a été démontré après une pré-injection de Poly I:C (ARN double brin synthétique) suivie d'une injection du variant du virus à ARN double brin OsHV-1  $\mu$ var, pathogène de l'huître (Green and Montagnani, 2013). **Le rôle des OMVs dans le priming immunitaire des huîtres** serait ainsi une question intéressante à poser. Cette hypothèse est soutenue par les travaux récents de Ruby et coll. sur le modèle symbiotique *Vibrio fischeri* / calmar, qui met également en jeu le système immunitaire d'un mollusque. Les auteurs de ce travail montrent que le relargage de PAMPs



(ici le LPS) par le flagelle des vibrios joue un rôle majeur dans l'interaction avec l'hôte (Brennan et al., 2014). Ce relargage serait médié par les OMVs issues de la membrane qui recouvre le flagelle des vibrios, que l'on a pu largement voir se détacher du flagelle de *V. tasmaniensis* LGP32 dans notre étude (article I). Notre analyse protéomique a permis de montrer qu'au-delà des PAMPs attendus car constitutifs de la membrane externe, les OMVs de LGP32 contenaient de la flagelline, bien connue pour ses propriétés immunogènes. On peut aussi envisager que le relargage des OMVs extracellulaires participe au recrutement massif d'hémocytes que l'on observe sur les sites d'infections, et en conséquence, dans le cas de l'infection à LGP32, à la dissémination du pathogène par les phagocytes vers les autres tissus de l'huître.

### **Rôle de l'efflux de cuivre et des antioxydants dans la survie intracellulaire et la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32**

*Cette thèse a permis d'identifier la réponse antioxydante et l'efflux de cuivre comme des éléments majeurs de la capacité de survie intracellulaire et de la cytotoxicité de LGP32. Nous avons clairement montré que survie et cytotoxicité sont étroitement liées. La grande conservation des effecteurs identifiés chez les vibrios suggère qu'il s'agit de fonctions pouvant être nécessaires à la survie chez les vibrios adoptant de tels stades intracellulaires dans leurs hôtes. Concernant le modèle huître, nos résultats suggèrent que non seulement la production de ROS mais aussi l'influx de cuivre jouent un rôle majeur dans la phagocytose chez l'huître.*

Pour assurer le succès du processus infectieux, les bactéries pathogènes utilisent différents facteurs leur permettant d'envahir et de coloniser l'hôte, d'entraîner des dommages cellulaires et tissulaires, de survivre et d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte.

La transcriptomique des bactéries intracellulaires est un bel outil qui peut aider à l'identification de fonctions et de gènes impliqués dans la survie et la virulence. Les premières analyses transcriptomiques basées sur des microarrays ont servi à identifier les stratégies utilisées par des bactéries pathogènes pour s'adapter à l'hôte et la réponse de l'hôte à l'infection bactérienne (Westermann et al., 2012). Cette technique avait été utilisée dans l'interaction *Mycobacterium tuberculosis* avec les cellules dendritiques et les macrophages (Tailleux et al., 2008). Plus récemment, les analyses transcriptomiques basées sur le séquençage de l'ARN « RNAseq » sont des approches avec une vision globale sans *a priori* (Wang et al., 2009). Cette méthode a déjà été utilisée chez plusieurs pathogènes intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* et *bovis* dans les macrophages *in vitro* (Fontan et al., 2008; Nalpas et al., 2013) ou *Legionella pneumophila* dans les amibes (Weissenmayer et al., 2011). Dans cette thèse, nous avons utilisé l'outil transcriptomique

pour identifier les gènes candidats à la virulence et cytotoxicité de LGP32, qui sont deux fonctions dépendantes de l'invasion hémocytaire (Duperthuy et al., 2011 et article II). Le transcriptome intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32 a également été utilisé pour identifier les effecteurs impliqués dans la résistance à la phagocytose.

Le transcriptome intracellulaire de LGP32 a été réalisé 1 heure après phagocytose. Il a révélé la surexpression de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante et l'efflux de cuivre. Par génomique fonctionnelle, nous avons alors pu montrer l'importance de ces deux fonctions dans la survie de la bactérie dans les hémocytes, et leur rôle dans la survie intracellulaire et la virulence de LGP32 a été discuté dans l'article II. La question qui se pose alors est : que sait-on de ces fonctions dans la phagocytose chez l'huître ?

Alors que la notion de burst oxydatif a été très largement décrite pour son rôle dans la phagocytose chez l'huître (Bachère et al., 1991; Bachère et al., 2004; Poirier et al., 2014), il n'existe pas d'étude à notre connaissance sur l'homéostasie du cuivre dans les hémocytes d'huître. Or, la forte surexpression des gènes impliqués dans la réponse à l'efflux de cuivre dans le transcriptome intracellulaire du *Vibrio*, suggère un rôle important du cuivre dans le contrôle des pathogènes au cours de la phagocytose par les hémocytes. Dans d'autres modèles, la présence de cuivre dans les phagosomes de macrophages infectés par *Mycobacterium* vient conforter notre hypothèse (Wagner et al., 2005; Rowland and Niederweis, 2012). On peut supposer que ce mécanisme de défense contre les pathogènes intracellulaire soit conservé chez les phagocytes professionnels comme les macrophages et les amibes comme le proposent (German et al., 2013). Pour confirmer la présence de cuivre dans les phagosomes d'hémocytes envahis par LGP32, nous pourrions utiliser des sondes spécifiques du cuivre libre que nous pourrions tracer en microscopie à fluorescence. Cette technique a déjà été utilisée pour détecter la présence de zinc dans les phagosomes de macrophages contenant *Mycobacterium* (Botella et al., 2011). Nous pouvons également envisager de tracer le cuivre dans le phagosome en microscopie électronique. L'analyse du génome de *C. gigas* montre que les transporteurs du cuivre connus chez les macrophages humains existent chez l'huître. On trouve ainsi des homologues aux gènes codant pour des protéines impliqués dans l'accumulation de cuivre à l'intérieur du phagosome chez les macrophages infectés. Il s'agit du transporteur de cuivre Ctr1 à la membrane plasmique qui transporte le  $\text{Cu}^+$  dans le cytoplasme, de la protéine chaperonne ATOX1 qui lie le  $\text{Cu}^+$  dans le cytosol pour le délivrer au transporteur ATP7A situé à la membrane des phagosomes (German et al., 2013) (Figure 32). Afin d'étayer l'hypothèse d'un influx de cuivre microbicide dans la vacuole de phagocytose, nous devons envisager des expériences de génomique fonctionnelle. La seule méthode disponible chez *C. gigas* est l'ARN interférence. Nous pourrions ainsi essayer

d'éteindre l'expression de ces gènes afin de démontrer leur implication dans l'accumulation de cuivre dans les phagosomes d'hémocytes infectés. Il faut néanmoins signaler qu'à l'inverse d'autres invertébrés chez qui le RNAi fonctionne en routine, chez l'huître la technique n'est pas encore bien rodée. Pour l'instant, cette technique n'a été réalisée sur des hémocytes d'huître qu'*in vivo* (Choi et al., 2013). Les études préliminaires sur les hémocytes *in vitro* ne sont pas concluantes (Communication personnelle C. Montagnani).

Le rôle de l'efflux cuivre est décrit chez d'autres pathogènes intracellulaires comme *Pseudomonas aeruginosa* (Schwan et al., 2005), *Streptococcus pneumonia* (Shafeeq et al., 2011), *Listeria monocytogenes* (Francis and Thomas, 1997), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Singh et al., 2004; Osman et al., 2010; Achard et al., 2012) ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Ward et al., 2010; Wolschendorf et al., 2011). Il semblerait donc que la résistance au cuivre soit une étape cruciale des bactéries intracellulaires pour coloniser leur hôte. En revanche, chez *Vibrio cholerae* qui peut adopter des stades intracellulaires, *copA* et *cueR* sont nécessaires à la résistance au cuivre mais pas à la virulence (Marrero et al., 2012).

Nous avons mis en évidence l'implication de trois protéines impliquées dans la résistance au cuivre (*CopA*, *CusA* et *CusB*) et *in fine* dans la survie intracellulaire de LGP32 (Figure 32) mais il en existe peut-être d'autres. Trois ATPases de type P, contenant le motif D-K-T-G-T-[LIMV]-[TI] (PROSITE PS00154), sont prédites dans le génome de *Vibrio tasmaniensis* LGP32. On retrouve bien évidemment *copA* (VS\_0768) mais également VS\_1464 et VS\_2083 identiques à 31% et 56% à la séquence protéique de *ZntA* d'*E. coli* respectivement. Ces transporteurs jouent-ils un rôle dans le transport de zinc ? A l'inverse de *copA* qui est surexprimée 59 fois, VS\_1464 et VS\_2083 sont surexprimées 4,4 et 6,2 fois en conditions intracellulaire dans le RNAseq. L'induction de ces gènes à l'intérieur des hémocytes suggère la présence de zinc dans le phagosome comme précédemment démontré chez des macrophages envahit par *Mycobacterium* (Wagner et al., 2005; Botella et al., 2011).

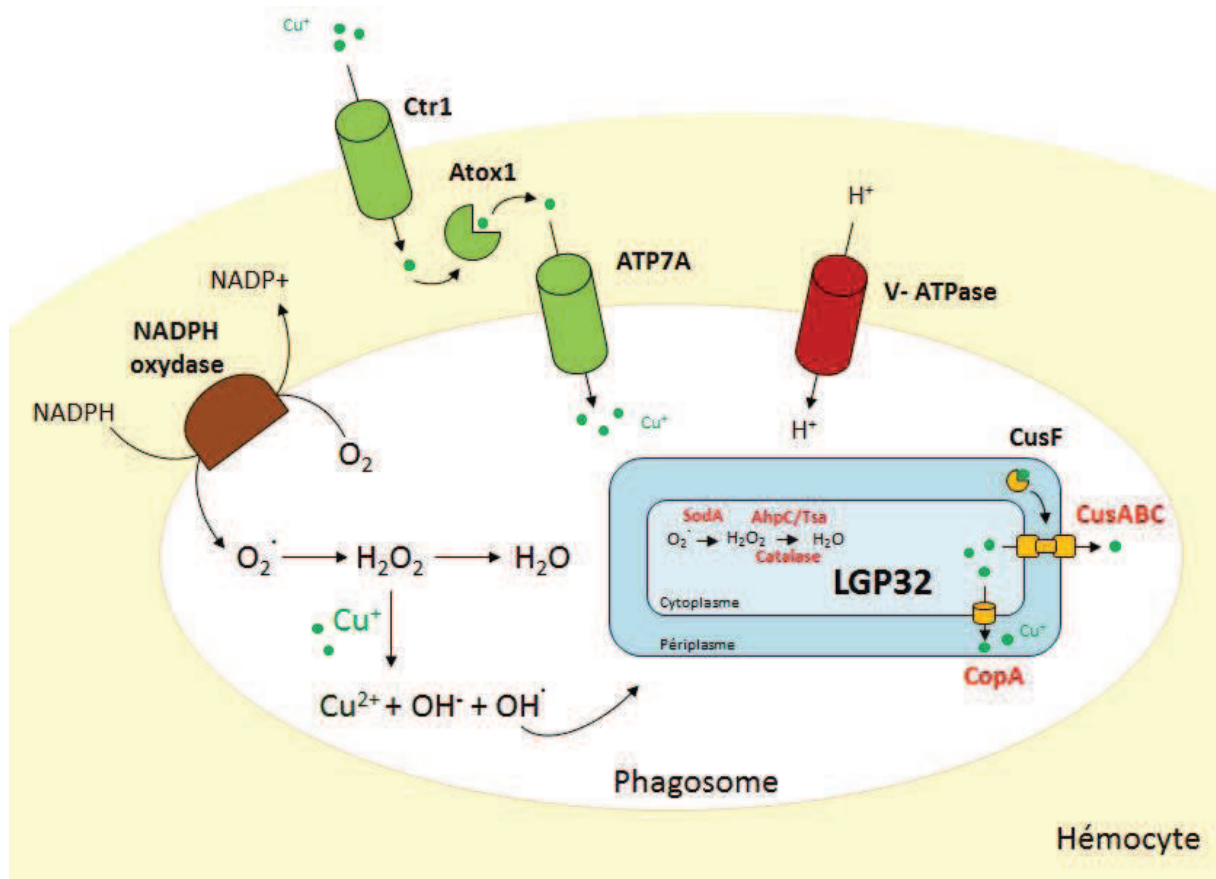


Figure 32. Modèle de la survie intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32 dans les hémocytes de l'huître *C. gigas*.

La protéine Ctr1 importe le  $\text{Cu}^+$  à travers la membrane plasmique de l'hémocyte. Le  $\text{Cu}^+$  cytoplasmique est ensuite délivré, via la protéine chaperonne ATOX1, à l'ATP7A qui est responsable du transport de cuivre dans la phagosome. La NADPH oxydase membranaire produit de l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ) qui génère spontanément du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qui réagit avec le  $\text{Cu}^{2+}$  pour former des radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$  et  $\text{OH}^-$ ) hautement toxiques pour la bactérie (réaction de Fenton). La v-ATPase importe les ions  $\text{H}^+$  à l'intérieur du phagosome. Les protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre (CopA, CusABC) et la réponse antioxydante (SodA, AhpC/Tsa, catalase) chez LGP32 sont représentées en rouge. A ce jour, seuls CopA, CusAB et SodA sont caractérisés comme étant impliqués dans la survie intracellulaire de LGP32 dans les hémocytes. SOD : superoxide dimutase. Ahp : alkyl hydroperoxide reductase. v-ATPase : ATPase vésiculaire.

Dans le génome de LGP32, on retrouve une « multicopper oxydase » CueO qui est décrite pour convertir le  $\text{Cu}^{2+}$  converti en  $\text{Cu}^+$  dans le périplasm (Grass and Rensing, 2001; Outten et al., 2001). A l'inverse de CopA et CusABC, CueO ne fonctionne qu'en condition aérobie. Il n'est donc pas surprenant que cette enzyme soit réprimée en condition intracellulaire où le *Vibro* se retrouve en hypoxie dans les hémocytes. En revanche, la surexpression de cueO, copA et cusAB dans le plasma peut s'expliquer par l'abondance de cuivre et la présence d'oxygène dans le plasma d'huître. En effet, la présence de la SOD extracellulaire à cuivre/zinc, comme étant la protéine majoritaire du plasma d'huître, indique l'importance de ce métal dans ce compartiment. Ces résultats suggèrent que la

résistance au cuivre est un élément essentiel à la survie de LGP32 dans l'huître, qui ne se limite pas à sa capacité de survie dans ses stades intracellulaires.

Enfin, les travaux réalisés dans cette thèse se sont essentiellement concentrés sur le pathogène, ses facteurs de virulence et de survie. Afin d'obtenir l'image la plus intégrée possible de son interaction avec l'huître, il conviendrait de regarder également la réponse des hémocytes de l'hôte à l'entrée du *Vibrio*. Ceci est rendu possible par la publication du génome de l'huître. On peut ici regretter de n'avoir pas gardé les ARNs polyA des cellules de l'hôte dans notre analyse transcriptomique. Un dual RNAseq nous aurait effet sans doute donné des informations précieuses sur l'interaction. En effet, les études réalisant simultanément le transcriptome du pathogène et de l'hôte permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction entre les deux organismes (Westermann et al., 2012; Xu et al., 2014). A défaut de ces données, nous disposons du transcriptome hémocytaire d'huîtres infectées (*in vivo*) par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al., 2011b). L'analyse de ces données devrait nous être précieuse. Nous pourrions ainsi regarder en miroir au transcriptome de la bactérie, l'expression des gènes d'huître potentiellement impliqués dans l'activité microbicide du phagosome comme ceux cités-ci plus haut dans cette discussion.

## **CONCLUSION GENERALE**



## CONCLUSION GENERALE

Les surmortalités d'huîtres *C. gigas* juvéniles, dites « estivales », sont le fruit d'une maladie multifactorielle qui se produit dans des milieux marins côtiers fortement anthropisés et qui met en jeu des conditions climatiques particulières (température de l'eau de mer) ainsi que des associations de pathogènes (virus herpes OsHV-1 et vibrios du clade Splendidus). La génétique de l'hôte joue aussi un rôle déterminant dans la susceptibilité aux mortalités estivales. On ignore encore très largement à l'heure actuelle les mécanismes explicatifs de ces mortalités et le poids relatif de chacun des facteurs décrits ci-dessus.

Cette thèse s'est concentrée sur une souche de *Vibrio* pathogène associée à ces mortalités : la souche *V. tasmaniensis* LGP32 isolée par Le Roux et collaborateurs en 2004 (Gay et al., 2004a; Gay et al., 2004b) et dont la capacité à envahir les hémocytes de l'huître avait été mise en évidence plus récemment dans notre équipe (Duperthuy et al., 2011).

Les résultats de la thèse ont permis de compléter la compréhension du processus infectieux de LGP32 vis-à-vis des hémocytes de l'huître. Nous avons mis en évidence une cytotoxicité de LGP32 sur les hémocytes qui s'exprime quelques heures après l'internalisation des LGP32. Nous avons montré qu'après lyse des hémocytes, les bactéries étaient libérées dans le milieu extracellulaire (article II). Il est vraisemblable que la lyse des cellules immunitaires par LGP32 est un processus essentiel à la libération du pathogène qui peut alors envahir de nouvelles cellules et ainsi coloniser rapidement les tissus de l'huître. Il faut également noter que cette lyse des cellules immunitaires de l'huître entraîne très certainement une diminution de l'efficacité de la réponse cellulaire et par conséquent un affaiblissement des défenses immunitaires de l'huître. On peut alors se poser la question du rôle d'une souche comme LGP32 dans la colonisation des huîtres par le virus OsHV-1, qui jusqu'à il y a peu d'années était présent dans les huîtres sans être identifié comme pathogène, le système immunitaire des huîtres suffisant à contrôler sa prolifération. Ainsi, les co-infections systématiques OsHV-1 / *Vibrio Splendidus* (clade) relevées depuis 2008 chez les huîtres juvéniles moribondes lors des épisodes de mortalités estivales pourraient résulter de surinfections létales sur des organismes immunodéprimés. Nos données de terrain relevées en 2011 lors d'un épisode de mortalité dans l'étang de Thau (projet Microgigas) montrent en effet que la dynamique des vibrios pathogènes (détection du gène *ompU* de LGP32) précède de quelques jours le pic de détection du virus OsHV-1 dans les huîtres (de Lorgeril et al., données non publiées).



Un résultat important de cette thèse a été d'identifier l'homéostasie du cuivre comme un composant majeur de sa capacité de survie dans les hémocytes d'huître. Or le cuivre est présent à des concentrations élevées dans l'hémolymphe des invertébrés marins. Ainsi chez les crustacés et les mollusques, la principale protéine de l'hémolymphe complexe le cuivre, donnant une couleur bleutée à l'hémolymphe. C'est le cas de l'hémocyanine qui assure le transport de l'oxygène chez les crustacés et certains mollusques. L'huître ne possède pas cette protéine, le transport de l'oxygène se faisant sous forme dissoute dans l'hémolymphe. En revanche, elle possède une superoxyde dismutase extracellulaire à cuivre/zinc qui est la protéine majoritaire du plasma d'huître. Ainsi, bien au-delà de leur capacité à survivre dans des vacuoles de phagocytose, les vibrios pathogènes ou commensaux capables de coloniser l'hémolymphe des huîtres doivent être équipés de transporteurs efficaces pour le contrôle de l'homéostasie du cuivre.

Ce raisonnement peut également être extrapolé aux écosystèmes marins côtiers comme les lagunes méditerranéennes dans lesquelles sont cultivées les huîtres et qui sont exposées aux contaminations chimiques d'origine anthropique, y compris aux polluants d'origine industrielle ou agricole. On retrouve ainsi dans l'environnement lagunaire des métaux lourds tels que du mercure, du cadmium, du plomb, du cuivre et du zinc. La concentration en cuivre peut ainsi varier au cours de l'année au gré des pratiques agricoles et des épisodes de pluie. Dans nos régions viticoles, ce sont des doses massives de cuivre qui sont utilisées pour leur activité antifongique sur les pathogènes de la vigne. Les importants épisodes pluvieux que l'on observe sont autant d'apports en cuivre vers lagunes méditerranéennes via le bassin versant. Il est donc important pour leur adaptation que les vibrios peuplant les lagunes, où sont cultivées les huîtres, soient tolérant à ces apports de cuivre. Il est ainsi vraisemblable que les gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre sont essentiels à la vie des vibrios non seulement chez les invertébrés marins mais aussi dans l'environnement marin côtier.

Les bactéries sont capables d'acquérir des mécanismes de résistance par mutation, par les intégrons, par transfert génétiques horizontaux ou verticaux, grâce aux éléments génétiques mobiles et ainsi les disséminer dans l'environnement. Les éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les transposons, les cassettes géniques associées aux intégrons jouent un rôle évolutif majeur dans l'adaptation des communautés microbiennes car ils sont le support, par exemple, de gène de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds et de gènes de virulence impliqué dans la pathogénicité. Les environnements riches en cuivre dans lesquels évoluent les vibrios, y compris les hôtes invertébrés auxquels ils sont associés, ont ainsi pu favoriser le transfert horizontal de gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre.

Au-delà de la seule homéostasie du cuivre, l'environnement a pu favoriser la sélection de traits de survie intracellulaire et de virulence chez LGP32, façonnant son adaptation à la vie intraphagocytaire. En effet, dans le milieu aquatique, les *Vibrio* sont en contact avec des protistes environnementaux, y compris des amibes, véritables phagocytes de l'environnement qui se nourrissent de micro-organismes par phagocytose. Or, la phagocytose est un processus très conservé au cours de l'évolution (Boulais et al., 2010). On peut supposer que l'acquisition de gènes de virulence par *V. tasmaniensis* LGP32, et notamment sa résistance à la phagocytose, proviendrait de la pression de sélection environnementale exercée par les phagocytes environnementaux. Des travaux sont d'ores et déjà entrepris dans le cadre de la thèse d'Aurore Poirier pour tester cette hypothèse. Les mutants générés dans le cadre de ma thèse sur les fonctions essentielles à la survie intrahémocytaire pourront notamment être mis à profit pour répondre à cette question évolutive.

Il faut enfin souligner ici que si nous avons étudié la souche *V. tasmaniensis* LGP32 isolée en 2004, les résultats de l'ANR Vibriogen coordonnée par Frédérique Le Roux montrent que ce sont des populations virulentes de vibrios du clade Splendidus plus que des souches virulentes qui sont associées aux mortalités d'huîtres juvéniles. Ainsi, au-delà de *V. tasmaniensis*, d'autres espèces de *Vibrio* appartenant au même clade Splendidus comme des *Vibrio crassostreae* sont impliquées dans les mortalités d'huître (F. Le Roux, communication personnelle; Lemire et al., 2014). Il sera intéressant de comparer les effets cytopathiques de ces diverses souches et d'approcher par là la diversité des interactions huîtres-vibrios. Avec le séquençage du génome de ces nombreuses souches (Le Roux et coll, données non publiées), nous disposons d'un outil de choix pour aborder cette question qui sera posée dans ce cadre de la thèse de Tristan Rubio.



## **BIBLIOGRAPHIE**



## **BIBLIOGRAPHIE**

### **-A-**

Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P.J., Tanguy, M. et al. (2005) Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* **106**: 1843-1850.

Abd, H., Weintraub, A., and Sandstrom, G. (2005) Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol* **7**: 1003-1008.

Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G.B., and Sandstrom, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 33-39.

Achard, M.E., Stafford, S.L., Bokil, N.J., Chartres, J., Bernhardt, P.V., Schembri, M.A. et al. (2012) Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochem J* **444**: 51-57.

Achard, M.E., Tree, J.J., Holden, J.A., Simpfendorfer, K.R., Wijburg, O.L., Strugnell, R.A. et al. (2010) The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is required for systemic virulence. *Infect Immun* **78**: 2312-2319.

Aladaileh, S., Nair, S.V., Birch, D., and Raftos, D.A. (2007) Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J Invertebr Pathol* **96**: 48-63.

Alonso, A., and Garcia-del Portillo, F. (2004) Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**: 181-191.

Alpuche Aranda, C.M., Swanson, J.A., Loomis, W.P., and Miller, S.I. (1992) *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10079-10083.

Altindis, E., Fu, Y., and Mekalanos, J.J. (2014) Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E1548-1556.

Altura, M.A., Heath-Heckman, E.A., Gillette, A., Kremer, N., Krachler, A.M., Brennan, C. et al. (2013) The first engagement of partners in the *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis is a two-step process initiated by a few environmental symbiont cells. *Environ Microbiol*.

Ammendola, S., Pasquali, P., Pistoia, C., Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G., and Battistoni, A. (2007) High-affinity Zn<sup>2+</sup> uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **75**: 5867-5876.

Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R. et al. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**: 618-625.

Arguello, J.M., Gonzalez-Guerrero, M., and Raimunda, D. (2011) Bacterial transition metal P(1B)-ATPases: transport mechanism and roles in virulence. *Biochemistry* **50**: 9940-9949.

Armstrong, P.B. (2006) Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology* **211**: 263-281.

Ashton-Alcox, K.A., and Ford, S.E. (1998) Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell* **30**: 195-204.

Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6161-6165.

Azumi, K., De Santis, R., De Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M.R. et al. (2003) Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics* **55**: 570-581.

## -B-

Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jolles, P., Fiala-Medioni, A., and Deutsch, J.S. (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J Mol Evol* **54**: 652-664.

Bachère, E., Chagot, D., and Grizel, H. (1988) Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev Comp Immunol* **12**: 549-559.

Bachère, E., Hervio, D., and Mialhe, E. (1991) Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* **11**: 173-180.

Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., and Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* **198**: 149-168.

Baek, W.K., Lee, H.S., Oh, M.H., Koh, M.J., Kim, K.S., and Choi, S.H. (2009) Identification of the *Vibrio vulnificus* *dhpCl* gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *J Microbiol* **47**: 624-632.

Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Morinigo, M.A., and Borrego, J.J. (1998) Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* **64**: 4269-4275.

Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J., and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* **46**: 418-422.

Bar-Haim, E., Gat, O., Markel, G., Cohen, H., Shafferman, A., and Velan, B. (2008) Interrelationship between dendritic cell trafficking and *Francisella tularensis* dissemination following airway infection. *PLoS Pathog* **4**: e1000211.

Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**: 269-280.

Bartos, M., Falkinham, J.O., and Palvlik, I. (2004) Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria – a review. *Vet Med* **49**: 161–170.

Beaven, A.E., and Paynter, K.T. (1999) Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. *Biol Bull* **196**: 26-33.

- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L., and Figueras, M.J. (2010) Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ Microbiol Rep* **2**: 34-43.
- Belland, R.J., Zhong, G., Crane, D.D., Hogan, D., Sturdevant, D., Sharma, J. et al. (2003) Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8478-8483.
- Bertinato, J., Swist, E., Plouffe, L.J., Brooks, S.P., and L'Abbe M, R. (2008) Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J* **409**: 731-740.
- Beyenbach, K.W., and Wieczorek, H. (2006) The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J Exp Biol* **209**: 577-589.
- Bielig, H., Dongre, M., Zurek, B., Wai, S.N., and Kufer, T.A. (2011a) A role for quorum sensing in regulating innate immune responses mediated by *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles (OMVs). *Gut Microbes* **2**: 274-279.
- Bielig, H., Rompikuntal, P.K., Dongre, M., Zurek, B., Lindmark, B., Ramstedt, M. et al. (2011b) NOD-like receptor activation by outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 strains is modulated by the quorum-sensing regulator HapR. *Infect Immun* **79**: 1418-1427.
- Bina, J.E., Provenzano, D., Wang, C., Bina, X.R., and Mekalanos, J.J. (2006) Characterization of the *Vibrio cholerae* vexAB and vexCD efflux systems. *Arch Microbiol* **186**: 171-181.
- Bina, X.R., Provenzano, D., Nguyen, N., and Bina, J.E. (2008) *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* **76**: 3595-3605.
- Binese, 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.
- Binet, M.R., and Poole, R.K. (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **473**: 67-70.
- Bishop, A.L., Schild, S., Patimalla, B., Klein, B., and Camilli, A. (2010) Mucosal immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles provides maternal protection mediated by antilipopolysaccharide antibodies that inhibit bacterial motility. *Infect Immun* **78**: 4402-4420.
- Bishop, A.L., Tarique, A.A., Patimalla, B., Calderwood, S.B., Qadri, F., and Camilli, A. (2012) Immunization of mice with *Vibrio cholerae* outer-membrane vesicles protects against hyperinfectious challenge and blocks transmission. *J Infect Dis* **205**: 412-421.
- Bliska, J.B., and Black, D.S. (1995) Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infect Immun* **63**: 681-685.
- Boardman, B.K., Meehan, B.M., and Fullner Satchell, K.J. (2007) Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export. *J Bacteriol* **189**: 1827-1835.
- Booth, B.A., Boesman-Finkelstein, M., and Finkelstein, R.A. (1984) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect Immun* **45**: 558-560.



Borgstahl, G.E., Parge, H.E., Hickey, M.J., Beyer, W.F., Jr., Hallewell, R.A., and Tainer, J.A. (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell* **71**: 107-118.

Botella, H., Stadthagen, G., Lugo-Villarino, G., de Chastellier, C., and Neyrolles, O. (2012) Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol* **20**: 106-112.

Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I. et al. (2011) Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe* **10**: 248-259.

Boulais, J., Trost, M., Landry, C.R., Dieckmann, R., Levy, E.D., Soldati, T. et al. (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* **6**: 423.

Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P., and Cellier, M.F. (2002) Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect Immun* **70**: 6032-6042.

Braun, V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 67-79.

Braun, V., and Focareta, T. (1991) Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Crit Rev Microbiol* **18**: 115-158.

Brennan, C.A., Hunt, J.R., Kremer, N., Krasity, B.C., Apicella, M.A., McFall-Ngai, M.J., and Ruby, E.G. (2014) A model symbiosis reveals a role for sheathed-flagellum rotation in the release of immunogenic lipopolysaccharide. *Elife* **3**: e01579.

Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**: 238-250.

Brotz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbaum, G., and Sahl, H.G. (1998) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* **30**: 317-327.

Bruggemann, H., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2006) Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol* **9**: 86-94.

Bulet, P., Stocklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**: 169-184.

-C-

Camacho, A.I., de Souza, J., Sanchez-Gomez, S., Pardo-Ros, M., Irache, J.M., and Gamazo, C. (2011) Mucosal immunization with *Shigella flexneri* outer membrane vesicles induced protection in mice. *Vaccine* **29**: 8222-8229.

Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., Perez De Rozas, A.M., Badiola, I., and Barbe, J. (2002) Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* virulence. *Infect Immun* **70**: 4721-4725.

- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., and Pruzzo, C. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* **57**: 469-476.
- Ceccarelli, D., and Colwell, R.R. (2014) *Vibrio* ecology, pathogenesis, and evolution. *Front Microbiol* **5**: 256.
- Cellier, M.F., Courville, P., and Campion, C. (2007) Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes Infect* **9**: 1662-1670.
- Chakraborty, K., Ghosh, S., Koley, H., Mukhopadhyay, A.K., Ramamurthy, T., Saha, D.R. et al. (2008) Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**: 2520-2537.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2002) *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* **195**: 1155-1166.
- Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., and Mondragon, A. (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* **301**: 1383-1387.
- Chatterjee, D., and Chaudhuri, K. (2011) Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* **585**: 1357-1362.
- Chatterjee, D., and Chaudhuri, K. (2013) *Vibrio cholerae* O395 outer membrane vesicles modulate intestinal epithelial cells in a NOD1 protein-dependent manner and induce dendritic cell-mediated Th2/Th17 cell responses. *J Biol Chem* **288**: 4299-4309.
- Chatterjee, S.N., and Chaudhuri, K. (2003) Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta* **1639**: 65-79.
- Chatterjee, S.N., and Chaudhuri, K. (2006) Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*: III. Biological functions. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 1-16.
- Chen, C.Y., Wu, K.M., Chang, Y.C., Chang, C.H., Tsai, H.C., Liao, T.L. et al. (2003) Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**: 2577-2587.
- Chen, F.R., Liu, P.C., and Lee, K.K. (1999) Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios* **98**: 95-111.
- Chen, F.R., Liu, P.C., and Lee, K.K. (2000) Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Z Naturforsch C* **55**: 94-99.
- Chen, G., Zhuchenko, O., and Kuspa, A. (2007a) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* **317**: 678-681.
- Chen, L.M., Kaniga, K., and Galan, J.E. (1996) *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* **21**: 1101-1115.
- Chen, Y.C., Chuang, Y.C., Chang, C.C., Jeang, C.L., and Chang, M.C. (2004) A K<sup>+</sup> uptake protein, TrkA, is required for serum, protamine, and polymyxin B resistance in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **72**: 629-636.

- Chen, Z., Lewis, K.A., Shultzaberger, R.K., Lyakhov, I.G., Zheng, M., Doan, B. et al. (2007b) Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory models. *Nucleic Acids Res* **35**: 6762-6777.
- Cheng, T.C. (1981) Invertebrates blood cells. In *Bivalves*. Ratcliffe, N.A., and Rowley, A.F. (eds). London: Academic Press, pp. 233-301.
- Cheng, T.C. (1996) Hemocytes: Forms and functions. In *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, U.o.M.S., College Park (ed). Maryland.
- Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G., and Ryu, S.E. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.
- Choi, S.H., Jee, B.Y., Lee, S.J., Cho, M.Y., Kim, J.W., Jeong, H.D., and Kim, K.H. (2013) Effects of RNA interference-mediated knock-down of hypoxia-inducible factor-alpha on respiratory burst activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **35**: 476-479.
- Chua, J., Vergne, I., Master, S., and Deretic, V. (2004) A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr Opin Microbiol* **7**: 71-77.
- Clay, H., Davis, J.M., Beery, D., Huttenlocher, A., Lyons, S.E., and Ramakrishnan, L. (2007) Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish. *Cell Host Microbe* **2**: 29-39.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., and Langlade, A. (2003) Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J Invertebr Pathol* **83**: 23-30.
- Comps, M., and Duthoit, J.L. (1979) Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). *Haliotis* **8**: 301-308.
- Corbett, D., Schuler, S., Glenn, S., Andrew, P.W., Cavet, J.S., and Roberts, I.S. (2011) The combined actions of the copper-responsive repressor CsoR and copper-metallochaperone CopZ modulate CopA-mediated copper efflux in the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **81**: 457-472.
- Corporeau, C., Groisillier, A., Jeudy, A., Barbeyron, T., Fleury, E., Fabioux, C. et al. (2011) A functional study of transforming growth factor-beta from the gonad of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* **13**: 971-980.
- Correa, N.E., Lauriano, C.M., McGee, R., and Klose, K.E. (2000) Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. *Mol Microbiol* **35**: 743-755.
- Cossart, P., and Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Courville, P., Chaloupka, R., and Cellier, M.F. (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem Cell Biol* **84**: 960-978.
- Coward, C., Sait, L., Cogan, T., Humphrey, T.J., and Maskell, D.J. (2013) O-antigen repeat number in *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* is important for egg contamination, colonisation of the chicken reproductive tract and survival in egg albumen. *FEMS Microbiol Lett* **343**: 169-176.

Cowley, S.C., Myltseva, S.V., and Nano, F.E. (1996) Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol Microbiol* **20**: 867-874.

Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363-378.

Cui, J., Kaandorp, J.A., and Lloyd, C.M. (2008) Simulating in vitro transcriptional response of zinc homeostasis system in *Escherichia coli*. *BMC Syst Biol* **2**: 89.

## -D-

Dalebroux, Z.D., and Miller, S.I. (2014) *Salmonellae* PhoPQ regulation of the outer membrane to resist innate immunity. *Curr Opin Microbiol* **17**: 106-113.

Dalhammar, G., and Steiner, H. (1984) Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur J Biochem* **139**: 247-252.

Damo, S.M., Kehl-Fie, T.E., Sugitani, N., Holt, M.E., Rathi, S., Murphy, W.J. et al. (2013) Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 3841-3846.

Daugherty, A., Suvarnapunya, A.E., and Runyen-Janecky, L. (2012) The role of oxyR and soxRS in oxidative stress survival in *Shigella flexneri*. *Microbiol Res* **167**: 238-245.

Davies, B.W., Bogard, R.W., Dupes, N.M., Gerstenfeld, T.A., Simmons, L.A., and Mekalanos, J.J. (2011) DNA damage and reactive nitrogen species are barriers to *Vibrio cholerae* colonization of the infant mouse intestine. *PLoS Pathog* **7**: e1001295.

Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2009) High-throughput sequencing reveals suppressors of *Vibrio cholerae* rpoE mutations: one fewer porin is enough. *Nucleic Acids Res* **37**: 5757-5767.

De Decker, S., and Saulnier, D. (2011) Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 691-699.

De Groote, M.A., Ochsner, U.A., Shiloh, M.U., Nathan, C., McCord, J.M., Dinauer, M.C. et al. (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13997-14001.

de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachere, E. (2011a) Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *Plos One* **6**: e23142.

de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachère, E. (2011b) Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression analysis. *PLoS ONE* **5**: e23142.

de Souza Santos, M., and Orth, K. (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* Escapes the Vacuole and Establishes a Replicative Niche in the Cytosol of Epithelial Cells. *MBio* **5**.

- Deane, S.M., Robb, F.T., Robb, S.M., and Woods, D.R. (1989) Nucleotide sequence of the *Vibrio alginolyticus* calcium-dependent, detergent-resistant alkaline serine exoprotease A. *Gene* **76**: 281-288.
- Deatherage, B.L., Lara, J.C., Bergsbaken, T., Rassouljian Barrett, S.L., Lara, S., and Cookson, B.T. (2009) Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* **72**: 1395-1407.
- DeCoursey, T.E. (2010) Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiology (Bethesda)* **25**: 27-40.
- Defer, D., Bourgougnon, N., and Fleury, Y. (2009) Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture* **293**: 1-7.
- Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B. et al. (2013) Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: the bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol* **34**: 1439-1447.
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quere, C., Miner, P. et al. (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *J Exp Biol* **206**: 3053-3064.
- Delston, R.B., Kothary, M.H., Shangraw, K.A., and Tall, B.D. (2003) Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Can J Microbiol* **49**: 525-529.
- Derzelle, S., Turlin, E., Duchaud, E., Pages, S., Kunst, F., Givaudan, A., and Danchin, A. (2004) The PhoP-PhoQ two-component regulatory system of *Photobacterium luminescens* is essential for virulence in insects. *J Bacteriol* **186**: 1270-1279.
- Desriac, F. (2013) Bivalves et Probiotiques : Sélection et étude de bactéries productrices de peptides antibactériens en vue d'une utilisation comme probiotiques en aquaculture. In: Université de Bretagne Occidentale.
- Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., and Fleury, Y. (2014) Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiol Lett* **350**: 107-116.
- Destoumieux-Garzón, D., Duperthuy, M., Vanhove, A.S., Schmitt, P., and Wai, S.N. (2014) Resistance to antimicrobial peptides in vibrios. *Antibiotics*.
- Diacovich, L., and Gorvel, J.P. (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* **8**: 117-128.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goic, N., Lambert, C., Volety, A.K., and Soudant, P. (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* **7**: e46594.
- Dryselius, R., Kurokawa, K., and Iida, T. (2007) *Vibrionaceae*, a versatile bacterial family with evolutionarily conserved variability. *Res Microbiol* **158**: 479-486.
- Duperthuy, M. (2010) Effecteurs moléculaires de l'association *Crassostrea gigas* / *Vibrio splendidus* : Rôle de la porine OmpU dans les mécanismes de résistance et d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. In: Université Montpellier 2.

Duperthuy, M., Sjostrom, A.E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B.E., and Wai, S.N. (2013) Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **9**: e1003620.

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

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

Dussurget, O., Stewart, G., Neyrolles, O., Pescher, P., Young, D., and Marchal, G. (2001) Role of *Mycobacterium tuberculosis* copper-zinc superoxide dismutase. *Infect Immun* **69**: 529-533.

Dutta, S., Iida, K., Takade, A., Meno, Y., Nair, G.B., and Yoshida, S. (2004) Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol Immunol* **48**: 965-969.

Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V.C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S.M. et al. (2005) Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3465-3470.

## -E-

Edwin, A., Grundstrom, C., Wai, S.N., Ohman, A., Stier, G., and Sauer-Eriksson, A.E. (2014) Domain isolation, expression, purification and proteolytic activity of the metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *Protein Expr Purif* **96**: 39-47.

Ellis, T.N., and Kuehn, M.J. (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 81-94.

Elluri, S., Enow, C., Vdovikova, S., Rompikuntal, P.K., Dongre, M., Carlsson, S. et al. (2014) Outer Membrane Vesicles Mediate Transport of Biologically Active *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) from *V. cholerae* Strains. *PLoS One* **9**: e106731.

Elston, R.A., Hasegawa, H., Humphrey, K.L., Polyak, I.K., and Hase, C.C. (2008) Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis Aquat Organ* **82**: 119-134.

Ernst, R.K., Guina, T., and Miller, S.I. (2001) *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* **3**: 1327-1334.

Escoubas, J.M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C., and Roch, P. (1999) Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Lett* **453**: 293-298.

Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E., Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2007) Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* **153**: 2989-2997.

Estes, R.M., Friedman, C.S., Elston, R.A., and Herwig, R.P. (2004) Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **58**: 223-230.

-F-

- Fallon, P.G., Allen, R.L., and Rich, T. (2001) Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man. *Trends Immunol* **22**: 63-66.
- Fang, F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**: 820-832.
- Fee, J.A. (1991) Regulation of sod genes in *Escherichia coli*: relevance to superoxide dismutase function. *Mol Microbiol* **5**: 2599-2610.
- Fenton, H.J.H. (1984) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc, Trans* **65**: 899-911.
- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J.H., and Swanson, M.S. (2006) Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun* **74**: 3285-3295.
- Fernandez-Prada, C.M., Hoover, D.L., Tall, B.D., Hartman, A.B., Kopelowitz, J., and Venkatesan, M.M. (2000) *Shigella flexneri* IpaH(7.8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect Immun* **68**: 3608-3619.
- Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**: 355-366.
- Flannagan, R.S., Jaumouille, V., and Grinstein, S. (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**: 61-98.
- Fleury, E., Fabioux, C., Lelong, C., Favrel, P., and Huvet, A. (2008) Characterization of a gonad-specific transforming growth factor-beta superfamily member differentially expressed during the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* **410**: 187-196.
- Fleury, E., Huvet, A., Lelong, C., de Lorgeril, J., Boulo, V., Gueguen, Y. et al. (2009) Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **10**: 341.
- Fontan, P., Aris, V., Ghanny, S., Soteropoulos, P., and Smith, I. (2008) Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* **76**: 717-725.
- Forbes, J.R., and Gros, P. (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* **9**: 397-403.
- Forbes, J.R., and Gros, P. (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood* **102**: 1884-1892.
- Forde, C.B., Shi, X., Li, J., and Roberts, M. (1999) *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on bvg-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun* **67**: 5972-5978.
- Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffre, A., Sabio y Garcia, J., Morbidoni, H.R., de la Paz Santangelo, M. et al. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**: 3-66.
- Francis, M.S., and Thomas, C.J. (1997) Mutants in the CtpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog* **22**: 67-78.

Franco, I.S., Shuman, H.A., and Charpentier, X. (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* **11**: 1435-1443.

Francois, M., Le Cabec, V., Dupont, M.A., Sansonetti, P.J., and Maridonneau-Parini, I. (2000) Induction of necrosis in human neutrophils by *Shigella flexneri* requires type III secretion, IpaB and IpaC invasins, and actin polymerization. *Infect Immun* **68**: 1289-1296.

Franke, S., Grass, G., Rensing, C., and Nies, D.H. (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 3804-3812.

Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., and Rediers, H. (2011) *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis* **34**: 643-661.

Frees, D., Brondsted, L., and Ingmer, H. (2013) Bacterial proteases and virulence. *Subcell Biochem* **66**: 161-192.

Fullner, K.J., and Mekalanos, J.J. (2000) In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J* **19**: 5315-5323.

Furuta, N., Tsuda, K., Omori, H., Yoshimori, T., Yoshimura, F., and Amano, A. (2009) *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun* **77**: 4187-4196.

## -G-

Gabbianelli, R., Signoretti, C., Marta, I., Battistoni, A., and Nicolini, L. (2004) *Vibrio cholerae* periplasmic superoxide dismutase: isolation of the gene and overexpression of the protein. *J Biotechnol* **109**: 123-130.

Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., and Battistoni, A. (2011) Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol* **11**: 36.

Gabbiani, C., Scaletti, F., Massai, L., Michelucci, E., Cinellu, M.A., and Messori, L. (2012) Medicinal gold compounds form tight adducts with the copper chaperone Atox-1: biological and pharmacological implications. *Chem Commun (Camb)* **48**: 11623-11625.

Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.

Galan, J.E. (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 53-86.

Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M.E., D'Orlando, V., and Galdiero, M. (2012) Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins. *Curr Protein Pept Sci* **13**: 843-854.

Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B. et al. (2008) Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun* **76**: 1825-1836.

Galtsoff, P.S. (1964) *The american oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: US Department of Interior.



- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**: 710-720.
- Garcia-del Portillo, F., Stein, M.A., and Finlay, B.B. (1997) Release of lipopolysaccharide from intracellular compartments containing *Salmonella typhimurium* to vesicles of the host epithelial cell. *Infect Immun* **65**: 24-34.
- Garcia-del Portillo, F., Nunez-Hernandez, C., Eisman, B., and Ramos-Vivas, J. (2008) Growth control in the *Salmonella*-containing vacuole. *Curr Opin Microbiol* **11**: 46-52.
- Garnier, M., Labreuche, Y., and Nicolas, J.L. (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol* **31**: 358-365.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., and Nicolas, J.L. (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* **53**: 187-196.
- Gay, M., Berthe, F.C., and Le Roux, F. (2004a) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Organ* **59**: 49-56.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.M., and Le Roux, F. (2004b) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ* **62**: 65-74.
- Genthner, F.J., Volety, A.K., Oliver, L.M., and Fisher, W.S. (1999) Factors influencing *in vitro* killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl Environ Microbiol* **65**: 3015-3020.
- German, N., Doyscher, D., and Rensing, C. (2013) Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* **8**: 1257-1264.
- Glinski, Z., and Jarosz, J. (1997) Molluscan immune defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **45**: 149-155.
- Goarant, C., Herlin, J., Brizard, R., Marteau, A.L., Martin, C., and Martin, B. (2000) Toxic factors of *Vibrio* strains pathogenic to shrimp. *Dis Aquat Organ* **40**: 101-107.
- Goguen, J.D., Hoe, N.P., and Subrahmanyam, Y.V. (1995) Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches. *Infect Agents Dis* **4**: 47-54.
- Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H., and Sjostedt, A. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* **71**: 5940-5950.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.C., Gueguen, Y., and Bachère, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1089-1097.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugnère, M. et al. (2007) Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17759-17764.
- Gonzalez, S., Caballero, E., Soria, Y., Cobas, K., Granadillo, M., and Pajon, R. (2006) Immunization with *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles prevents bacteremia in neonatal mice. *Vaccine* **24**: 1633-1643.

- Goo, S.Y., Lee, H.J., Kim, W.H., Han, K.L., Park, D.K., Kim, S.M. et al. (2006) Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis. *Infect Immun* **74**: 5586-5594.
- Gordon, A.H., Hart, P.D., and Young, M.R. (1980) Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature* **286**: 79-80.
- Goswami, T., Bhattacharjee, A., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M., and Blackwell, J.M. (2001) Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochem J* **354**: 511-519.
- Govoni, G., Canonne-Hergaux, F., Pfeifer, C.G., Marcus, S.L., Mills, S.D., Hackam, D.J. et al. (1999) Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* **67**: 2225-2232.
- Grass, G., and Rensing, C. (2001) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 902-908.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Franke, S., Nies, D.H., and Rensing, C. (2001) ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4664-4667.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., and Rensing, C. (2005a) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**: 1604-1611.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C.J., Rensing, C., Nies, D.H., and Munkelt, D. (2005b) FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**: 9-18.
- Green, T.J., and Montagnani, C. (2013) Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 muvar). *Fish Shellfish Immunol* **35**: 382-388.
- Green, T.J., Dixon, T.J., Devic, E., Adlard, R.D., and Barnes, A.C. (2009) Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol* **26**: 799-810.
- Green, T.J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N., and Speck, P. (2014a) Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **36**: 151-157.
- Green, T.J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O'Connor, W., and Speck, P. (2014b) Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Res.*
- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D., and Demple, B. (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6181-6185.
- Groisman, E.A., and Mouslim, C. (2006) Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. *Nat Rev Microbiol* **4**: 705-709.

Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., and Gros, P. (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* **185**: 717-730.

Gudipaty, S.A., Larsen, A.S., Rensing, C., and McEvoy, M.M. (2012) Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS Microbiol Lett* **330**: 30-37.

Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.G., Franck, V. et al. (2009) Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol Immunol* **46**: 516-522.

Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguère, C., Girardot, A.L., Garnier, J. et al. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**: 139-145.

Guillier, M., Gottesman, S., and Storz, G. (2006) Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes Dev* **20**: 2338-2348.

Gunn, J.S., and Richards, S.M. (2007) Recognition and integration of multiple environmental signals by the bacterial sensor kinase PhoQ. *Cell Host Microbe* **1**: 163-165.

Guo, L., Lim, K.B., Poduje, C.M., Daniel, M., Gunn, J.S., Hackett, M., and Miller, S.I. (1998) Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**: 189-198.

## -H-

Ha, C., Kim, S.K., Lee, M.N., and Lee, J.H. (2014) Quorum sensing-dependent metalloprotease *VvpE* is important in the virulence of *Vibrio vulnificus* to invertebrates. *Microb Pathog* **71-72**: 8-14.

Haas, A. (2007) The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**: 311-330.

Haiko, J., and Westerlund-Wikstrom, B. (2013) The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* **2**: 1242-1267.

Ham, H., Sreelatha, A., and Orth, K. (2011) Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nat Rev Microbiol* **9**: 635-646.

Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**: 423-434.

Hankins, J.V., Madsen, J.A., Giles, D.K., Brodbelt, J.S., and Trent, M.S. (2012) Amino acid addition to *Vibrio cholerae* LPS establishes a link between surface remodeling in gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 8722-8727.

Hankins, J.V., Madsen, J.A., Giles, D.K., Childers, B.M., Klose, K.E., Brodbelt, J.S., and Trent, M.S. (2011) Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol Microbiol* **81**: 1313-1329.

Hantke, K. (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* **8**: 196-202.

Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., and Galan, J.E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**: 815-826.

- 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.
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D.N., Lind, E.J., and Hase, C.C. (2009) Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **85**: 123-131.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**: 344-362.
- He, X., Zhang, Y., and Yu, Z. (2011) An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: molecular characterization and gene expression. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 870-876.
- Hebrard, M., Viala, J.P., Meresse, S., Barras, F., and Aussel, L. (2009) Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol* **191**: 4605-4614.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J. et al. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.
- Heimberger, A., and Eisenstark, A. (1988) Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **154**: 392-397.
- Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **186**: 3794-3805.
- Herpin, A., Favrel, P., and Cunningham, C. (2002) Gene structure and expression of *cg*-ALR1, a type I activin-like receptor from the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Gene* **301**: 21-30.
- Herpin, A., Badariotti, F., Rodet, F., and Favrel, P. (2004) Molecular characterization of a new leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor from a bivalve mollusc: evolutionary implications. *Biochim Biophys Acta* **1680**: 137-144.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Favrel, P., and Cunningham, C. (2007) A tolloid homologue from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene Expr Patterns* **7**: 700-708.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F., Favrel, P., and Cunningham, C. (2005) Structural and functional evidence for a singular repertoire of BMP receptor signal transducing proteins in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggests a shared ancestral BMP/activin pathway. *FEBS J* **272**: 3424-3440.
- Hibbetts, K., Hines, B., and Williams, D. (1999) An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med* **13**: 302-308.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P. et al. (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* **300**: 349-365.
- Hine, P.M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **9**: 367-385.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.
- Hong, G.E., Kim, D.G., Park, E.M., Nam, B.H., Kim, Y.O., and Kong, I.S. (2009) Identification of *Vibrio anguillarum* outer membrane vesicles related to immunostimulation in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 437-439.

Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**: 525-537.

Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., and Cunningham, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* **343**: 211-220.

Huynh, K.K., and Grinstein, S. (2007) Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 452-462.

Hybiske, K., and Stephens, R.S. (2008) Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 99-110.

-|-

Ichinose, Y., Yamamoto, K., Nakasone, N., Tanabe, M.J., Takeda, T., Miwatani, T., and Iwanaga, M. (1987) Enterotoxicity of El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **55**: 1090-1093.

Ikeda, J.S., Janakiraman, A., Kehres, D.G., Maguire, M.E., and Slauch, J.M. (2005) Transcriptional regulation of sitABCD of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by MntR and Fur. *J Bacteriol* **187**: 912-922.

Imlay, J.A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* **11**: 443-454.

Imlay, J.A., and Linn, S. (1986) Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **166**: 519-527.

Imlay, J.A., and Linn, S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302-1309.

Imlay, K.R., and Imlay, J.A. (1996) Cloning and analysis of sodC, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2564-2571.

Iqbal, A., Azim, M.K., Hashmi, N., Ali, S.A., and Musharaf, S.G. (2011) Structural characterization of metalloprotease vibriolysin of cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Protein Pept Lett* **18**: 287-294.

Isberg, R.R., and Barnes, P. (2001) Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci* **114**: 21-28.

Ishihara, M., Kawanishi, A., Watanabe, H., Tomochika, K., Miyoshi, S., and Shinoda, S. (2002) Purification of a serine protease of *Vibrio parahaemolyticus* and its characterization. *Microbiol Immunol* **46**: 298-303.

Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2007) cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **148**: 160-166.

Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2008) Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **150**: 409-417.

Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2009) A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol Immunol* **46**: 1768-1774.

Itoh, N., Kamitaka, R., Takahashi, K.G., and Osada, M. (2009) Identification and characterization of multiple beta-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*.

Itoh, N., Okada, Y., Takahashi, K.G., and Osada, M. (2010a) Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **29**: 126-135.

Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2007) cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol* **23**: 957-968.

Itoh, N., Xue, Q.G., Schey, K.L., Li, Y., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2010b) Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **158** 9-22.

## -J-

Jabado, N., Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Picard, V., and Gros, P. (2002) Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells. *Blood* **100**: 2617-2622.

Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., and Gros, P. (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med* **192**: 1237-1248.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2005) *Immunobiology, the immune system in health and disease*

Jeffries, V.E. (1982) Three *vibrio* strains pathogenic to larvae of *C. gigas* and *O. edulis*. . *Aquaculture* **29**: 201-226.

Jemaa, M., Morin, N., Cavelier, P., Cau, J., Strub, J.M., and Delsert, C. (2014) Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *J Exp Biol* **217**: 3067-3077.

Jo, P.G., Choi, Y.K., and Choi, C.Y. (2008) Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **147**: 460-469.

Johnson, C.N. (2013) Fitness factors in vibrios: a mini-review. *Microb Ecol* **65**: 826-851.

Johnson, J.A., Panigrahi, P., and Morris, J.G., Jr. (1992) Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. *Infect Immun* **60**: 864-869.

Josenshans, C., and Suerbaum, S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**: 605-614.

## -K-

Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1998) Delivery of the non-membrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells by using *Shigella flexneri* membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1476-1483.

Kamada, N., Seo, S.U., Chen, G.Y., and Nunez, G. (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* **13**: 321-335.

- Kamada, N., Kim, Y.G., Sham, H.P., Vallance, B.A., Puente, J.L., Martens, E.C., and Nunez, G. (2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science* **336**: 1325-1329.
- Kan, B., Habibi, H., Schmid, M., Liang, W., Wang, R., Wang, D., and Jungblut, P.R. (2004) Proteome comparison of *Vibrio cholerae* cultured in aerobic and anaerobic conditions. *Proteomics* **4**: 3061-3067.
- Kang, I.H., Kim, J.S., and Lee, J.K. (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *J Microbiol Biotechnol* **17**: 1399-1402.
- Kato, S., Muro, M., Akifusa, S., Hanada, N., Semba, I., Fujii, T. et al. (1995) Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect Immun* **63**: 3914-3919.
- Kawasaki, K., China, K., and Nishijima, M. (2007) Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **189**: 4911-4919.
- Kennedy, V., Newell, R., and Eble, A. (1996) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*.
- Kenneth, T. (2009) Bacterial Defense against Phagocytosis. In *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Bacteriology, U.o.W.-M.D.o. (ed).
- Kesty, N.C., Mason, K.M., Reedy, M., Miller, S.E., and Kuehn, M.J. (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* **23**: 4538-4549.
- Khelef, N., Lecuit, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* **8**: 457-470.
- Kim, J.S., Choi, S.H., and Lee, J.K. (2006) Lysine decarboxylase expression by *Vibrio vulnificus* is induced by SoxR in response to superoxide stress. *J Bacteriol* **188**: 8586-8592.
- Kim, J.S., Sung, M.H., Kho, D.H., and Lee, J.K. (2005) Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* **187**: 5984-5995.
- Kim, O.Y., Hong, B.S., Park, K.S., Yoon, Y.J., Choi, S.J., Lee, W.H. et al. (2013) Immunization with *Escherichia coli* outer membrane vesicles protects bacteria-induced lethality via Th1 and Th17 cell responses. *J Immunol* **190**: 4092-4102.
- Kim, S., Bang, Y.J., Kim, D., Lim, J.G., Oh, M.H., and Choi, S.H. (2014) Distinct characteristics of OxyR2, a new OxyR-type regulator, ensuring expression of Peroxiredoxin 2 detoxifying low levels of hydrogen peroxide in *Vibrio vulnificus*. *Mol Microbiol*.
- Kim, Y.R., Kim, B.U., Kim, S.Y., Kim, C.M., Na, H.S., Koh, J.T. et al. (2010) Outer membrane vesicles of *Vibrio vulnificus* deliver cytolysin-hemolysin VvhA into epithelial cells to induce cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 607-612.
- Kimoto, R., Funahashi, T., Yamamoto, N., Miyoshi, S., Narimatsu, S., and Yamamoto, S. (2001) Identification and characterization of the *sodA* genes encoding manganese superoxide dismutases in *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol* **45**: 135-142.

- Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S. (2008) Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 781-795.
- Kirkup, B.C., Jr., Chang, L., Chang, S., Gevers, D., and Polz, M.F. (2010) *Vibrio* chromosomes share common history. *BMC Microbiol* **10**: 137.
- Kitagawa, R., Takaya, A., Ohya, M., Mizunoe, Y., Takade, A., Yoshida, S. et al. (2010) Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J Bacteriol* **192**: 5645-5656.
- Klomp, A.E., Tops, B.B., Van Denberg, I.E., Berger, R., and Klomp, L.W. (2002) Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem J* **364**: 497-505.
- Knodler, L.A., and Steele-Mortimer, O. (2003) Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* **4**: 587-599.
- Kohen, R., and Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**: 620-650.
- Koropatnick, T.A., Engle, J.T., Apicella, M.A., Stabb, E.V., Goldman, W.E., and McFall-Ngai, M.J. (2004) Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism. *Science* **306**: 1186-1188.
- Kothary, M.H., Delston, R.B., Curtis, S.K., McCardell, B.A., and Tall, B.D. (2001) Purification and characterization of a vulnificolysin-like cytolysin produced by *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3707-3711.
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R., and Otvos, L., Jr. (2001) The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**: 3016-3026.
- Kreger, A.S., Bernheimer, A.W., Etkin, L.A., and Daniel, L.W. (1987) Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infect Immun* **55**: 3209-3212.
- Kremer, N., Schwartzman, J., Augustin, R., Zhou, L., Ruby, E.G., Hourdez, S., and McFall-Ngai, M.J. (2014) The dual nature of haemocyanin in the establishment and persistence of the squid-*vibrio* symbiosis. *Proc Biol Sci* **281**: 20140504.
- Kuchel, R.P., Aladaileh, S., Birch, D., Vella, N., and Raftos, D.A. (2010) Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *J Invertebr Pathol* **104**: 97-104.
- Kulp, A., and Kuehn, M.J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.
- Kumar, Y., and Valdivia, R.H. (2009) Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe* **5**: 593-601.
- Kwon, Y.T., Kim, J.O., Moon, S.Y., Yoo, Y.D., and Rho, H.M. (1995) Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Gene* **152**: 59-63.



- Labreuche, Y., Soudant, P., Gonçalves, M., Lambert, C., and Nicolas, J.L. (2006a) Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **30**: 367-379.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., and Nicolas, J.L. (2006b) Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect* **8**: 2715-2724.
- 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.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C. et al. (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ* **46**: 139-145.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., and Paillard, C. (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol* **15**: 225-240.
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J. et al. (2007) *In-vitro* modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* **270**: 413-421.
- Lang, R.P., Bayne, C.J., Camara, M.D., Cunningham, C., Jenny, M.J., and Langdon, C.J. (2009) Transcriptome profiling of selectively bred Pacific oyster *Crassostrea gigas* families that differ in tolerance of heat shock. *Mar Biotechnol* **11**: 650-668.
- Lantz, M.S. (1997) Are bacterial proteases important virulence factors? *J Periodontal Res* **32**: 126-132.
- Le Quere, H., Herpin, A., Huvet, A., Lelong, C., and Favrel, P. (2009) Structural and functional characterizations of an Activin type II receptor orthologue from the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Gene* **436**: 101-107.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777-784.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B. et al. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* **15**: 251-258.
- Le Roux, F., Zouine, M., Chakroun, N., Binesse, J., Saulnier, D., Bouchier, C. et al. (2009) Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planktonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol* **11**: 1959-1970.
- Lebrun, I., Marques-Porto, R., Pereira, A.S., Pereira, A., and Perpetuo, E.A. (2009) Bacterial toxins: an overview on bacterial proteases and their action as virulence factors. *Mini Rev Med Chem* **9**: 820-828.
- Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B., and Cossart, P. (2000) A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10008-10013.

- Lee, C.Y., Su, S.C., and Liaw, R.B. (1995) Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* **141** ( Pt 10): 2569-2576.
- Lee, C.Y., Cheng, M.F., Yu, M.S., and Pan, M.J. (2002a) Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 31-37.
- Lee, J.H., Ahn, S.H., Kim, S.H., Choi, Y.H., Park, K.J., and Kong, I.S. (2002b) Characterization of *Vibrio mimicus* phospholipase A (PhIA) and cytotoxicity on fish cell. *Biochem Biophys Res Commun* **298**: 269-276.
- Lee, K.K., Yu, S.R., and Liu, P.C. (1997) Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr Microbiol* **34**: 110-117.
- Leibbrandt, M.E., and Koropatnick, J. (1994) Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zinc. *Toxicol Appl Pharmacol* **124**: 72-81.
- Lelong, C., Mathieu, M., and Favrel, P. (2000) Structure and expression of mGDF, a new member of the transforming growth factor-beta superfamily in the bivalve mollusc *Crassostrea gigas*. *Eur J Biochem* **267**: 3986-3993.
- Lelong, C., Mathieu, M., and Favrel, P. (2001) Identification of new bone morphogenetic protein-related members in invertebrates. *Biochimie* **83**: 423-426.
- Lelong, C., Badarlotti, F., Le Quere, H., Rodet, F., Dubos, M.P., and Favrel, P. (2007) *Cg*-TGF-beta, a TGF-beta/activin homologue in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, is involved in immunity against Gram-negative microbial infection. *Dev Comp Immunol* **31**: 30-38.
- Lemire, A., Goudenège, D., T., V., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., and Le Roux, F. (2014) Populations, not clones, are the unit of *vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *IMSE J soumis*.
- Lertpiriyapong, K., Gamazon, E.R., Feng, Y., Park, D.S., Pang, J., Botka, G. et al. (2012) *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization. *PLoS One* **7**: e42842.
- Li, J., Zhang, Y., Xiang, Z., Xiao, S., Yu, F., and Yu, Z. (2013a) High mobility group box 1 can enhance NF-kappaB activation and act as a pro-inflammatory molecule in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **35**: 63-70.
- Li, J., Zhang, Y., Xiang, Z., Tong, Y., Qu, F., and Yu, Z. (2014) Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **40**: 455-465.
- Li, J., Lim, M.S., Li, S., Brock, M., Pique, M.E., Woods, V.L., Jr., and Craig, L. (2008) *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* **16**: 137-148.
- Li, L., Mou, X., and Nelson, D.R. (2013b) Characterization of Plp, a phosphatidylcholine-specific phospholipase and hemolysin of *Vibrio anguillarum*. *BMC Microbiol* **13**: 271.
- Li, Y., Qiu, Y., Gao, H., Guo, Z., Han, Y., Song, Y. et al. (2009) Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **9**: 128.

- Lichten, L.A., and Cousins, R.J. (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* **29**: 153-176.
- Limthammahisorn, S., Brady, Y.J., and Arias, C.R. (2008) Gene expression of cold shock and other stress-related genes in *Vibrio vulnificus* grown in pure culture under shellstock temperature control conditions. *J Food Prot* **71**: 157-164.
- Limthammahisorn, S., Brady, Y.J., and Arias, C.R. (2009) *In vivo* gene expression of cold shock and other stress-related genes in *Vibrio vulnificus* during shellstock temperature control conditions in oysters. *J Appl Microbiol* **106**: 642-650.
- Lin, J., Huang, S., and Zhang, Q. (2002) Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect* **4**: 325-331.
- Linehan, S.A., and Holden, D.W. (2003) The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett* **85**: 183-192.
- Linz, R., and Lutsenko, S. (2007) Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr* **39**: 403-407.
- Liu, P.T., and Modlin, R.L. (2008) Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* **20**: 371-376.
- Liu, T., Ramesh, A., Ma, Z., Ward, S.K., Zhang, L., George, G.N. et al. (2007) CsoR is a novel *Mycobacterium tuberculosis* copper-sensing transcriptional regulator. *Nat Chem Biol* **3**: 60-68.
- Loftin, I.R., Franke, S., Roberts, S.A., Weichsel, A., Heroux, A., Montfort, W.R. et al. (2005) A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* **44**: 10533-10540.
- Lokmer, A., and Mathias Wegner, K. (2014) Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J*.
- Lolis, E., and Bucala, R. (2003) Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 635-645.
- Luan, X., Chen, J., Zhang, X.H., Li, Y., and Hu, G. (2007) Expression and characterization of a metalloprotease from a *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Can J Microbiol* **53**: 1168-1173.
- Lukacs, G.L., Rotstein, O.D., and Grinstein, S. (1991) Determinants of the phagosomal pH in macrophages. *In situ* assessment of vacuolar H(+)-ATPase activity, counterion conductance, and H+ "leak". *J Biol Chem* **266**: 24540-24548.
- Lukjancenko, O., and Ussery, D.W. (2014) *Vibrio* chromosome-specific families. *Front Microbiol* **5**: 73.
- Lundberg, B.E., Wolf, R.E., Jr., Dinauer, M.C., Xu, Y., and Fang, F.C. (1999) Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. *Infect Immun* **67**: 436-438.
- Lutsenko, S., Gupta, A., Burkhead, J.L., and Zuzel, V. (2008) Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys* **476**: 22-32.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 622-632.

## -M-

- Ma, A.T., and Mekalanos, J.J. (2010) In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4365-4370.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009a) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **5**: 234-243.
- Ma, Z., Jacobsen, F.E., and Giedroc, D.P. (2009b) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev* **109**: 4644-4681.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, G.M., Milano, A., Provvedi, R., Pasca, M.R. et al. (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* **189**: 730-740.
- Macomber, L., and Imlay, J.A. (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8344-8349.
- Madejczyk, M.S., and Ballatori, N. (2012) The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochim Biophys Acta* **1818**: 651-657.
- Maggini, S., Wintergerst, E.S., Beveridge, S., and Hornig, D.H. (2007) Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr* **98 Suppl 1**: S29-35.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K. et al. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* **361**: 743-749.
- Manning, A.J., and Kuehn, M.J. (2013) Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol* **23**: 131-141.
- Marrero, K., Sanchez, A., Gonzalez, L.J., Ledon, T., Rodriguez-Ulloa, A., Castellanos-Serra, L. et al. (2012) Periplasmic proteins encoded by VCA0261-0260 and VC2216 genes together with *copA* and *cueR* products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **158**: 2005-2016.
- Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M.L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S. et al. (2006) Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. *Mol Biol Cell* **17**: 498-510.
- Master, S.S., Springer, B., Sander, P., Boettger, E.C., Deretic, V., and Timmins, G.S. (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* **148**: 3139-3144.
- Mathur, J., and Waldor, M.K. (2004) The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**: 3577-3583.
- Mathur, J., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2007) Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol Microbiol* **63**: 848-858.
- Matson, J.S., Yoo, H.J., Hakansson, K., and Dirita, V.J. (2010) Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J Bacteriol* **192**: 2044-2052.

- Matsuda, S., Okada, N., Kodama, T., Honda, T., and Iida, T. (2012) A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. *PLoS Pathog* **8**: e1002803.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., and Takahashi, K.G. (2006) Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **145**: 325-330.
- Matzinger, P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**: 301-305.
- McBroom, A.J., and Kuehn, M.J. (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* **63**: 545-558.
- McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M.J. (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol* **188**: 5385-5392.
- Mealman, T.D., Blackburn, N.J., and McEvoy, M.M. (2012) Metal export by CusCFBA, the periplasmic Cu(I)/Ag(I) transport system of *Escherichia coli*. *Curr Top Membr* **69**: 163-196.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (1998) An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* **10**: 12-15.
- Medzhitov, R., and Janeway, C.A., Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**: 298-300.
- Mermod, M., Magnani, D., Solioz, M., and Stoyanov, J.V. (2012) The copper-inducible ComR (YcfQ) repressor regulates expression of ComC (YcfR), which affects copper permeability of the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biomaterials* **25**: 33-43.
- Mersni-Achour, R. (2013) *Vibrio tubiashii* en France: description d'isolats pathogènes affectant des mollusques et étude de leurs mécanismes de virulence. In *Université de la Rochelle*.
- Milano, A., De Rossi, E., Gusberti, L., Heym, B., Marone, P., and Riccardi, G. (1996) The *katE* gene, which encodes the catalase HPII of *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol* **19**: 113-123.
- Millet, Y.A., Alvarez, D., Ringgaard, S., von Andrian, U.H., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2014) Insights into *Vibrio cholerae* Intestinal Colonization from Monitoring Fluorescently Labeled Bacteria. *PLoS Pathog* **10**: e1004405.
- Milton, D.L., O'Toole, R., Horstedt, P., and Wolf-Watz, H. (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **178**: 1310-1319.
- Mishra, S., and Imlay, J. (2012) Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys* **525**: 145-160.
- Modi, S.R., Camacho, D.M., Kohanski, M.A., Walker, G.C., and Collins, J.J. (2011) Functional characterization of bacterial sRNAs using a network biology approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 15522-15527.
- Mogensen, T.H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**: 240-273, Table of Contents.
- Montagnani, C. (2013) Bases moléculaires de grandes fonctions biologiques chez les mollusques d'intérêt aquacole : Biominéralisation chez *Pinctada margaritifera* et Immunité chez *Crassostrea gigas*. In *ED SIBAGHE*: Université de Montpellier 2, p. 58.

Montagnani, C., Labreuche, Y., and Escoubas, J.M. (2008) Cg-I kappa B, a new member of the I kappa B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **32**: 182-190.

Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., and Escoubas, J.M. (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett* **500**: 64-70.

Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., and Escoubas, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett* **561**: 75-82.

Montagnani, C., Avarre, J.C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V., and Escoubas, J.M. (2007) First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev Comp Immunol* **31**: 1-11.

Moran, A.P., Sturegard, E., Sjunnesson, H., Wadstrom, T., and Hynes, S.O. (2000) The relationship between O-chain expression and colonisation ability of *Helicobacter pylori* in a mouse model. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 263-270.

Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., and O'Halloran, T.V. (2000) Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 5864-5871.

#### -N-

Nalpas, N.C., Park, S.D., Magee, D.A., Taraktsoglou, M., Browne, J.A., Conlon, K.M. et al. (2013) Whole-transcriptome, high-throughput RNA sequence analysis of the bovine macrophage response to *Mycobacterium bovis* infection in vitro. *BMC Genomics* **14**: 230.

Needham, B.D., and Trent, M.S. (2013) Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **11**: 467-481.

Nesper, J., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Kapfhammer, D., Kraiss, A., and Reidl, J. (2001) Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect Immun* **69**: 435-445.

Neyrolles, O., Mintz, E., and Catty, P. (2013) Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 89.

Ng, V.H., Cox, J.S., Sousa, A.O., MacMicking, J.D., and McKinney, J.D. (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* **52**: 1291-1302.

Nies, D.H. (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 313-339.

Nikaido, H., and Pages, J.M. (2012) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 340-363.

Nonaka, T., Kuwabara, T., Mimuro, H., Kuwae, A., and Imajoh-Ohmi, S. (2003) *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology* **149**: 2513-2527.

Norqvist, A., Norrman, B., and Wolf-Watz, H. (1990) Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **58**: 3731-3736.

Nyholm, S.V., and Graf, J. (2012) Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nat Rev Microbiol* **10**: 815-827.

Nyholm, S.V., Stewart, J.J., Ruby, E.G., and McFall-Ngai, M.J. (2009) Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. *Environ Microbiol* **11**: 483-493.

## -O-

O'Boyle, N., Houeix, B., Kilcoyne, M., Joshi, L., and Boyd, A. (2013) The MSHA pilus of *Vibrio parahaemolyticus* has lectin functionality and enables TTSS-mediated pathogenicity. *Int J Med Microbiol* **303**: 563-573.

Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., and Honda, T. (2005) Vibrios commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol* **187**: 752-757.

Olafsen, J.A., Fletcher, T.C., and Grant, P.T. (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol* **16**: 123-138.

Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R., and Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **182**: 2326-2328.

Oshiumi, H., Matsuo, A., Matsumoto, M., and Seya, T. (2008) Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. *Curr Genomics* **9**: 488-493.

Osman, D., Waldron, K.J., Denton, H., Taylor, C.M., Grant, A.J., Mastroeni, P. et al. (2010) Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *J Biol Chem* **285**: 25259-25268.

Otto, M. (2009) Bacterial sensing of antimicrobial peptides. *Contrib Microbiol* **16**: 136-149.

Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., and O'Halloran, T.V. (2001) The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 30670-30677.

## -P-

Pacelli, R., Wink, D.A., Cook, J.A., Krishna, M.C., DeGraff, W., Friedman, N. et al. (1995) Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *J Exp Med* **182**: 1469-1479.

Padilla-Benavides, T., Long, J.E., Raimunda, D., Sasseti, C.M., and Arguello, J.M. (2013) A novel P(1B)-type Mn<sup>2+</sup>-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. *J Biol Chem* **288**: 11334-11347.

Paranjpye, R.N., and Strom, M.S. (2005) A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infect Immun* **73**: 1411-1422.

Park, C.B., Kim, H.S., and Kim, S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 253-257.

- Park, E.M., Kim, Y.O., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, W.J., Lee, S.J. et al. (2008) Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **24**: 11-17.
- Park, K.S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.H., Okada, K., Iida, T., and Honda, T. (2004) Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **72**: 6659-6665.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., and Choi, C.Y. (2009) Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol Res* **5**: 451-461.
- Park, N.Y., Lee, J.H., Kim, M.W., Jeong, H.G., Lee, B.C., Kim, T.S., and Choi, S.H. (2006) Identification of the *Vibrio vulnificus* wbpP gene and evaluation of its role in virulence. *Infect Immun* **74**: 721-728.
- Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., and Hancock, R.E. (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 605-614.
- Patzer, S.I., and Hantke, K. (2001) Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4806-4813.
- Pellicic, V. (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827-837.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (2011) Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect* **13**: 808-817.
- Petris, M.J., Smith, K., Lee, J., and Thiele, D.J. (2003) Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem* **278**: 9639-9646.
- Phillips, N.J., Adin, D.M., Stabb, E.V., McFall-Ngai, M.J., Apicella, M.A., and Gibson, B.W. (2011) The lipid A from *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide: a unique structure bearing a phosphoglycerol moiety. *J Biol Chem* **286**: 21203-21219.
- Piddington, D.L., Fang, F.C., Laessig, T., Cooper, A.M., Orme, I.M., and Buchmeier, N.A. (2001) Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. *Infect Immun* **69**: 4980-4987.
- Piddock, L.J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P. et al. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem*.
- Pomposiello, P.J., Bennik, M.H., and Dimple, B. (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* **183**: 3890-3902.
- Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M., and Dozois, C.M. (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic *Enterobacteria*: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 90.



Portnoy, D.A., Auerbuch, V., and Glomski, I.J. (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* **158**: 409-414.

Post, D.M., Yu, L., Krasity, B.C., Choudhury, B., Mandel, M.J., Brennan, C.A. et al. (2012) O-antigen and core carbohydrate of *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide: composition and analysis of their role in *Euprymna scolopes* light organ colonization. *J Biol Chem* **287**: 8515-8530.

## -R-

Rademacher, C., and Masepohl, B. (2012) Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology* **158**: 2451-2464.

Ramarao, N., and Lereclus, D. (2005) The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cell Microbiol* **7**: 1357-1364.

Rankin, S., Li, Z., and Isberg, R.R. (2002) Macrophage-induced genes of *Legionella pneumophila*: protection from reactive intermediates and solute imbalance during intracellular growth. *Infect Immun* **70**: 3637-3648.

Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P.J., and Tang, C.M. (2009) Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 333-340.

Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., and Beveridge, T.J. (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* **150**: 2161-2169.

Rensing, C., and Grass, G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 197-213.

Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., and Rosen, B.P. (2000) CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 652-656.

Rittig, M.G., Alvarez-Martinez, M.T., Porte, F., Liautard, J.P., and Rouot, B. (2001) Intracellular survival of *Brucella spp.* in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infect Immun* **69**: 3995-4006.

Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., and Goetz, F. (2008) Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol* **32**: 1099-1104.

Roberts, S., Goetz, G., White, S., and Goetz, F. (2009a) Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* **11**: 24-44.

Roberts, S., Goetz, G., White, S., and Goetz, F. (2009b) Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* **11**: 24-44.

Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G. et al. (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2766-2771.

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.

- Rompikuntal, P.K., Duperthuy, M., Lindmark, B., Åhlund, M., and Johnson, T.L. (2014) Outer membrane vesicle-mediated export of PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *in preparation*.
- Rosa, R.D., Santini, A., Fievet, J., Bulet, P., Destoumieux-Garzon, D., and Bachere, E. (2011) Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* **6**: e25594.
- Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* **58**: 143-159.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., and Zilber-Rosenberg, I. (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* **5**: 355-362.
- Rosenberger, C.M., and Finlay, B.B. (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 385-396.
- Rowe-Magnus, D.A., and Mazel, D. (2001) Integrins: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **4**: 565-569.
- Rowland, J.L., and Niederweis, M. (2012) Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis (Edinb)* **92**: 202-210.
- Rubartelli, A., and Lotze, M.T. (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* **28**: 429-436.
- Ruby, E.G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R. et al. (2005) Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3004-3009.
- Rui, H., Liu, Q., Ma, Y., Wang, Q., and Zhang, Y. (2008) Roles of LuxR in regulating extracellular alkaline serine protease A, extracellular polysaccharide and mobility of *Vibrio alginolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 155-162.
- Rumbo, C., Fernandez-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C. et al. (2011) Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3084-3090.

## -S-

- Samain, J.F., and McCombie, H. (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Quae (ed). Versailles, p. 379.
- Samanovic, M.I., Ding, C., Thiele, D.J., and Darwin, K.H. (2012) Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal. *Cell Host Microbe* **11**: 106-115.
- Sana, T.G., Hachani, A., Bucior, I., Soscia, C., Garvis, S., Termine, E. et al. (2012) The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells. *J Biol Chem* **287**: 27095-27105.
- Sandkvist, M., Morales, V., and Bagdasarian, M. (1993) A protein required for secretion of cholera toxin through the outer membrane of *Vibrio cholerae*. *Gene* **123**: 81-86.

- Sansonetti, P.J. (2001) Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 3-14.
- Saulnier, D., De Decker, S., and Haffner, P. (2009) Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* **77**: 191-197.
- 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.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., and Thompson, F.L. (2007) Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* **189**: 7932-7936.
- Sawabe, T., Koizumi, S., Fukui, Y., Nakagawa, S., Ivanova, E.P., Kita-Tsukamoto, K. et al. (2009) Mutation is the Main Driving Force in the Diversification of the *Vibrio splendidus* Clade. *Microbes Environ* **24**: 281-285.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A.R., Mino, S. et al. (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritoni* sp. nov. *Front Microbiol* **4**: 414.
- Schapiro, J.M., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2003) Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8496-8501.
- Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J.F., Saulnier, D., Tourbiez, D., and Renault, T. (2011a) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* **155**: 28-34.
- Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., and Pepin, J.F. (2011b) Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* **42**: 27.
- Schild, S., Nelson, E.J., and Camilli, A. (2008) Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect Immun* **76**: 4554-4563.
- Schmitt, P. (2010) Diversité moléculaire des effecteurs antimicrobiens chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : mise en évidence et rôle dans la réponse antimicrobienne. In: Université Montpellier 2.
- Schmitt, P., Duperthuy, M., Montagnani, C., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2012a) Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. An overview with focus on summer mortalities. In *Oysters: physiology, ecological distribution and mortality*. Qin, J. (ed): Nova Science Publishers, Inc.
- Schmitt, P., de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., and Bachere, E. (2012b) Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **37**: 363-370.
- Schmitt, P., Rosa, R.D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachere, E., and Destoumieux-Garzon, D. (2012c) The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* **3**: 160.

- Schmitt, P., Wilmes, M., Pugniere, M., Aumelas, A., Bachere, E., Sahl, H.G. et al. (2010) Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *J Biol Chem* **285**: 29208-29216.
- Schoolnik, G.K., and Yildiz, F.H. (2000) The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biol* **1**: REVIEWS1016.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella spp.*: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* **21**: 134-156.
- Schultz, H., Hume, J., Zhang de, S., Gioannini, T.L., and Weiss, J.P. (2007) A novel role for the bactericidal/permeability increasing protein in interactions of gram-negative bacterial outer membrane blebs with dendritic cells. *J Immunol* **179**: 2477-2484.
- Schwan, W.R., Warrenner, P., Keunz, E., Stover, C.K., and Folger, K.R. (2005) Mutations in the *cueA* gene encoding a copper homeostasis P-type ATPase reduce the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Int J Med Microbiol* **295**: 237-242.
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., and Greenwood, D.R. (2007) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *NZ J Mar Freshwater Res* **41**: 91-101.
- Searle, S., Bright, N.A., Roach, T.I., Atkinson, P.G., Barton, C.H., Meloen, R.H., and Blackwell, J.M. (1998) Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J Cell Sci* **111 ( Pt 19)**: 2855-2866.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001a) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 7182-7189.
- Seaver, L.C., and Imlay, J.A. (2001b) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 7173-7181.
- Segarra, A., Pepin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., and Renault, T. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* **153**: 92-99.
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Degremont, L., Tourbiez, D. et al. (2014) Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* **15**: 580.
- Seo, J.K., Lee, M.J., Nam, B.H., and Park, N.G. (2013) cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **35**: 480-488.
- Seo, J.K., Stephenson, J., Crawford, J.M., Stone, K.L., and Noga, E.J. (2010) American oyster, *Crassostrea virginica*, expresses a potent antibacterial histone H2B protein. *Mar Biotechnol (NY)* **12**: 543-551.
- Shafeeq, S., Yesilkaya, H., Kloosterman, T.G., Narayanan, G., Wandel, M., Andrew, P.W. et al. (2011) The cop operon is required for copper homeostasis and contributes to virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **81**: 1255-1270.
- Shen, C.J., Kuo, T.Y., Lin, C.C., Chow, L.P., and Chen, W.J. (2010) Proteomic identification of membrane proteins regulating antimicrobial peptide resistance in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* **108**: 1398-1407.

- Shinoda, S., and Miyoshi, S. (2011) Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sci* **16**: 1-11.
- Shohet, S.B., Pitt, J., Baehner, R.L., and Poplack, D.G. (1974) Lipid peroxidation in the killing of phagocytized pneumococci. *Infect Immun* **10**: 1321-1328.
- Shyu, Y.C., and Lin, F.P. (1999) Cloning and characterization of manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio parahaemolyticus* and application to preliminary identification of *Vibrio* strains. *IUBMB Life* **48**: 345-352.
- Shyu, Y.C., Chiu, C.C., and Lin, F.P. (1999) Cloning, sequencing, expression and characterization of the manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio alginolyticus*. *Biochem Mol Biol Int* **47**: 803-814.
- Sikora, A.E., Zielke, R.A., Lawrence, D.A., Andrews, P.C., and Sandkvist, M. (2011) Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J Biol Chem* **286**: 16555-16566.
- Simeone, R., Bobard, A., Lippmann, J., Bitter, W., Majlessi, L., Brosch, R., and Enninga, J. (2012) Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog* **8**: e1002507.
- Simpson, L.M., White, V.K., Zane, S.F., and Oliver, J.D. (1987) Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **55**: 269-272.
- Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C., and Montfort, W.R. (2004) Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 7815-7817.
- Sminia, T., and van der Knaap, W.P. (1987) Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev Comp Immunol* **11**: 17-28.
- Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* **13**: 1042-1052.
- Sonawane, A., Santos, J.C., Mishra, B.B., Jena, P., Progida, C., Sorensen, O.E. et al. (2011) Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cell Microbiol* **13**: 1601-1617.
- Song, T., Mika, F., Lindmark, B., Liu, Z., Schild, S., Bishop, A. et al. (2008) A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol Microbiol* **70**: 100-111.
- Songer, J.G. (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**: 156-161.
- Soto, G.E., and Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**: 1059-1071.
- Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J. et al. (2001) Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *ahpC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation. *Infect Immun* **69**: 5967-5973.
- Srinivasan, S., Beema Shafreen, R.M., Nithyanand, P., Manisankar, P., and Pandian, S.K. (2010) Synthesis and in vitro antimicrobial evaluation of novel fluoroquinolone derivatives. *Eur J Med Chem* **45**: 6101-6105.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H., and Nathan, C. (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9901-9906.

Stafford, S.L., Bokil, N.J., Achard, M.E., Kapetanovic, R., Schembri, M.A., McEwan, A.G., and Sweet, M.J. (2013) Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep* **33**.

Stamm, L.M., Morisaki, J.H., Gao, L.Y., Jeng, R.L., McDonald, K.L., Roth, R. et al. (2003) *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med* **198**: 1361-1368.

Starck, J., Kallenius, G., Marklund, B.I., Andersson, D.I., and Akerlund, T. (2004) Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. *Microbiology* **150**: 3821-3829.

Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L., and Galan, J.E. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**: 2285-2289.

Stecher, B., and Hardt, W.D. (2011) Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol* **14**: 82-91.

Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., and Brown, N.L. (2001) CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* **39**: 502-511.

Sun-Wada, G.H., Tabata, H., Kawamura, N., Aoyama, M., and Wada, Y. (2009) Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci* **122**: 2504-2513.

Sun, B., Zhang, X.H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J., and Austin, B. (2007) A single residue change in *Vibrio harveyi* hemolysin results in the loss of phospholipase and hemolytic activities and pathogenicity for turbot (*Scophthalmus maximus*). *J Bacteriol* **189**: 2575-2579.

Sun, Y., Zhou, Z., Wang, L., Yang, C., Jianga, S., and Song, L. (2014) The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **45**: 291-299.

Syngkon, A., Elluri, S., Koley, H., Rompikuntal, P.K., Saha, D.R., Chakrabarti, M.K. et al. (2010) Studies on a novel serine protease of a DeltahapADeltaprtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One* **5**.

Szabo, R., and Bugge, T.H. (2011) Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 213-235.

## -T-

Tailleux, L., Waddell, S.J., Pelizzola, M., Mortellaro, A., Withers, M., Tanne, A. et al. (2008) Probing host pathogen cross-talk by transcriptional profiling of both *Mycobacterium tuberculosis* and infected human dendritic cells and macrophages. *PLoS One* **3**: e1403.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Beem, K.M., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (1982) Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J Mol Biol* **160**: 181-217.

Takahashi, K.G., and Mori, K. (2000) Functional profiles of hemocytes in the bio-defense process of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J Agric Res* **51**: 15-27.

Tanguy, A., and Moraga, D. (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* **273**: 123-130.

- Tanguy, A., Mura, C., and Moraga, D. (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat Toxicol* **55**: 35-47.
- Tanguy, A., Guo, X., and Ford, S.E. (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* **338**: 121-131.
- Taris, N., Lang, R.P., Reno, P.W., and Camara, M.D. (2009) Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display. *Anim Genet* **40**: 663-677.
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Shimizu, M., Toyofuku, M., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T. et al. (2010) Variation of physiochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3732-3739.
- Terahara, K., Takahashi, K.G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T. et al. (2006) Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". *Dev Comp Immunol* **30**: 667-683.
- Thi, E.P., Lambertz, U., and Reiner, N.E. (2012) Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. *PLoS Pathog* **8**: e1002551.
- Thomas, S., Holland, I.B., and Schmitt, L. (2014) The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 1629-1641.
- Thompson, C.C., Vicente, A.C., Souza, R.C., Vasconcelos, A.T., Vesth, T., Alves, N., Jr. et al. (2009) Genomic taxonomy of Vibrios. *BMC Evol Biol* **9**: 258.
- Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J. (2004) Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 403-431, table of contents.
- Thompson, F.L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., and Swings, J. (2001) Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Syst Appl Microbiol* **24**: 520-538.
- Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T., and Sawabe, T. (2007) Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4279-4285.
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B. et al. (2005) Phylogeny and molecular identification of Vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5107-5115.
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F., and Boulo, V. (2007) Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol* **31**: 859-873.
- Toffano-Nioche, C., Nguyen, A.N., Kuchly, C., Ott, A., Gautheret, D., Bouloc, P., and Jacq, A. (2012) Transcriptomic profiling of the oyster pathogen *Vibrio splendidus* opens a window on the evolutionary dynamics of the small RNA repertoire in the *Vibrio* genus. *RNA* **18**: 2201-2219.
- Travers, M.A., Le Goic, N., Huchette, S., Koken, M., and Paillard, C. (2008) Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol* **25**: 800-808.

Travers, M.A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.L., Morga, B. et al. (2014) First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J Invertebr Pathol*.

Tsaneva, I.R., and Weiss, B. (1990) *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**: 4197-4205.

Tseng, T.T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**: S2.

Tubiash, H.S., Chanley, P.E., and Leifson, E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J Bacteriol* **90**: 1036-1044.

Tubiash, H.S., Colwell, R.R., and Sakazaki, R. (1970) Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J Bacteriol* **103**: 271-272.

### -V-

Vaitkevicius, K., Rompikuntal, P.K., Lindmark, B., Vaitkevicius, R., Song, T., and Wai, S.N. (2008) The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J* **275**: 3167-3177.

Valeru, S.P., Shanan, S., Alossimi, H., Saeed, A., Sandstrom, G., and Abd, H. (2014) Lack of Outer Membrane Protein A Enhances the Release of Outer Membrane Vesicles and Survival of *Vibrio cholerae* and Suppresses Viability of *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Microbiol* **2014**: 610190.

van der Straaten, T., Zulianello, L., van Diepen, A., Granger, D.L., Janssen, R., and van Dissel, J.T. (2004) *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* RamA, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. *Infect Immun* **72**: 996-1003.

van der Straaten, T., van Diepen, A., Kwappenberg, K., van Voorden, S., Franken, K., Janssen, R. et al. (2001) Novel *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infect Immun* **69**: 7413-7418.

van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J. et al. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**: 1287-1298.

van Deurs, B., Holm, P.K., and Sandvig, K. (1996) Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol* **69**: 343-350.

Vandal, O.H., Pierini, L.M., Schnappinger, D., Nathan, C.F., and Ehrt, S. (2008) A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **14**: 849-854.

Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charriere, G.M., Le Roux, F., Goudenege, D., Gourbal, B. et al. (2014) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol*.

Vattanaviboon, P., and Mongkolsuk, S. (2001) Unusual adaptive, cross protection responses and growth phase resistance against peroxide killing in a bacterial shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Lett* **200**: 111-116.



Vattanaviboon, P., Panmanee, W., and Mongkolsuk, S. (2003) Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 89-95.

Vazquez-Torres, A., Xu, Y., Jones-Carson, J., Holden, D.W., Lucia, S.M., Dinauer, M.C. et al. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**: 1655-1658.

Vergne, I., Chua, J., Singh, S.B., and Deretic, V. (2004) Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 367-394.

Vertuani, S., Angusti, A., and Manfredini, S. (2004) The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* **10**: 1677-1694.

Vidal-Dupiol, J., Ladriere, O., Destoumieux-Garzon, D., Sautiere, P.E., Meistertzheim, A.L., Tambutte, E. et al. (2011) Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *J Biol Chem* **286**: 22688-22698.

Voth, D.E., and Heinzen, R.A. (2007) Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* **9**: 829-840.

## -W-

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E., and Berthe, F. (2002) Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. *C R Biol* **325**.

Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., 3rd, Honer Zu Bentrup, K. et al. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* **174**: 1491-1500.

Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J. et al. (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.

Wang, D., and Fierke, C.A. (2013) The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics* **5**: 372-383.

Wang, D., Hosteen, O., and Fierke, C.A. (2012a) ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *J Inorg Biochem* **111**: 173-181.

Wang, H., Chen, S., Zhang, J., Rothenbacher, F.P., Jiang, T., Kan, B. et al. (2012b) Catalases promote resistance of oxidative stress in *Vibrio cholerae*. *PLoS One* **7**: e53383.

Wang, H.W., Chung, C.H., Ma, T.Y., and Wong, H.C. (2013) Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3734-3743.

Wang, J., Sasaki, T., Maehara, Y., Nakao, H., Tsuchiya, T., and Miyoshi, S. (2008) Variation of extracellular proteases produced by *Vibrio vulnificus* clinical isolates: genetic diversity of the metalloprotease gene (*vvp*), and serine protease secretion by *vvp*-negative strains. *Microb Pathog* **44**: 494-500.

- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57-63.
- Ward, S.K., Abomoelak, B., Hoye, E.A., Steinberg, H., and Talaat, A.M. (2010) CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **77**: 1096-1110.
- Warner, D.M., and Levy, S.B. (2012) SoxS increases the expression of the zinc uptake system ZnuACB in an *Escherichia coli* murine pyelonephritis model. *J Bacteriol* **194**: 1177-1185.
- Waters, L.S., Sandoval, M., and Storz, G. (2011) The *Escherichia coli* MntR miniregulon includes genes encoding a small protein and an efflux pump required for manganese homeostasis. *J Bacteriol* **193**: 5887-5897.
- Weber, B., Chen, C., and Milton, D.L. (2010) Colonization of fish skin is vital for *Vibrio anguillarum* to cause disease. *Environ Microbiol Rep* **2**: 133-139.
- Wegner, K.M., Volkenborn, N., Peter, H., and Eiler, A. (2013) Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol* **13**: 252.
- Weissenmayer, B.A., Prendergast, J.G., Lohan, A.J., and Loftus, B.J. (2011) Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. *PLoS One* **6**: e17570.
- Welch, R.A. (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **5**: 521-528.
- Wendling, C.C., Batista, F.M., and Wegner, K.M. (2014) Persistence, seasonal dynamics and pathogenic potential of *Vibrio* communities from Pacific oyster hemolymph. *PLoS One* **9**: e94256.
- Westermann, A.J., Gorski, S.A., and Vogel, J. (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* **10**: 618-630.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009) A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* **284**: 33949-33956.
- Wiens, M., Korzhev, M., Krasko, A., Thakur, N.L., Perovic-Ottstadt, S., Breter, H.J. et al. (2005) Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *J Biol Chem* **280**: 27949-27959.
- Williams, N.L., Morris, J.L., Rush, C.M., and Ketheesan, N. (2014) Migration of Dendritic Cells Facilitates Systemic Dissemination of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* **82**: 4233-4240.
- Wilmes, M., Cammue, B.P., Sahl, H.G., and Thevissen, K. (2011) Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Nat Prod Rep* **28**: 1350-1358.
- Wilson, T.M., de Lisle, G.W., and Collins, D.M. (1995) Effect of inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol* **15**: 1009-1015.
- Winterbourn, C.C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**: 278-286.
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T.B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G. et al. (2011) Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 1621-1626.

Wright, A.C., Simpson, L.M., Oliver, J.D., and Morris, J.G., Jr. (1990) Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **58**: 1769-1773.

Wu, Z., Milton, D., Nybom, P., Sjo, A., and Magnusson, K.E. (1996) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) causes morphological changes in cultured epithelial cells and perturbs their paracellular barrier function. *Microb Pathog* **21**: 111-123.

### -X-

Xu, G., Strong, M.J., Lacey, M.R., Baribault, C., Flemington, E.K., and Taylor, C.M. (2014) RNA CoMPASS: a dual approach for pathogen and host transcriptome analysis of RNA-seq datasets. *PLoS One* **9**: e89445.

Xue, Q., Hellberg, M.E., Schey, K.L., Itoh, N., Eytan, R.I., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2010) A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol Biol* **10**: 213.

### -Y-

Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2005) Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* **56**: 215-227.

Yamamoto, K., Wright, A.C., Kaper, J.B., and Morris, J.G., Jr. (1990a) The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* E1 Tor hemolysin gene. *Infect Immun* **58**: 2706-2709.

Yamamoto, K., Ichinose, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Nakata, A., Iwanaga, M. et al. (1990b) Two-step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect Immun* **58**: 4106-4116.

Yamaura, K., Takahashi, K.G., and Suzuki, T. (2008) Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**: 168-175.

Yang, H., Chen, J., Yang, G., Zhang, X.H., Li, Y., and Wang, M. (2007) Characterization and pathogenicity of the zinc metalloprotease empA of *Vibrio anguillarum* expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **54**: 244-248.

Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4414-4420.

Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**: 27-55.

Yoshida, S., Ogawa, M., and Mizuguchi, Y. (1985) Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **47**: 446-451.

### -Z-

Zaharik, M.L., Cullen, V.L., Fung, A.M., Libby, S.J., Kujat Choy, S.L., Coburn, B. et al. (2004) The *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun* **72**: 5522-5525.

- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F. et al. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**: 49-54.
- Zhang, L., Li, L., and Zhang, G. (2011a) Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev Comp Immunol* **35**: 603-610.
- Zhang, L., Li, L., and Zhang, G. (2011b) A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 653-660.
- Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R. et al. (2014) The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **45**: 141-150.
- Zhang, X.H., and Austin, B. (2005) Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* **98**: 1011-1019.
- Zhang, Y., He, X., and Yu, Z. (2011c) Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (IkappaB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 1354-1361.
- Zhang, Y., He, X., Li, X., Fu, D., Chen, J., and Yu, Z. (2011d) The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 954-963.
- Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K.L., and Yu, Z. (2013) Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoS One* **8**: e76464.
- Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E. (1999) An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10176-10181.
- Zhou, X., Konkel, M.E., and Call, D.R. (2009) Type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus* induces oncosis in both epithelial and monocytic cell lines. *Microbiology* **155**: 837-851.
- Zhou, X., Ritchie, J.M., Hiyoshi, H., Iida, T., Davis, B.M., Waldor, M.K., and Kodama, T. (2012) The hydrophilic translocator for *Vibrio parahaemolyticus*, T3SS2, is also translocated. *Infect Immun* **80**: 2940-2947.
- Zulfiqar, S., and Shakoory, A.R. (2012) Molecular characterization, metal uptake and copper induced transcriptional activation of efflux determinants in copper resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* **510**: 32-38.



# **ANNEXES**



Review

## Resistance to antimicrobial peptides in vibrios

Delphine Destoumieux-Garzón<sup>1,\*</sup>, Marylise Duperthuy<sup>2</sup>, Audrey Sophie Vanhove<sup>1</sup>, Paulina Schmitt<sup>3</sup> and Sun Nyunt Wai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ecology of Coastal Marine Systems, CNRS, Ifremer, University of Montpellier, IRD, Place Eugène Bataillon, CC80, 34095 Montpellier, France

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, The Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå University, Umeå, Sweden

<sup>3</sup>Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Universidad 330, 2373223 Valparaíso, Chile

E-Mails: ddestoum@univ-montp2.fr (D.D-G.); marylise.duperthuy@molbiol.umu.se

(M.D); avanhove@univ-montp1.fr (A.S.W.); paulina.schmitt@ucv.cl (P.S.);

sun.nyunt.wai@molbiol.umu.se (S.N.W.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; Tel.: +33-467-144-625; Fax: +33-467-144-622

Received: / Accepted: / Published:

---

### Abstract:

Vibrios are associated with a broad diversity of hosts that produce antimicrobial peptides (AMPs) as part of their defense against microbial infections. In particular, vibrios colonize epithelia, which function as protective barriers and express AMPs as a first line of chemical defense against pathogens. Recent studies have shown they can also colonize phagocytes, key components of the animal immune system. Phagocytes infiltrate infected tissues and use AMPs to kill the phagocytosed microorganisms intracellularly, or deliver their antimicrobial content extracellularly to circumvent tissue infection. We review here the mechanisms by which vibrios have evolved the capacity to evade or resist the potent antimicrobial defenses of the immune cells or tissues they colonize. Among their strategies to resist killing by AMPs, primarily vibrios use membrane remodeling mechanisms. In particular, some highly resistant strains substitute hexaacylated Lipid A with a diglycine residue to reduce their negative surface charge, thereby lowering their electrostatic interactions with cationic AMPs. As a response to envelope stress, which can be induced by membrane-active agents including AMPs, vibrios also release outer membrane vesicles to create a protective membranous shield that traps extracellular AMPs and prevents interaction of the peptides with their own membranes. Finally, once AMPs have



breached the bacterial membrane barriers, vibrios use RND efflux pumps, similar to those of other species, to transport AMPs out of their cytoplasmic space.

**Keywords:** Lipopolysaccharide; OMV; membrane transporter; innate immunity; defensin; cathelicidin; BPI.

---

## 1. Introduction

Vibrios are  $\gamma$ -proteo-bacteria ubiquitous in aquatic environments. They have evolved the capacity to colonize a broad series of hosts from protozoans to metazoans. Vibrios are normally present in the tissues of healthy animals. Sometimes they become pathogenic in wild marine animals such as corals, in particular as a result of environmental changes including shifts in seawater temperature and salinity, or, for aquacultured animals, upon exposure to high animal densities or stressful farming practices [1]. Currently, vibrioses are recognized as a major factor limiting the development of aquaculture. In addition, vibrios can cause severe disease outbreaks in human populations, the best known example being cholera. Again, environmental drivers -such as temperature changes, severe rainfalls that lower water salinity, and insufficient sanitation- govern the occurrence of the disease in human populations [2].

Vibrios have developed tropism for epithelial tissues that line both the outside and inside of cavities and lumen of their diverse hosts. They can colonize the keratinized epithelium of skin as well as the gastrointestinal tract. By lining the cavities and surfaces of structures throughout the body, epithelia act as a first line of defense against pathogens. Epithelia also produce antimicrobial peptides (AMPs) [3,4], conferring to the host an immune arsenal broadly conserved among metazoans. When the host's epithelial barriers are breached, vibrios encounter phagocytes, key components of the animal immune system. These phagocytes infiltrate infected tissues and use reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) as well as AMPs to kill phagocytosed microorganisms intracellularly or deliver their antimicrobial content extracellularly to circumvent infection. Interestingly, recent works have shown that vibrios are able to colonize and survive inside phagocytes [5,6].

AMPs from metazoans are often cationic peptides that initially interact electrostatically with the membranes of bacteria, which carry negatively-charged lipopolysaccharide (Gram-negative) or teichoic acids (Gram-positive). Many AMPs then insert into the membranes and form deleterious pores or channels [7]. Alternatively, AMPs can bind to essential components of bacterial membranes or translocate across to reach the cytoplasm, where they interfere with essential cellular processes such as nucleic acid, protein, enzyme, and cell wall syntheses [8-13]. In addition, AMPs produced by a given host can be synergistic, combining their mechanisms of action to fight bacterial pathogens [14]. However, it has become clear that the activity of AMPs goes far beyond their antimicrobial properties; these peptides are also involved in many immunomodulatory functions including inflammation, wound healing, chemotaxis, cell differentiation, angiogenesis, regulation of oxidative stress, regulation of adaptive immunity, and epithelia homeostasis [4,15]. Accordingly, AMPs are also called Host Defence Peptides.

Importantly, the tissues of healthy metazoans host an abundant microbiota, which itself has the capacity to produce AMPs, contributing to protection against pathogenic microbes. Prokaryotic AMPs are frequently referred to as bacteriocins, a generic name that covers classes of compounds with diverse structures and mechanisms of action. Bacteriocins may be peptides created by complex biosynthetic pathways that enable the inclusion of unconventional amino acids, as well as nucleotides

and siderophores. [16,17]. Many of these prokaryotic AMPs are cationic, although this is not a general rule. Like metazoan AMPs, some target the bacterial membranes while others target specific receptors and behave as inhibitors of key metabolic pathways. Still others combine different mechanisms of action (for review see [17]).

When confronted with such a complex immune arsenal, how do vibrios avoid the chemical defenses of their hosts and associated microbiota? What can we learn from their ability to colonize immune cells/tissues that produce high local concentrations of AMPs? In the context of the extensive antibiotic use that has led to emergence of broad-spectrum antibiotic-resistant bacteria [18], AMPs are often seen as an alternative to conventional antibiotics. However, an increasing number of studies have shown the diversity of mechanisms by which bacteria can also avoid the action of AMPs. Thus, the emergence of “superbugs” resistant to both antibiotics and AMPs is a potential risk of using AMPs as an antibiotic alternative. However, understanding the mechanism by which bacteria have evolved the capacity to live in AMP-producing tissues should allow us to develop strategies to prevent AMP-resistance.

## 2. Antimicrobial peptides in host-vibrio interactions

### 2.1. *Vibrios* colonizing epithelial surfaces

Many species of vibrios pathogenic for human and animal species have evolved the capacity to colonize epithelia (table 1). Among these, the species of vibrios pathogenic for humans, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*, cause major enteric disorders. While *V. parahaemolyticus* disrupts the intestinal epithelium [19], *V. cholerae* induces inflammatory responses and innate immune cell infiltration in the small intestine without affecting the integrity of the mucosal tissue [20]. Diarrhea caused by such enteric infections leads to intense dehydration and is recognized as a major factor in morbidity and mortality worldwide. Virulence factors of the diarrheagenic vibrios are expressed upon intimate association with host epithelial cells and, in many instances, include the secretion of toxins. Vibrios causing gastrointestinal infection need to penetrate the mucous layer before attaching to intestinal epithelial cells, a process usually mediated by fimbriae or pilus structures (*e. g.*, toxin-co-regulated pilus (TCP)). Subsequently, the bacteria secrete important virulence factors such as cholera toxin (CT) and hemagglutinin/protease (HA/protease) (for review see [21]). In *V. parahaemolyticus*, colonization of the intestine is dependent on the type III secretion system (T3SS2) [22] and further secretion of a T3SS2-secreted effector, VopZ, which also inhibits host mucosal defenses[23].

As in humans, many vibrios colonize the epithelial surfaces of animals, both vertebrates and invertebrates. Again, this often requires a first step of binding to the mucus covering the epithelium. In some cases, epithelium colonization is part of a mutualistic process. For instance, in the squid, the luminescent *Vibrio fischeri* colonizes the crypts of the squid light organ, which consists of a series of deep invaginated epithelium-lined crypt spaces [24]. In other cases, invasion of the epithelium is part of the pathogenic process. For instance, in the rainbow trout, *Vibrio anguillarum* colonizes both the skin and the intestinal epithelia, causing a fatal hemorrhagic septicaemia [25]. Similarly, in the coral *Oculina Patagonica*, the pathogenic *Vibrio shiloi* penetrates into the epithelial cells of the coral,

multiplies, and produces a toxin that inhibits photosynthesis of the coral symbiotic algae (for review see [26]).

## 2.2. AMPs and epithelial defenses

Mammalian epithelial tissues such as the epidermis but also the respiratory, gastrointestinal and genitourinary tracts, are in direct contact with the environment, thus, constant interaction between microorganisms and the immune system occurs at these sites. In vertebrates, epithelial tissues provide the first line of protection as they trigger the immune response. Mammalian epithelial cells function as both a physical barrier and as immunocompetent cells, producing a number of immune-related molecules [27]. Therefore, colonizing vibrios face a diversity of chemical weapons expressed in epithelial tissues. Indeed, in animals, virtually all epithelia have been found to express AMPs either constitutively or in response to damage and/or infection (table 2).

**In humans**, AMPs are expressed in a broad range of epithelial cell types, either constitutively or in response to infection. The major AMPs and proteins of human epithelia include the small cationic  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins, the human cathelicidin LL-37 (hCAP-18) and the bactericidal/permeability-increasing protein (BPI). The average concentration of defensins in these epithelial cells reaches the 10-100  $\mu\text{g/ml}$  range with higher local concentrations due to the uneven distribution of defensins [3]. BPI is expressed in mucosal epithelia including the esophagus and the colon [28]. LL-37 is expressed in the squamous epithelia of the airways, mouth, tongue, esophagus and large intestine [29-31] as well as in inflamed skin [32]. Human  $\beta$ -defensins are expressed by kidney, skin, pancreas, gingiva, tongue, esophagus, salivary gland, cornea, and airway epithelium [33]. In the small intestine, the antimicrobial C-type lectins HIP/PAP are expressed [4,34] together with enteric  $\alpha$ -defensins, which are major AMPs exclusively expressed by Paneth cells located at the bottom of the intestinal crypts [35]. Importantly, the epithelial lining of the small intestine is the site at which *V. cholerae* adheres after passing through the gastric acid barrier and penetrating the mucin layer of the small intestine [36].

The human enteric  $\alpha$ -defensins HD-5 and HD-6 are components of the secretory granules of Paneth cells. They are released in the lumen of the small intestinal crypts upon exposure to bacteria and bacterial antigens. Their contribution to enteric mucosal immunity has been clearly evidenced in transgenic mice expressing the human Paneth cell  $\alpha$ -defensin, HD-5 [37]. While HD-5 has direct antimicrobial activity against bacteria, HD-6 acts by creating nanonets that entrap bacteria and prevent further dissemination [38]. Paneth cells of mice also secrete their own  $\alpha$ -defensins into the lumen of small intestinal crypts, and local concentrations have been estimated to be 25–100 mg/ml at the point of release [35]. Paneth cells were also shown to express LPLUNC1 which co-localizes with HD-5 in the secretory granules. LPLUNC1 is a protein similar to BPI which does not display antimicrobial activity *in vitro* but binds lipopolysaccharide (LPS) and inhibits the TLR4-signaling pathway in response to *V. cholerae* O1 LPS. LPLUNC1 mRNA is also the most highly up-regulated transcript in the small intestine during acute phase cholera [39].

**In fish**, epithelial defenses include a series of AMPs whose expression varies according to peptide families, fish species and tissues (for recent reviews see [40,41]). Indeed, fish AMPs are abundant in

mucosal linings such as the skin, gills, and intestine, suggesting an important role in immunity [42]. These include AMPs similar to those found in mammals, namely  $\beta$ -defensins, cathelicidins, hepcidins and histone-derived AMPs together with  $\alpha$ -helical peptides AMPs (pleurocidin, piscidins, and moronecidin, among others...). Fish  $\beta$ -defensin genes have the highest basal expression in skin epithelium, which is induced by a variety of bacterial challenges such as *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum*. Interestingly, tissue-specific production of  $\beta$ -defensins has been described in salmonids where variants of this family can be differentially up-regulated in the intestine or gill tissues following bacterial challenge [43]. Hepcidin, which is both an AMP and a hormone expressed in liver, is also expressed by the skin epithelium and intestine. Fish hepcidin genes can be induced by exposure to both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Cathelicidin is expressed in diverse epithelia including skin, gill and intestine. In the Atlantic cod, its expression in the gills was induced by *Aeromonas salmonicida* but not by *V. anguillarum* [44]. Like  $\beta$ -defensins, salmonid cathelicidins are produced in several mucosal tissues where variants display differential expression [45]. Moreover, transcripts of a homologue of the human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) have been found in the skin, intestine and gills of various fish species [46,47]. Finally, histone-derived AMPs are released in the epithelial mucosal layer of wounded fish skin [48]; they are expressed by mucus-producing goblet cells, the cells in which all the AMPs from fish skin accumulate [41].

**In marine invertebrates**, AMPs are also expressed by a broad range of epithelial cell types. Homologues of human BPI are produced by diverse invertebrate species. In the squid *Euprymna scolopes*, *Es-LBP1* was found in the light organ of juvenile squids colonized by *V. fischeri*, but not in aposymbiotic squids. Expression was localized within the deep crypt spaces where the symbiotic vibrios reside and along the surface of the epithelia [49]. In the oyster *Crassostrea gigas*, a homologue of human BPI, *Cg-BPI*, is produced by various epithelial cell types including the intestine, gills, and mantle [50]. In addition, the *Cg-Defm* defensin is expressed by the oyster mantle, the shell-forming secretory epithelium [51]. Expression of *Cg-BPI* and *Cg-Defm* was constitutive in the epithelia of oysters infected with vibrios [14]. Recently, a novel AMP rich in lysine residues was extracted from oyster gills. This AMP called *Cg-Molluscidin* is predicted to form a  $\alpha$ -helix [52]. Its regulation in response to infection is still unknown. Moreover, as in fish, oyster epithelia accumulate histones displaying antimicrobial activity against vibrios [53]. These antimicrobial histones are released in response to infection or injury by infiltrating hemocytes, the circulating immune cells of the oyster, by a mechanism reminiscent of neutrophil extracellular traps in vertebrates [54].

### 2.3. *Vibrios adapted to intracellular life in phagocytes*

Vibrios have traditionally been considered extracellular organisms. In recent years, however, vibrios (*V. cholerae* and *V. mimicus*) have been shown to also adopt intracellular stages in phagocytes from the environment, the amoebae [55-57] (table 3). Similarly, live vibrios have been found inside professional phagocytes within the hosts they colonize. In vertebrates, *V. cholerae* can survive inside human macrophages, as this intracellular stage is required for the T6SS-mediated secretion of factors causing actin cross-linking in host cells [5]. In invertebrates, a *V. splendidus*-related strain can survive in hemocytes, the circulating immune cells of the oyster (table 3). Hemocyte invasion was accompanied by reduced production of reactive oxygen species and altered phagosome maturation [6].

While vibrios pathogenic for fish can adopt intracellular stages in epithelial cells [58,59], to our knowledge they have not been reported to invade professional phagocytes.

#### 2.4. AMPs of phagocytes

Intracellular vibrios must face the potent chemical defenses of phagocytes, professional immune cells that circulate in the animal bloodstream and infiltrate infected tissues. Phagocyte defenses include reactive oxygen species, which are particularly active during phagocytosis; hydrolytic enzymes including lysozyme; as well as AMPs, which are produced and stored by phagocytic cells (table 4).

Human phagocytes (neutrophils and macrophages) are indeed known to express a broad diversity of AMPs. Neutrophils express  $\alpha$ -defensins, stored in azurophil granules that fuse with the phagolysosome to kill internalized bacteria, and the LL-37 cathelicidin, stored in secretory granules which release their content extracellularly.  $\alpha$ -defensin expression is constitutive and their release is regulated by diverse microbial signals. In neutrophil phagolysosomes, the concentration of defensins has been estimated at  $\sim 10$  mg/ml [60]. In addition, human neutrophils express the BPI antimicrobial protein [28]. Whereas macrophages express a limited number of antimicrobials compared to neutrophils, these cells in which *V. cholerae* is able to survive use AMPs such as LL-37, hepcidin and human  $\beta$ -defensin 1 and 2 to control intracellular pathogens [61,62]. The crucial role of LL-37 in intracellular killing of mycobacteria has been extensively documented [63,64].

In fish, less data are available about AMPs expressed by phagocytes. Evidence of AMPs in granulocytes exists for the  $\alpha$ -helical peptide piscidin [65] and hepcidin in the seabream [66]. A fish BPI/LBP was constitutively expressed in head kidney leukocytes from Atlantic cod [47]. However, it should be mentioned that many studies that analyzed the expression of fish AMPs in tissues probably had infiltrating phagocytes in the samples. Therefore, further studies are needed to determine whether the AMP expression is restricted to a specific cell type or tissue. It is also not known whether fish phagocytes serve as a niche for any given *Vibrio* species.

Hemocytes of invertebrates also produce a broad series of AMPs. Upon infection, oyster hemocytes massively migrate to infected tissues, bringing their antimicrobial content to the site of infection, and actively phagocytose bacteria. In oyster hemocytes, where the *V. tasmaniensis* strain LGP32 was found to survive, AMPs include defensins, big-defensins, proline-rich peptides, as well as a BPI antimicrobial protein (for review see [1]). BPI is stored in large cytoplasmic granules while the intracellular localization of the other AMPs is not yet known. Expression of BPI and big-defensin1 and 2 is induced in hemocytes of infected oysters, whereas defensin expression is not regulated by the infection [14,67].

Similar to phagocytes from metazoans, amoebae, which can host diverse *Vibrio* species, produce pore-forming polypeptides such as the well-known amoebapores, which can rapidly perforate human and bacterial cells. Amoebapores are stored in cytoplasmic granules and through their antibacterial activity, combat growth of phagocytosed bacteria which are killed inside the digestive vacuoles when their cytoplasmic membranes are permeabilized [68].

### 3. Known mechanisms of resistance/evasion to AMPs in vibrios

#### 3.1. Outer membrane remodeling

As electrostatic interactions often play a crucial role in the initial interaction of cationic AMPs with bacterial membranes, both Gram-negative and Gram-positive bacteria have evolved strategies to neutralize the net negative charge of cell surface molecules with amine-containing substitutions. Thus, D-alanylation of teichoic acids, which are major components of the Gram-positive cell wall, confers AMP-resistance in a variety of Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* [69,70]. More generally, aminoacylation of bacterial cell surface phosphatidylglycerols with L-lysine, L-alanine, or D-alanine confers resistance to cationic AMPs in both Gram-positive and Gram-negative bacteria [71].

LPS, the major constituent in the Gram-negative outer membrane, is composed of three regions: the anionic Lipid A membrane anchor, the core oligosaccharide and the O-antigen polysaccharide [72]. Hankins *et al.* have shown that *V. cholerae* O1 and O139 share identical asymmetrical hexa-acylated Lipid A structures [73] composed of a  $\beta$  1'-6 linked glucosamine disaccharide with unmodified 1- and 4'-phosphate groups, which is acylated at the 2-, 3-, 2'- and 3'-positions. Myristate (C14:0) and 3-hydroxylaurate (3-OH C12:0) are ester-linked to the hydroxyl groups on the 2'- and 3'-linked fatty acyl chains (Figure 1). As in *V. cholerae*, the presence of a hydroxylated secondary acyl chain has been reported in the Lipid A structure of *V. fischeri* [74].

Polymyxin B (PmB) has been extensively used to study the molecular basis of bacterial resistance to cationic AMPs in Gram-negative bacteria. Indeed, this peptide produced by the Gram-positive *Paenibacillus polymyxa* disrupts the cell envelope of Gram-negative bacteria by associating with the anionic LPS as well as with acidic glycerophospholipids [75]. To resist to AMPs, Gram-negative bacteria can neutralize their cell membrane by transferring phosphoethanolamine or aminoarabinose to phosphate groups on the lipid A domain of LPS [76]

In *V. cholerae*, the secondary acyltransferase VC0212 (LpxN or MsbB), which transfers a 3-hydroxylaurate group to penta-acylated Lipid A, contributes to the resistance of an El Tor strain to AMPs including PmB and LL-37 [73,77]. Thus, the higher susceptibility of the *vc0212* mutant displaying incomplete Lipid A might be due to the greater permeability of its bacterial membrane. However, recent data by Hankins *et al.* demonstrate that the presence of a 3-hydroxyl group on the secondary acyl chain provides a site for esterification of glycine residues in a unique strategy necessary for resistance to PmB in *V. cholerae* [78] (Figure 1).

Three *V. cholerae* proteins, VC1577 (AlmG), VC1578 (AlmF), and VC1579 (AlmE) sharing sequence homology with the machinery involved in D-alanylation of teichoic acids in Gram-positive bacteria are essential for Lipid A modification with glycine and diglycine residues through aminoacyl esterification. Interestingly, sequence alignments comparing the classical (susceptible to PmB) and the El Tor (resistant to PmB) biotypes of *V. cholerae* revealed that the classical strain O395 has a nonsense mutation, resulting in a truncated AlmF carrier protein lacking the conserved serine [78]. The authors discovered that classical strains lack glycine-modified Lipid A. Upon *alm* mutation, the minimum inhibitory concentration (MIC) of PmB against El Tor strains dropped dramatically (~100 times) from 96-128  $\mu\text{g/mL}$  to 0.5-1.0  $\mu\text{g/mL}$ , showing that glycine modification of Lipid A is an essential

mechanism of AMP resistance in *V. cholerae*. This study provides a well-defined mechanism for the different PmB-resistant phenotypes observed in *V. cholerae* classical and El Tor biotypes. Why classical strains appear to have lost carrier protein functionality and thus AMP resistance is a puzzling evolutionary question.

To date, it is unknown whether modifications of *Vibrio* LPS are induced upon exposure to sublethal concentrations of cationic AMPs, as shown in other bacterial species like *Salmonella Typhimurium*, which regulate their LPS structure, contributing to resistance to cationic AMP [79]. Changes in *Salmonella* LPS structure, regulated by the two-component system PhoPQ, include reducing average O-antigen chain-length, acylating, deacylating, and hydroxylating lipid A, derivatizing lipid A and LPS core phosphates with cationic groups (for recent review see [80]). Homologues of PhoPQ are found in *Vibrio* species, however, the potential role of PhoPQ in resistance to AMPs has not been described to date.

### 3.2. Induction of the envelope stress response

As discussed above, many AMPs create damage to bacterial membranes as part of their mechanism of action. Sensing external stress is therefore crucial to combating membrane injury before the damage becomes irreversible. One of the strategies by which bacteria respond to outer membrane stress and modulate gene expression is via the alternate  $\sigma E$  factor, encoded by the *rpoE* gene. Under non-stress conditions,  $\sigma E$  is inactivated by its cognate anti-sigma factor localized to the inner membrane. When activated by envelope stress, *i.e.*, misfolding of outer membrane proteins,  $\sigma E$  promotes the expression of factors that help preserve and/or restore cell envelope integrity. Certain outer membrane proteins can serve as upstream signal sensors to modulate the activity of  $\sigma E$  [81]. In *V. cholerae*, the major outer membrane OmpU is a key determinant of  $\sigma E$  production [82]. Such dependence on a single factor contrasts with the regulation of  $\sigma E$  in *E. coli*, in which numerous factors contribute to its activation and none is dominant.

In *V. cholerae*,  $\sigma E$  plays a role in outer membrane stress response and resistance to AMPs. Thus, deficiency of  $\sigma E$  confers to *V. cholerae* greater sensitivity to the antimicrobial peptide P2, a synthetic derivative of human BPI. Consistent with the *ompU*-dependent activation of  $\sigma E$ , lack of OmpU in *V. cholerae* also conferred a greater sensitivity to AMPs [83,84]. Similar results were obtained for the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 in which OmpU contributed to resistance to the oyster antimicrobials Cg-Defm and Cg-BPI [85]. However, in both *V. cholerae* and *V. tasmaniensis*, OmpU-mediated resistance was much lower than that conferred by Lipid A remodelling [78]. Moreover, in *V. tasmaniensis* LGP32, the major negative effect of the *ompU* deletion on pathogenicity was attributed to impaired capacity to invade the oyster immune cells rather than lower resistance to oyster AMPs [6].

### 3.3. AMP titration by Outer Membrane Vesicles

One  $\sigma E$ -dependent mechanism whose role in AMP resistance has been less studied is outer membrane vesicle release. OMVs form the insoluble fraction of Gram-negative bacterial extracellular products; they are extruded from the bacterial cell surface and entrap some of the underlying periplasmic contents [86,87]. OMVs are key players in the interaction between Gram-negative bacteria and both



the prokaryotic and eukaryotic cells from their environment [88]. Whereas it is now well established that *Vibrio* spp. constitutively release OMVs during cell growth [89-91], only recent studies in *E. coli* [92] and *Vibrio* spp. [93,94] have shown that the release of OMVs protects bacteria against membrane-active AMPs.

In *V. cholerae*, earlier work demonstrated that under envelope stress conditions, the small regulatory RNA VrrA is expressed in a  $\sigma$ E-dependent manner to down-regulate OmpA, which in turn reduces envelope stress by promoting OMV release [95]. More recently, we found that physiologically relevant amounts of OMVs produced in the presence of a sub-lethal concentration of PmB provide protection against human cathelicidin LL-37, increasing the MIC of LL-37 by 4-fold. This cross-protection has been attributed to the presence of the biofilm-associated extracellular matrix protein Bap1, that is associated with OMVs in larger amounts when bacteria are grown in the presence of PmB. The Bap1 protein can therefore trap LL-37, leading to increased resistance of *V. cholerae* towards LL-37 [93].

In *V. tasmaniensis* LGP32, OMVs provide significant and dose-dependent protection against AMPs [94]. Indeed, OMVs increased the MIC of PmB from 2- to 16-fold at OMV concentrations ranging from 6.25 to 50  $\mu$ g/ml. This protective effect was attributed to the binding of PmB to OMVs; no proteolytic degradation of the peptide was observed. Interestingly, the addition of oyster plasma to the culture medium strongly stimulated the release of OMVs by *V. tasmaniensis* LGP32. This indicates that as in *E. coli*, in which sub-lethal concentrations of AMPs promote OMV release [92], OMV release in vibrios is likely up-regulated by membrane-active agents in oyster plasma.

Altogether, these recent studies indicate that OMVs are a potent strategy used by vibrios to trap membrane-active AMPs such as PmB or LL-37, forming a protective shield that prevents interaction with the membranes of the bacterial cell (Figure 2). Although OMVs released by vibrios can contain specific proteases like the recently identified vesicular serine protease Vsp (VS\_II0815) of *V. tasmaniensis* LGP32, there is to date no evidence of OMV degradation by OMV-encapsulated content [93,94].

### 3.4. Efflux of AMPs

The involvement of efflux pumps in antimicrobial resistance, especially in antibiotic resistance, is well established in Gram-negative bacteria [96,97]. There are five different active efflux systems described in bacteria: the ATP-binding cassette superfamily (ABC), the small multidrug resistance family (SMR), the multi antimicrobial extrusion protein family (MATE), the major facilitator superfamily (MFS), and the resistance-nodulation-cell division superfamily (RND) [98]. In terms of antimicrobial resistance, the RND family efflux pumps are particularly important in Gram-negative bacteria. RND efflux systems are composed of an outer membrane protein homologous to the transmembrane  $\beta$ -barrel TolC protein of *E. coli*, a periplasmic membrane fusion protein (MFP), and an integral cytoplasmic membrane pump protein belonging to the RND superfamily of transporters (for review see [99]). These three components function to form a channel to extrude substrates from the cell envelope into the environment. The *V. cholerae* VexAB-TolC [100,101], the *E. coli* and *Salmonella enterica* AcrAB-

ToIC [102,103], and the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM systems [104] function as RND efflux systems.

In *V. cholerae*, six RND efflux pumps have been described: VexAB, VexCD, VexEF, VexGH, VexIJK, and VexLM [105]. Among them, four are required for antimicrobial resistance *in vitro*. VexAB is the main efflux pump involved in the resistance to antimicrobials including bile acids, detergents, antibiotics, and PmB. The MIC of PmB dropped by 4-fold (from 110 to 27 µg/mL) after *vexB* mutation in *V. cholerae* [101,106]. Moreover, the MIC of PmB against the *vexB* mutant was comparable with the MIC against the RND-null strain, indicating that only VexAB is involved in resistance to PmB [101]. Besides VexAB, VexGH also contributes to antibiotic (novobiocin and ampicillin) and detergent resistance but to a lesser extent than VexAB. Indeed, a decrease in the MIC can be observed only for a *vexBH* double mutant but not for the *vexH* single mutant, compared to the wild-type and *vexB* single mutant strains [107]. Finally, VexCD and VexIJK appeared to efflux bile acids and detergents, respectively [101,106]. VexEF and VexLM do not participate in antimicrobial resistance, but are required for the full virulence of *V. cholerae* by influencing the production of the major effectors of virulence, *i.e.*, cholera toxin and the toxin co-regulated pilus [107]. In *V. parahaemolyticus*, proteomic identification of membrane proteins up-regulated in strains that artificially evolved resistant to AMPs, (including the fish AMP pleurocidin) led to the identification of ToIC [108]. Unfortunately, its role in AMP resistance in *V. parahaemolyticus* has not been investigated further.

In addition to efflux pumps, a K<sup>+</sup> pump encoded by the *trkA* gene has been described in *V. vulnificus*, and its role in AMP and serum resistance investigated [109]. The *trkA* gene product, TrkA, is a cytoplasmic protein bound to the inner side of the cytoplasmic membrane [110]. In *V. vulnificus*, the *trkA* mutant exhibited attenuated growth at intermediate potassium concentrations and was more sensitive to human serum protamine and PmB than was the wild type. Indeed, in contrast to the wild-type strain, the *trkA* mutant lysed in the presence of 10 to 20 µg/mL of protamine, and 5 to 15 µg/mL of PmB [109]. Moreover, TrkA was found to be important for *V. vulnificus* virulence in mice [109].

### 3.5. Suppression of AMP expression

Pathogenic bacteria have developed multiple modalities to combat the antimicrobial response of their hosts. In addition to the structural modifications reviewed above, which increase their resistance to AMPs, they also use transcriptional repression as a strategy to evade the host immune system. Thus, the down-regulation of AMPs can be considered a general mechanism to facilitate invasion of pathogenic bacteria, including vibrios.

In humans, where the interaction of *V. cholerae* with intestinal epithelial cells is a critical step in the disease process, down-regulation of the cathelicidin LL-37, but not of the defensin HBD-1 has been reported in the presence of enteric pathogens including *V. cholerae* O139 [111]. The authors showed that cholera toxin (CT) was the predominant molecule associated with the regulation of AMPs by *V. cholerae* spp. *in vitro* and *in vivo* using intestinal epithelial cells and ileal loop experiments, respectively [111]. Moreover, multiple signaling pathways activated downstream of intracellular

accumulation of cAMP contribute to the CT-mediated suppression of LL-37 in intestinal epithelial cells [111]. However, a more recent study on small intestine biopsies of patients with *V. cholerae* O1 infections did not show transcriptional repression of AMP genes in the small intestine [112], a discrepancy that might be explained by differences in transcriptional regulation *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, the expression of hBD-1, -3 and -4 did not vary with the infection, whereas hBD-2 mRNA levels were significantly higher at the acute stage of cholera than at the convalescent stage and in healthy controls. Paneth cell-derived HD-5 and HD-6, which were all expressed at high levels in controls, were not affected by the infections. While no transcriptional repression could be observed, the authors reported that hBD-2, HD-5 and LL-37 peptides are normally present in the small intestine epithelium and amounts decrease at the acute stage of watery diarrhea. Lower amounts of HD-5 could result from degranulation of the Paneth cells in response to infection. The processes regulating hBD-2 and LL-7 levels remain to be characterized.

In invertebrate hosts, similar downregulation of antimicrobial peptides and proteins has been observed during vibrioses. For instance, the coral pathogen, *V. coralliilyticus*, represses the expression of the damicornin, an AMP expressed by the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* [113]. Indeed, damicornin transcripts increased during the first 6 days after infection with *V. coralliilyticus*, directly followed by a dramatic decrease from days 9 to 18. Conversely, no transcriptional change was observed when *P. damicornis* was exposed to a nonvirulent state of *V. coralliilyticus* [113]. Since *V. coralliilyticus* enters into the ectodermal coral tissue within 6 days, the authors suggested that a first phase of infection, involving bacterial recognition by host cells, triggers a nonspecific inflammatory response that activates damicornin gene transcription. In a second phase, following bacterial invasion, the pathogen suppresses damicornin transcription. This study represents the first characterization of the immunosuppression of AMP expression in an invertebrate-vibrio model of pathogenesis. More recently, using a global RNAseq approach, the same authors showed that not only damicornin, but also a mytimacin-like and a LBP-BPI gene displayed decreased expression during a successful *V. coralliilyticus* infection [114].

In mollusks, repression of AMP transcription has not been demonstrated *per se*. Indeed, upon infection of oysters with the pathogen *V. tasmaniensis* LGP32, major hemocyte movements occur which, by bringing AMP-producing hemocytes to infected tissues, create an apparent depletion in Cg-Defm and Cg-BPI transcripts in the circulating hemocytes. However, those transcripts accumulate at the same time in the hemocyte-infiltrated tissues [14]. A similar apparent repression of defensin expression was observed in the circulating hemocytes of a heterologous host, the mussel, infected with *V. tasmaniensis* LGP32 [115]. However, to date, the only AMP whose transcription is likely down-regulated by LGP32 is a proline-rich peptide from the oyster which acts by synergism with the other AMPs [14].

#### 4. Conclusion

While vibrios have evolved the capacity to colonize immune tissues such as epithelia and phagocytes, only recent studies have started to investigate the mechanism by which they can survive the high AMP concentrations they encounter. Among their potent mechanisms of resistance to AMPs, vibrios use novel mechanisms of membrane remodeling. In particular, some highly resistant strains substitute their

hexaacylated Lipid A with a diglycine residue to reduce the negative charge of their surface thereby lowering the electrostatic interaction with cationic AMPs. As a response to envelope stress, which can be induced by membrane-active agents including AMPs, vibrios release outer membrane vesicles to create a protective membranous shield that traps AMPs and prevents interaction of the peptides with their own membranes. Finally, once AMPs have breached the bacterial membrane barriers, vibrios can use RND pumps similar to those of other species to transport AMPs out of their cytoplasmic space. Although suppression of AMP transcription has been described in some host-pathogen interactions, this mechanism of immune evasion appears to be more specific to given strains/species than universal among vibrios.

**Table 1.** Vibrios colonizing epithelia.

Species or strain	Host	Tissues	References
<i>V. cholerae</i>	human	intestine	[20]
<i>V. vulnificus</i>	human	skin, wounds	[116]
<i>V. parahemolyticus</i>	human	intestine	[19]
<i>V. anguillarum</i>	fish	skin	[25]
<i>V. shiloi</i>	coral	oral ectoderm	[26]
<i>V. coralliilyticus</i>	coral	oral ectoderm	[113]
<i>V. fisheri</i>	squid		[24]

**Table 2.** AMPs expressed in epithelial tissues

Species	AMP family	Examples	Epithelial Tissues	References
Human	$\alpha$ -defensins	HD-5, HD-6	Small intestine, female genital tract	[35,117]
	$\beta$ -defensins	hBD-1/-2/-3	Respiratory tract, large intestine, urogenital epithelium, oral cavity, skin	[118-122]
	Cathelicidins	LL-37(hCAP-18)	Skin, gastrointestinal tract, epididymis, lungs, oral cavity, ocular surface	[29,123,124], for review see [125]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	BPI	Esophagus, respiratory tract, large intestine	For review see [126]
	C-type lectins	HIP/HAP	Small intestine	[34]
Fish	$\beta$ -defensins	omDB-1/-2/-3/-4	Skin, gills, intestine	[43,127]
	Cathelicidins	rtCATH_1/-2A-2B, asCATH-1/-2 HFIAP-1/-2/-3	Skin, gills, intestine	[45,128]
	Liver-expressed antimicrobial peptides (LEAPs)	Hepcidin (LEAP-1), LEAP-2 Sal-1 Sal-2	Skin, intestine	[129], for review see [42]

	$\alpha$ -helical peptides	Pleurocidin, Piscidins Chrysophins Moronecidin	Skin, gills	[130-132]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	BPI	Intestine, gills	[46,47]
	Histone-derived AMPs	Parasin-1 Hipposin Oncorhycin	Skin mucus	[133,134] [42,48]
Oyster	CS- $\alpha\beta$ defensins	Cg-Defm	Mantle tissue	[51]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	Cg-BPI	Gills, mantle, labial palps, gastrointestinal tract	[50]
	Histone-derived AMPs	cvH2B-1/-2/-3/-4	Gills	[53]
Coral	Cysteine Rich peptides	Damicornin Mytimacin-like	Oral ectoderm	[113]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	LBP-BPI	Oral ectoderm	[113]

**Table 3.** Vibrios colonizing phagocytes.

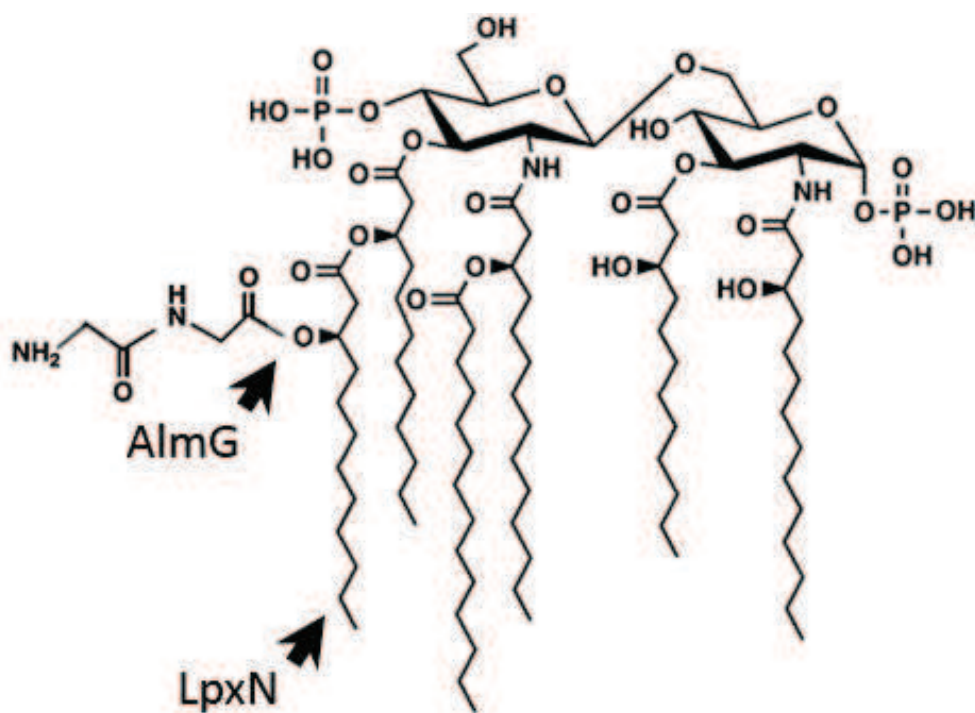
Species or strain	Host cells	References
<i>V. cholerae</i> O1, O139	amoebae	[55,57]
<i>V. cholerae</i>	human macrophages	[5]
<i>V. mimicus</i>	amoebae	[56]
<i>V. tasmaniensis</i>	oyster hemocytes	[6]

**Table 4.** AMPs expressed in phagocytes

Species	AMP	Examples	Phagocytes	References
Human	$\alpha$ -defensins	HNP-1/-2/-3/-4	Neutrophils	[60].
	$\beta$ -defensins	hBD-1/-2	Macrophages, Dendritic cells	[61,62]
	Cathelicidins	LL-37	Neutrophils	[135,136]
	Liver-expressed antimicrobial peptides (LEAPs)	Hepcidin	Granulocytes Macrophages	[137,138]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	BPI	Neutrophils, (Eosinophils/to a lesser extent)	[28,139,140]
Fish	$\alpha$ -helical peptides	Piscidins	Granulocytes	[65]
	Bactericidal-permeability increasing proteins	LBP/BPI	Head-kidney leukocytes	[47]
Oyster	CS- $\alpha\beta$ defensins	Cg-Defh-1/h2	Hemocytes	[1]
	Big-defensins	Cg-big-defensin-1/-2/-3	Hemocytes	[67].
	Proline-rich peptides	Cg-Prp	Hemocytes	[14]
	Bactericidal-permeability increasing protein	Cg-BPI	Hemocytes	[14,50].
	Histone-derived AMPs	HETs	Hemocytes	[54].

**Figure 1. Structure of modified Lipid A from *V. cholerae* O1 El Tor**

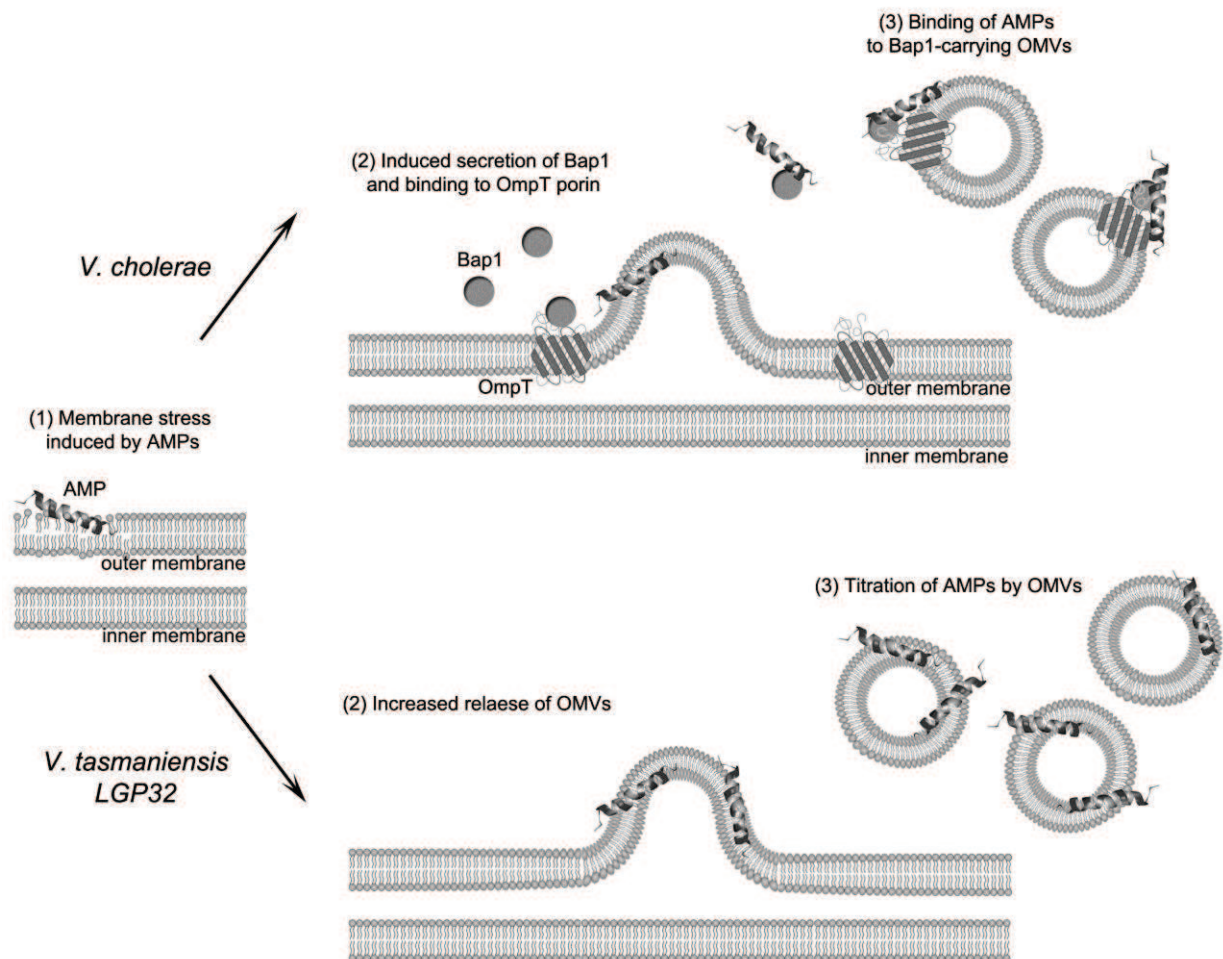
The structure of *V. cholerae* lipid A was established by Hankins et al. (2011). It is composed of a  $\beta$  1'-6 linked glucosamine disaccharide with unmodified 1- and 4'-phosphate groups, which is acylated at the 2-, 3-, 2'- and 3'-positions. Myristate (C14:0) and 3-hydroxylaurate (3-OH C12:0) are ester-linked to the hydroxyl groups on the 2'- and 3'-linked fatty acyl chains. The 3-hydroxylaurate secondary acyl chain transferred by the LpxN acyltransferase is required for AMP resistance. Similarly, the di-Glycine residues transferred by the AlmG to the hexa-acylated lipid A of *V. cholerae* O1 El Tor strains are crucial for AMP-resistance [78].





**Figure 2. Model for AMP-titration by OMVs in *V. cholerae* and *V. tasmaniensis***

The role of OMVs in the protection against AMPs has been recently described in two species of vibrios. In *V. cholerae*, OMVs cross-protect against the human cathelicidin LL-37 when bacteria are exposed to sublethal concentrations of PmB. Those OMVs are associated with Bap1 protein which serves as a ligand for LL-37. The association of Bap1 to OMVs is mediated by the outer membrane protein, OmpT [93]. In *V. tasmaniensis*, OMVs produced in the absence of AMPs are sufficient to titrate PmB and confer a potent dose-dependent protection against PmB. Although the molecular basis of PmB binding to *V. tasmaniensis* OMVs remain unknown, it is speculated that titration may occur by PmB insertion in the OMV membranes. The release of OMVs was shown to be strongly enhanced by the contact of *V. tasmaniensis* with oyster plasma [94]. In both species, OMV release is thought to create a protective membranous shield that prevents the interaction of membrane-active AMPs with the bacterial membranes.



## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References and Notes

- Schmitt, P.; Rosa, R.D.; Duperthuy, M.; de Lorgeril, J.; Bachere, E.; Destoumieux-Garzon, D. The antimicrobial defense of the pacific oyster, *crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Front Microbiol* **2012**, *3*, 160.
- Jutla, A.; Whitcombe, E.; Hasan, N.; Haley, B.; Akanda, A.; Huq, A.; Alam, M.; Sack, R.B.; Colwell, R. Environmental factors influencing epidemic cholera. *Am J Trop Med Hyg* **2013**, *89*, 597-607.
- Ganz, T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **2003**, *3*, 710-720.
- Gallo, R.L.; Hooper, L.V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 503-516.
- Ma, A.T.; McAuley, S.; Pukatzki, S.; Mekalanos, J.J. Translocation of a vibrio cholerae type vi secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 234-243.
- Duperthuy, M.; Schmitt, P.; Garzon, E.; Caro, A.; Rosa, R.D.; Le Roux, F.; Lautredou-Audouy, N.; Got, P.; Romestand, B.; de Lorgeril, J., *et al.* 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* **2011**, *108*, 2993-2998.
- Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 238-250.
- Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B.A.; Hoffmann, R.; Otvos, L., Jr. The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the atpase actions of dnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3016-3026.
- Brotz, H.; Josten, M.; Wiedemann, I.; Schneider, U.; Gotz, F.; Bierbaum, G.; Sahl, H.G. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol* **1998**, *30*, 317-327.
- Park, C.B.; Kim, H.S.; Kim, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *244*, 253-257.
- Patrzykat, A.; Friedrich, C.L.; Zhang, L.; Mendoza, V.; Hancock, R.E. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 605-614.
- Srinivasan, S.; Beema Shafreen, R.M.; Nithyanand, P.; Manisankar, P.; Pandian, S.K. Synthesis and in vitro antimicrobial evaluation of novel fluoroquinolone derivatives. *Eur J Med Chem* **2010**, *45*, 6101-6105.
- Wilmes, M.; Cammue, B.P.; Sahl, H.G.; Thevissen, K. Antibiotic activities of host defense peptides: More to it than lipid bilayer perturbation. *Nat Prod Rep* **2011**, *28*, 1350-1358.
- Schmitt, P.; de Lorgeril, J.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzon, D.; Bachere, E. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **2012**, *37*, 363-370.
- Hilchie, A.L.; Wuerth, K.; Hancock, R.E. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nat Chem Biol* **2013**, *9*, 761-768.
- Duquesne, S.; Destoumieux-Garzon, D.; Peduzzi, J.; Rebuffat, S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* **2007**, *24*, 708-734.

17. Cotter, P.D.; Ross, R.P.; Hill, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 95-105.
18. Martinez, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution* **2009**, *157*, 2893-2902.
19. Qadri, F.; Alam, M.S.; Nishibuchi, M.; Rahman, T.; Alam, N.H.; Chisti, J.; Kondo, S.; Sugiyama, J.; Bhuiyan, N.A.; Mathan, M.M., *et al.* Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of vibrio parahaemolyticus. *J Infect Dis* **2003**, *187*, 1085-1096.
20. Qadri, F.; Bhuiyan, T.R.; Dutta, K.K.; Raqib, R.; Alam, M.S.; Alam, N.H.; Svennerholm, A.M.; Mathan, M.M. Acute dehydrating disease caused by vibrio cholerae serogroups o1 and o139 induce increases in innate cells and inflammatory mediators at the mucosal surface of the gut. *Gut* **2004**, *53*, 62-69.
21. Vanden Broeck, D.; Horvath, C.; De Wolf, M.J. Vibrio cholerae: Cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 1771-1775.
22. Park, K.S.; Ono, T.; Rokuda, M.; Jang, M.H.; Okada, K.; Iida, T.; Honda, T. Functional characterization of two type iii secretion systems of vibrio parahaemolyticus. *Infect Immun* **2004**, *72*, 6659-6665.
23. Zhou, X.; Gewurz, B.E.; Ritchie, J.M.; Takasaki, K.; Greenfeld, H.; Kieff, E.; Davis, B.M.; Waldor, M.K. A vibrio parahaemolyticus t3ss effector mediates pathogenesis by independently enabling intestinal colonization and inhibiting tak1 activation. *Cell Rep* **2013**, *3*, 1690-1702.
24. McFall-Ngai, M.; Nyholm, S.V.; Castillo, M.G. The role of the immune system in the initiation and persistence of the euprymna scolopes--vibrio fischeri symbiosis. *Semin Immunol* **2010**, *22*, 48-53.
25. Weber, B.; Chen, C.; Milton, D.L. Colonization of fish skin is vital for vibrio anguillarum to cause disease. *Environ Microbiol Rep* **2010**, *2*, 133-139.
26. Rosenberg, E.; Falkovitz, L. The vibrio shiloi/oculina patagonica model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* **2004**, *58*, 143-159.
27. Pitman, R.S.; Blumberg, R.S. First line of defense: The role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *Journal of gastroenterology* **2000**, *35*, 805-814.
28. Levy, O.; Canny, G.; Serhan, C.N.; Colgan, S.P. Expression of bpi (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochem Soc Trans* **2003**, *31*, 795-800.
29. Bals, R.; Wang, X.; Zasloff, M.; Wilson, J.M. The peptide antibiotic ll-37/hcap-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 9541-9546.
30. Frohm Nilsson, M.; Sandstedt, B.; Sorensen, O.; Weber, G.; Borregaard, N.; Stahle-Backdahl, M. The human cationic antimicrobial protein (hcap18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun* **1999**, *67*, 2561-2566.
31. Bals, R.; Wilson, J.M. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* **2003**, *60*, 711-720.
32. Frohm, M.; Agerberth, B.; Ahangari, G.; Stahle-Backdahl, M.; Liden, S.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide ll-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 15258-15263.
33. Scheetz, T.; Bartlett, J.A.; Walters, J.D.; Schutte, B.C.; Casavant, T.L.; McCray, P.B., Jr. Genomics-based approaches to gene discovery in innate immunity. *Immunol Rev* **2002**, *190*, 137-145.
34. Cash, H.L.; Whitham, C.V.; Behrendt, C.L.; Hooper, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* **2006**, *313*, 1126-1130.

35. Ouellette, A.J. Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 2215-2229.
36. Pukatzki, S.; Provenzano, D. *Vibrio cholerae* as a predator: Lessons from evolutionary principles. *Front Microbiol* **2013**, *4*, 384.
37. Salzman, N.H.; Ghosh, D.; Huttner, K.M.; Paterson, Y.; Bevins, C.L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* **2003**, *422*, 522-526.
38. Chu, H.; Pazgier, M.; Jung, G.; Nuccio, S.P.; Castillo, P.A.; de Jong, M.F.; Winter, M.G.; Winter, S.E.; Wehkamp, J.; Shen, B., *et al.* Human alpha-defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* **2012**, *337*, 477-481.
39. Shin, O.S.; Uddin, T.; Citorik, R.; Wang, J.P.; Della Pelle, P.; Kradin, R.L.; Bingle, C.D.; Bingle, L.; Camilli, A.; Bhuiyan, T.R., *et al.* Lplunc1 modulates innate immune responses to *vibrio cholerae*. *J Infect Dis* **2011**, *204*, 1349-1357.
40. Masso-Silva, J.A.; Diamond, G. Antimicrobial peptides from fish. *Pharmaceuticals (Basel)* **2014**, *7*, 265-310.
41. Rakers, S.; Niklasson, L.; Steinhagen, D.; Kruse, C.; Schaubert, J.; Sundell, K.; Paus, R. Antimicrobial peptides (amps) from fish epidermis: Perspectives for investigative dermatology. *J Invest Dermatol* **2013**, *133*, 1140-1149.
42. Smith, V.J.; Desbois, A.P.; Dyrinda, E.A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Mar Drugs* **2010**, *8*, 1213-1262.
43. Casadei, E.; Wang, T.; Zou, J.; Gonzalez Vecino, J.L.; Wadsworth, S.; Secombes, C.J. Characterization of three novel beta-defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Mol Immunol* **2009**, *46*, 3358-3366.
44. Caipang, C.M.; Lazado, C.C.; Brinchmann, M.F.; Kiron, V. Infection-induced changes in expression of antibacterial and cytokine genes in the gill epithelial cells of atlantic cod, *gadus morhua* during incubation with bacterial pathogens. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2010**, *156*, 319-325.
45. Chang, C.I.; Zhang, Y.A.; Zou, J.; Nie, P.; Secombes, C.J. Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*salmo salar*). *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, *50*, 185-195.
46. Kono, T.; Sakai, M. Molecular cloning of a novel bactericidal permeability-increasing protein/lipopolysaccharide-binding protein (bpi/lbp) from common carp *cyprinus carpio* l. And its expression. *Mol Immunol* **2003**, *40*, 269-278.
47. Stenvik, J.; Solstad, T.; Strand, C.; Leiros, I.; Jorgensen, T.T. Cloning and analyses of a bpi/lbp cDNA of the atlantic cod (*gadus morhua* l.). *Dev Comp Immunol* **2004**, *28*, 307-323.
48. Cho, J.H.; Park, I.Y.; Kim, H.S.; Lee, W.T.; Kim, M.S.; Kim, S.C. Cathepsin d produces antimicrobial peptide parasin i from histone h2a in the skin mucosa of fish. *FASEB J* **2002**, *16*, 429-431.
49. Krasity, B.C.; Troll, J.V.; Weiss, J.P.; McFall-Ngai, M.J. Lbp/bpi proteins and their relatives: Conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochem Soc Trans* **2011**, *39*, 1039-1044.
50. Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzon, D.; Romestand, B.; Fievet, J.; Pugniere, M.; Roquet, F.; Escoubas, J.M.; Vandenbulcke, F.; Levy, O., *et al.* Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *crassostrea gigas* cg-bpi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 17759-17764.
51. Gueguen, Y.; Herpin, A.; Aumelas, A.; Garnier, J.; Fievet, J.; Escoubas, J.M.; Bulet, P.; Gonzalez, M.; Lelong, C.; Favrel, P., *et al.* Characterization of a defensin from the oyster *crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 313-323.
52. Seo, J.K.; Lee, M.J.; Nam, B.H.; Park, N.G. Cgmolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the pacific oyster, *crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **2013**, *35*, 480-488.

53. Seo, J.K.; Stephenson, J.; Noga, E.J. Multiple antibacterial histone h2b proteins are expressed in tissues of american oyster. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2011**, *158*, 223-229.
54. Poirier, A.C.; Schmitt, P.; Rosa, R.D.; Vanhove, A.S.; Kieffer-Jaquinod, S.; Rubio, T.P.; Charriere, G.M.; Destoumieux-Garzon, D. Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: Evidences in crassostrea gigas. *J Biol Chem* **2014**.
55. Abd, H.; Saeed, A.; Weintraub, A.; Nair, G.B.; Sandstrom, G. Vibrio cholerae o1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba acanthamoeba castellanii. *FEMS Microbiol Ecol* **2007**, *60*, 33-39.
56. Abd, H.; Valeru, S.P.; Sami, S.M.; Saeed, A.; Raychaudhuri, S.; Sandstrom, G. Interaction between vibrio mimicus and acanthamoeba castellanii. *Environ Microbiol Rep* **2010**, *2*, 166-171.
57. Abd, H.; Weintraub, A.; Sandstrom, G. Intracellular survival and replication of vibrio cholerae o139 in aquatic free-living amoebae. *Environ Microbiol* **2005**, *7*, 1003-1008.
58. Ormonde, P.; Horstedt, P.; O'Toole, R.; Milton, D.L. Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by vibrio anguillarum. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 2326-2328.
59. Wang, X.H.; Oon, H.L.; Ho, G.W.; Wong, W.S.; Lim, T.M.; Leung, K.Y. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* **1998**, *144 ( Pt 11)*, 2987-3002.
60. Ganz, T. Defensins: Antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* **2004**, *327*, 539-549.
61. Duits, L.A.; Ravensbergen, B.; Rademaker, M.; Hiemstra, P.S.; Nibbering, P.H. Expression of beta-defensin 1 and 2 mrna by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology* **2002**, *106*, 517-525.
62. Liu, P.T.; Modlin, R.L. Human macrophage host defense against mycobacterium tuberculosis. *Curr Opin Immunol* **2008**, *20*, 371-376.
63. Liu, P.T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaubert, J.; Wu, K.; Meinken, C., *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin d-mediated human antimicrobial response. *Science* **2006**, *311*, 1770-1773.
64. Sonawane, A.; Santos, J.C.; Mishra, B.B.; Jena, P.; Progida, C.; Sorensen, O.E.; Gallo, R.; Appelberg, R.; Griffiths, G. Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages. *Cell Microbiol* **2011**, *13*, 1601-1617.
65. Mulero, I.; Noga, E.J.; Meseguer, J.; Garcia-Ayala, A.; Mulero, V. The antimicrobial peptides piscidins are stored in the granules of professional phagocytic granulocytes of fish and are delivered to the bacteria-containing phagosome upon phagocytosis. *Dev Comp Immunol* **2008**, *32*, 1531-1538.
66. Cuesta, A.; Meseguer, J.; Esteban, M.A. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Mol Immunol* **2008**, *45*, 2333-2342.
67. Rosa, R.D.; Santini, A.; Fievet, J.; Bulet, P.; Destoumieux-Garzon, D.; Bachere, E. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster crassostrea gigas. *PLoS One* **2011**, *6*, e25594.
68. Leippe, M.; Herbst, R. Ancient weapons for attack and defense: The pore-forming polypeptides of pathogenic enteric and free-living amoeboid protozoa. *J Eukaryot Microbiol* **2004**, *51*, 516-521.
69. Peschel, A.; Otto, M.; Jack, R.W.; Kalbacher, H.; Jung, G.; Gotz, F. Inactivation of the dlt operon in staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 8405-8410.
70. Abi Khattar, Z.; Rejasse, A.; Destoumieux-Garzon, D.; Escoubas, J.M.; Sanchis, V.; Lereclus, D.; Givaudan, A.; Kallassy, M.; Nielsen-Leroux, C.; Gaudriault, S. The dlt operon of bacillus cereus is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J Bacteriol* **2009**, *191*, 7063-7073.

71. Roy, H. Tuning the properties of the bacterial membrane with aminoacylated phosphatidylglycerol. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 940-953.
72. Raetz, C.R.; Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **2002**, *71*, 635-700.
73. Hankins, J.V.; Madsen, J.A.; Giles, D.K.; Childers, B.M.; Klose, K.E.; Brodbelt, J.S.; Trent, M.S. Elucidation of a novel vibrio cholerae lipid a secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol Microbiol* **2011**, *81*, 1313-1329.
74. Phillips, N.J.; Adin, D.M.; Stabb, E.V.; McFall-Ngai, M.J.; Apicella, M.A.; Gibson, B.W. The lipid a from vibrio fischeri lipopolysaccharide: A unique structure bearing a phosphoglycerol moiety. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 21203-21219.
75. Guilhelmelli, F.; Vilela, N.; Albuquerque, P.; Derengowski Lda, S.; Silva-Pereira, I.; Kyaw, C.M. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol* **2013**, *4*, 353.
76. Needham, B.D.; Trent, M.S. Fortifying the barrier: The impact of lipid a remodeling on bacterial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **2013**, *11*, 467-481.
77. Matson, J.S.; Yoo, H.J.; Hakansson, K.; Dirit, V.J. Polymyxin b resistance in el tor vibrio cholerae requires lipid acylation catalyzed by msbb. *J Bacteriol* **2010**, *192*, 2044-2052.
78. Hankins, J.V.; Madsen, J.A.; Giles, D.K.; Brodbelt, J.S.; Trent, M.S. Amino acid addition to vibrio cholerae lps establishes a link between surface remodeling in gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 8722-8727.
79. Guo, L.; Lim, K.B.; Gunn, J.S.; Bainbridge, B.; Darveau, R.P.; Hackett, M.; Miller, S.I. Regulation of lipid a modifications by salmonella typhimurium virulence genes phop-phoq. *Science* **1997**, *276*, 250-253.
80. Dalebroux, Z.D.; Miller, S.I. *Salmonellae* phopq regulation of the outer membrane to resist innate immunity. *Curr Opin Microbiol* **2014**, *17*, 106-113.
81. Bashyam, M.D.; Hasnain, S.E. The extracytoplasmic function sigma factors: Role in bacterial pathogenesis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **2004**, *4*, 301-308.
82. Davis, B.M.; Waldor, M.K. High-throughput sequencing reveals suppressors of vibrio cholerae *rpoe* mutations: One fewer porin is enough. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37*, 5757-5767.
83. Mathur, J.; Davis, B.M.; Waldor, M.K. Antimicrobial peptides activate the vibrio cholerae sigmae regulon through an ompu-dependent signalling pathway. *Mol Microbiol* **2007**, *63*, 848-858.
84. Mathur, J.; Waldor, M.K. The vibrio cholerae *toxr*-regulated porin ompu confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **2004**, *72*, 3577-3583.
85. Duperthuy, M.; Binesse, J.; Le Roux, F.; Romestand, B.; Caro, A.; Got, P.; Givaudan, A.; Mazel, D.; Bachere, E.; Destoumieux-Garzon, D. 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* **2010**, *12*, 951-963.
86. Beveridge, T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **1999**, *181*, 4725-4733.
87. Wai, S.N.; Takade, A.; Amako, K. The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic escherichia coli. *Microbiol Immunol* **1995**, *39*, 451-456.
88. Kulp, A.; Kuehn, M.J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **2010**, *64*, 163-184.
89. Chatterjee, S.N.; Das, J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by vibrio cholerae. *J Gen Microbiol* **1967**, *49*, 1-11.
90. Hong, G.E.; Kim, D.G.; Park, E.M.; Nam, B.H.; Kim, Y.O.; Kong, I.S. Identification of vibrio anguillarum outer membrane vesicles related to immunostimulation in the japanese flounder, paralichthys olivaceus. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2009**, *73*, 437-439.

91. Kim, Y.R.; Kim, B.U.; Kim, S.Y.; Kim, C.M.; Na, H.S.; Koh, J.T.; Choy, H.E.; Rhee, J.H.; Lee, S.E. Outer membrane vesicles of *vibrio vulnificus* deliver cytolysin-hemolysin vvha into epithelial cells to induce cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *399*, 607-612.
92. Manning, A.J.; Kuehn, M.J. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2013**, *23*, 131-141.
93. Duperthuy, M.; Sjostrom, A.E.; Sabharwal, D.; Damghani, F.; Uhlin, B.E.; Wai, S.N. Role of the *vibrio cholerae* matrix protein bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **2013**, *9*, e1003620.
94. Vanhove, A.S.; Duperthuy, M.; Charriere, G.M.; Le Roux, F.; Goudenege, D.; Gourbal, B.; Kieffer-Jaquinod, S.; Coute, Y.; Wai, S.N.; Destoumieux-Garzon, D. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* **2014**.
95. Song, T.; Mika, F.; Lindmark, B.; Liu, Z.; Schild, S.; Bishop, A.; Zhu, J.; Camilli, A.; Johansson, J.; Vogel, J., *et al.* A new *vibrio cholerae* srna modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol Microbiol* **2008**, *70*, 100-111.
96. Nikaido, H.; Pages, J.M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **2012**, *36*, 340-363.
97. Piddock, L.J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4*, 629-636.
98. Putman, M.; van Veen, H.W.; Konings, W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **2000**, *64*, 672-693.
99. Hinchliffe, P.; Symmons, M.F.; Hughes, C.; Koronakis, V. Structure and operation of bacterial tripartite pumps. *Annu Rev Microbiol* **2013**, *67*, 221-242.
100. Bina, J.E.; Mekalanos, J.J. *Vibrio cholerae* tolC is required for bile resistance and colonization. *Infect Immun* **2001**, *69*, 4681-4685.
101. Bina, X.R.; Provenzano, D.; Nguyen, N.; Bina, J.E. *Vibrio cholerae* rnd family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* **2008**, *76*, 3595-3605.
102. Nikaido, H.; Zgurskaya, H.I. Acrab and related multidrug efflux pumps of *escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2001**, *3*, 215-218.
103. Buckley, A.M.; Webber, M.A.; Cooles, S.; Randall, L.P.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Piddock, L.J. The acrab-tolC efflux system of *salmonella enterica* serovar typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* **2006**, *8*, 847-856.
104. Poole, K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2001**, *3*, 255-264.
105. Kitaoka, M.; Miyata, S.T.; Unterweger, D.; Pukatzki, S. Antibiotic resistance mechanisms of *vibrio cholerae*. *J Med Microbiol* **2011**, *60*, 397-407.
106. Bina, J.E.; Provenzano, D.; Wang, C.; Bina, X.R.; Mekalanos, J.J. Characterization of the *vibrio cholerae* vexab and vexcd efflux systems. *Arch Microbiol* **2006**, *186*, 171-181.
107. Taylor, D.L.; Bina, X.R.; Bina, J.E. *Vibrio cholerae* vexh encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS One* **2012**, *7*, e38208.
108. Shen, C.J.; Kuo, T.Y.; Lin, C.C.; Chow, L.P.; Chen, W.J. Proteomic identification of membrane proteins regulating antimicrobial peptide resistance in *vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol* **2010**, *108*, 1398-1407.
109. Chen, Y.C.; Chuang, Y.C.; Chang, C.C.; Jeang, C.L.; Chang, M.C. A k<sup>+</sup> uptake protein, trka, is required for serum, protamine, and polymyxin b resistance in *vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **2004**, *72*, 629-636.
110. Bossemeyer, D.; Borchard, A.; Dosch, D.C.; Helmer, G.C.; Epstein, W.; Booth, I.R.; Bakker, E.P. K<sup>+</sup>-transport protein trka of *escherichia coli* is a peripheral membrane protein that requires

- other trk gene products for attachment to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 16403-16410.
111. Chakraborty, K.; Ghosh, S.; Koley, H.; Mukhopadhyay, A.K.; Ramamurthy, T.; Saha, D.R.; Mukhopadhyay, D.; Roychowdhury, S.; Hamabata, T.; Takeda, Y., *et al.* Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hcap-18/II-37) and human beta-defensin 1 (hbd-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **2008**, *10*, 2520-2537.
  112. Shirin, T.; Rahman, A.; Danielsson, A.; Uddin, T.; Bhuyian, T.R.; Sheikh, A.; Qadri, S.S.; Qadri, F.; Hammarstrom, M.L. Antimicrobial peptides in the duodenum at the acute and convalescent stages in patients with diarrhea due to vibrio cholerae o1 or enterotoxigenic escherichia coli infection. *Microbes Infect* **2011**, *13*, 1111-1120.
  113. Vidal-Dupiol, J.; Ladriere, O.; Destoumieux-Garzon, D.; Sautiere, P.E.; Meistertzheim, A.L.; Tambutte, E.; Tambutte, S.; Duval, D.; Foure, L.; Adjeroud, M., *et al.* Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 22688-22698.
  114. Vidal-Dupiol, J.; Dheilly, N.M.; Rondon, R.; Grunau, C.; Cosseau, C.; Smith, K.M.; Freitag, M.; Adjeroud, M.; Mitta, G. Thermal stress triggers broad pocillopora damicornis transcriptomic remodeling, while vibrio coralliilyticus infection induces a more targeted immuno-suppression response. *PlosOne in press*.
  115. Venier, P.; Varotto, L.; Rosani, U.; Millino, C.; Celegato, B.; Bernante, F.; Lanfranchi, G.; Novoa, B.; Roch, P.; Figueras, A., *et al.* Insights into the innate immunity of the mediterranean mussel mytilus galloprovincialis. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 69.
  116. Daniels, N.A. Vibrio vulnificus oysters: Pearls and perils. *Clin Infect Dis* **2011**, *52*, 788-792.
  117. Quayle, A.J.; Porter, E.M.; Nussbaum, A.A.; Wang, Y.M.; Brabec, C.; Yip, K.P.; Mok, S.C. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol* **1998**, *152*, 1247-1258.
  118. Singh, P.K.; Jia, H.P.; Wiles, K.; Hesselberth, J.; Liu, L.; Conway, B.A.; Greenberg, E.P.; Valore, E.V.; Welsh, M.J.; Ganz, T., *et al.* Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 14961-14966.
  119. Zhao, C.; Wang, I.; Lehrer, R.I. Widespread expression of beta-defensin hbd-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* **1996**, *396*, 319-322.
  120. Mathews, M.; Jia, H.P.; Guthmiller, J.M.; Losh, G.; Graham, S.; Johnson, G.K.; Tack, B.F.; McCray, P.B., Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* **1999**, *67*, 2740-2745.
  121. O'Neil, D.A.; Porter, E.M.; Elewaut, D.; Anderson, G.M.; Eckmann, L.; Ganz, T.; Kagnoff, M.F. Expression and regulation of the human beta-defensins hbd-1 and hbd-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* **1999**, *163*, 6718-6724.
  122. Liu, L.; Wang, L.; Jia, H.P.; Zhao, C.; Heng, H.H.; Schutte, B.C.; McCray, P.B., Jr.; Ganz, T. Structure and mapping of the human beta-defensin hbd-2 gene and its expression at sites of inflammation. *Gene* **1998**, *222*, 237-244.
  123. Chromek, M.; Slamova, Z.; Bergman, P.; Kovacs, L.; Podracka, L.; Ehren, I.; Hokfelt, T.; Gudmundsson, G.H.; Gallo, R.L.; Agerberth, B., *et al.* The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nature medicine* **2006**, *12*, 636-641.
  124. Hase, K.; Eckmann, L.; Leopard, J.D.; Varki, N.; Kagnoff, M.F. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin II-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* **2002**, *70*, 953-963.
  125. Durr, U.H.; Sudheendra, U.S.; Ramamoorthy, A. Ll-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 1408-1425.
  126. Canny, G.; Levy, O. Bactericidal/permeability-increasing protein (bpi) and bpi homologs at mucosal sites. *Trends in immunology* **2008**, *29*, 541-547.



127. Falco, A.; Chico, V.; Marroqui, L.; Perez, L.; Coll, J.M.; Estepa, A. Expression and antiviral activity of a beta-defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) est sequences. *Mol Immunol* **2008**, *45*, 757-765.
128. Uzzell, T.; Stolzenberg, E.D.; Shinnar, A.E.; Zasloff, M. Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides* **2003**, *24*, 1655-1667.
129. Douglas, S.E.; Gallant, J.W.; Liebscher, R.S.; Dacanay, A.; Tsoi, S.C. Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish. *Dev Comp Immunol* **2003**, *27*, 589-601.
130. Cole, A.M.; Weis, P.; Diamond, G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 12008-12013.
131. Noga, E.J.; Silphaduang, U. Piscidins: A novel family of peptide antibiotics from fish. *Drug news & perspectives* **2003**, *16*, 87-92.
132. Salerno, G.; Parrinello, N.; Roch, P.; Cammarata, M. Cdna sequence and tissue expression of an antimicrobial peptide, dicentracin; a new component of the moronecidin family isolated from head kidney leukocytes of sea bass, *dicentrarchus labrax*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **2007**, *146*, 521-529.
133. Park, I.Y.; Park, C.B.; Kim, M.S.; Kim, S.C. Parasin i, an antimicrobial peptide derived from histone h2a in the catfish, *parasilurus asotus*. *FEBS Lett* **1998**, *437*, 258-262.
134. Birkemo, G.A.; Luders, T.; Andersen, O.; Nes, I.F.; Nissen-Meyer, J. Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in atlantic halibut (*hippoglossus hippoglossus* l.). *Biochim Biophys Acta* **2003**, *1646*, 207-215.
135. Sorensen, O.; Arnljots, K.; Cowland, J.B.; Bainton, D.F.; Borregaard, N. The human antibacterial cathelicidin, hcap-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* **1997**, *90*, 2796-2803.
136. Agerberth, B.; Charo, J.; Werr, J.; Olsson, B.; Idali, F.; Lindbom, L.; Kiessling, R.; Jornvall, H.; Wigzell, H.; Gudmundsson, G.H. The human antimicrobial and chemotactic peptides ll-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **2000**, *96*, 3086-3093.
137. Knutson, M.D.; Oukka, M.; Koss, L.M.; Aydemir, F.; Wessling-Resnick, M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 1324-1328.
138. Sow, F.B.; Florence, W.C.; Satoskar, A.R.; Schlesinger, L.S.; Zwillling, B.S.; Lafuse, W.P. Expression and localization of hepcidin in macrophages: A role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol* **2007**, *82*, 934-945.
139. Weiss, J.; Olsson, I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* **1987**, *69*, 652-659.
140. Calafat, J.; Janssen, H.; Tool, A.; Dentener, M.A.; Knol, E.F.; Rosenberg, H.F.; Egsten, A. The bactericidal/permeability-increasing protein (bpi) is present in specific granules of human eosinophils. *Blood* **1998**, *91*, 4770-4775.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

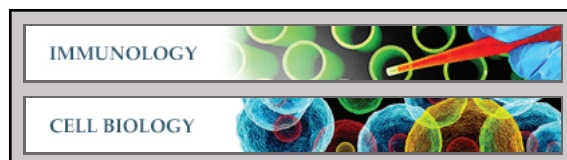
**Immunology:**

**Antimicrobial Histones and DNA Traps in  
Invertebrate Immunity: EVIDENCES IN  
CRASSOSTREA GIGAS**

Aurore C. Poirier, Paulina Schmitt, Rafael D.  
Rosa, Audrey S. Vanhove, Sylvie  
Kieffer-Jaquinod, Tristan P. Rubio, Guillaume  
M. Charrière and Delphine  
Destoumieux-Garzón

*J. Biol. Chem.* 2014, 289:24821-24831.

doi: 10.1074/jbc.M114.576546 originally published online July 17, 2014



---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.576546](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2014/07/17/M114.576546.DC1.html>

This article cites 37 references, 8 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/289/36/24821.full.html#ref-list-1>

# Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity

## EVIDENCES IN *CRASSOSTREA GIGAS*<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, April 24, 2014, and in revised form, July 1, 2014. Published, JBC Papers in Press, July 17, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.576546

Aurore C. Poirier<sup>+1</sup>, Paulina Schmitt<sup>+5</sup>, Rafael D. Rosa<sup>+1,2,3</sup>, Audrey S. Vanhove<sup>+1</sup>, Sylvie Kieffer-Jaquinod<sup>¶</sup>, Tristan P. Rubio<sup>‡</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>+4</sup>, and Delphine Destoumieux-Garzón<sup>‡</sup>

From <sup>†</sup>Laboratory of Ecology of Coastal Marine Systems, CNRS UMR 5119, University of Montpellier 2, Ifremer, University of Montpellier 1, and IRD, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France, the <sup>‡</sup>Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Universidad 330, 2373223 Valparaíso, Chile, and <sup>¶</sup>INSERM, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Université Joseph Fourier, U1038, Etude de la Dynamique des Protéomes, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

**Background:** How antimicrobial histones participate in invertebrate defense was still unclear.

**Results:** Upon injury or infection, oyster immune cells release antimicrobial histones and extracellular DNA traps in a ROS-dependent manner.

**Conclusion:** DNA traps are involved in the defense of Lophotrochozoa. Their mechanistic bases are shared with vertebrates.

**Significance:** This is a novel mechanism in the evolutionary conserved invertebrate immune arsenal.

Although antimicrobial histones have been isolated from multiple metazoan species, their role in host defense has long remained unanswered. We found here that the hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* release antimicrobial H1-like and H5-like histones in response to tissue damage and infection. These antimicrobial histones were shown to be associated with extracellular DNA networks released by hemocytes, the circulating immune cells of invertebrates, in response to immune challenge. The hemocyte-released DNA was found to surround and entangle vibrios. This defense mechanism is reminiscent of the neutrophil extracellular traps (ETs) recently described in vertebrates. Importantly, oyster ETs were evidenced *in vivo* in hemocyte-infiltrated interstitial tissues surrounding wounds, whereas they were absent from tissues of unchallenged oysters. Consistently, antimicrobial histones were found to accumulate in oyster tissues following injury or infection with vibrios. Finally, oyster ET formation was highly dependent on the production of reactive oxygen species by hemocytes. This shows that ET formation relies on common cellular and molecular mechanisms from vertebrates to invertebrates. Altogether, our data reveal that ET formation is a defense mechanism triggered by infection and tissue damage, which is shared by relatively distant species suggesting either evolutionary conservation or convergent evolution within Bilateria.

Histones play an essential role in the organization and architecture of the chromatin, and their post-translational modifications are essential to gene regulation (1). Since 1942 (2), histones have been shown to display antimicrobial activities against bacteria, fungi, viruses, and protozoa (3). In Protostomia, antimicrobial histones have been isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* (4), the scallop *Chlamys farrieri* (5), the abalone *Haliotis discus discus* (6), and recently the oyster *Crassostrea virginica* (7, 8). However, the mechanisms facilitating histone release, which is a prerequisite for their antimicrobial activities on potential pathogens, has long remained unidentified.

In 2004, a new antimicrobial mechanism relying on the release, by mammalian neutrophils, of extracellular DNA-carrying histones and granular antimicrobial proteins bound to the decondensed nucleic acids was uncovered (9). More recently, those extracellular traps (ETs)<sup>5</sup> have been observed to form massively in infected tissues by intravital microscopy, demonstrating further their role in host defense (10). ETs can be released in response to bacteria, fungi, parasites, and viruses (9, 11, 12), to microbe-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide (LPS), and to host inflammatory signals associated with tissue damage such as interleukin-8 (9) and tumor necrosis factor (13). ETs were reported to entrap bacteria, fungi, and parasites (9, 11, 12) and to kill them by their content in antimicrobial peptides/proteins including histones, bactericidal permeability-increasing proteins, and hydrolases (9, 12, 14–16). However, some bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and group A Streptococci are found entrapped into ETs without being killed (17,

\* This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Vibriogen project, Blanc SVSE7 2011) and the Languedoc-Roussillon region (REVARESP project, Chercheur(se) d'avenir 2009).

[5] This article contains Online supplement 1.

<sup>1</sup> Supported by a fellowship from the Ministry of Higher Education and Research.

<sup>2</sup> Present address: Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Dept. of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>3</sup> Supported by a fellowship from Ifremer.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed: Equipe "Réponse immunitaire des macroorganismes marins et environnement," Laboratoire ECOSYM, Université Montpellier 2, CC80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France. Tel.: 33-467-14-46-25; Fax: 33-467-14-46-22; E-mail: guillaume.charriere@univ-montp2.fr.

<sup>5</sup> The abbreviations used are: ET, extracellular trap; ROS, reactive oxygen species; PMA, phorbol myristate acetate; MIC, minimum inhibitory concentration; DPI, diphenylene iodonium chloride; WGA, wheat germ agglutinin; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate; SSW, sterile seawater; DAMP, damage-associated molecular pattern; HMG, high mobility group; CIP, Collection de l'institut Pasteur.

## DNA Extracellular Traps in Oyster Defense

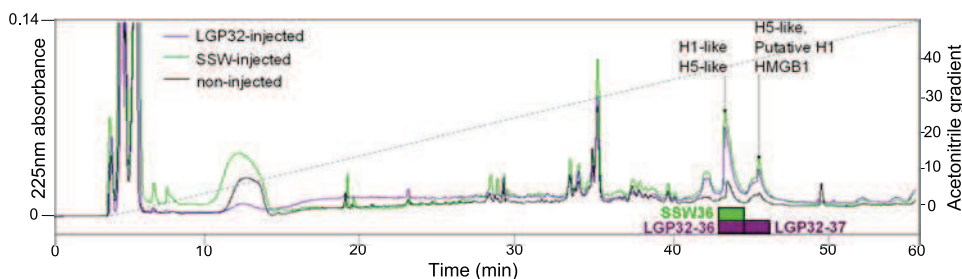


FIGURE 1. **Antimicrobials accumulate in oyster gills 24 h after infection or injury.** Reversed-phase HPLC was performed on gill extracts from non-injected oysters (black line), SSW-injected oysters (green line), and *V. tasmaniensis* LGP32-injected (LGP32-injected) oysters (purple line) using a 0–80% acetonitrile gradient (dotted line) developed over 90 min, on a UP5ODB-25QS column. Absorbance at 225 nm (continuous lines) showed an increase in intensity for the fractions eluted at 36% of acetonitrile in LGP32-injected (LGP32–36) and SSW-injected oysters (SSW36) and for the fraction eluted at 37% of acetonitrile in LGP32-injected oysters (LGP32–37). Purple and green ovals show antimicrobial fractions in LGP32-injected and SSW-injected oysters, respectively. LGP32–36, LGP32–37, and SSW36 were the only fractions showing antimicrobial activity against *S. aureus* SG511. The molecules found by LC-MS/MS in active fractions are displayed with arrows.

18). ETs can then play two important roles in the control of infections, first by entrapping microbes and preventing their dissemination, and second by concentrating antimicrobials and potentially killing microbes (10, 16, 19).

Although ETs have been well studied in vertebrates (Deuterostomia) over the past decade, studies on invertebrates have remained sparse and limited to arthropods (Ecdysozoa, Protostomia). In 2008, a first report suggested that extracellular nucleic acids enhance immunity and induce hemolymph coagulation in *Galleria mellonella* (20). More recently, an *in vitro* study showed that hemocytes from the shrimp *L. vannamei* release ETs able to entrap bacteria upon challenge with LPS, phorbol myristate acetate (PMA), or bacteria (21). To the best of our knowledge, clear evidences of ETs formation *in vivo* and characterization of the underlying mechanisms have not been reported yet in any invertebrate.

Here we performed a comprehensive study on DNA extracellular traps in the defense of a lophotrochozoan, the oyster *Crassostrea gigas*. Our work reveals that *C. gigas* hemocytes form ETs associated with antimicrobial histones both *in vitro* and *in vivo*, in response to infections and tissue damage, and that these ETs can entrap bacteria. By using a quantitative approach, we also show that similar to vertebrate neutrophils, oyster hemocytes require the production of reactive oxygen species to release ETs. Altogether, our data reveal that *C. gigas*, a lophotrochozoan, uses ET formation as defense mechanism that can be triggered by infection and tissue damage. From this study, this defense mechanism is shared by distant species among the main branches of the Bilateria.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cationic Protein Extraction from *C. gigas* Tissues**—*C. gigas* adult oysters were carved in the dorsal side of the shell with a small notch and acclimated for 5 days in seawater tanks. Then, 16 oysters were challenged by injection in the adductor muscle of 100  $\mu$ l of *Vibrio tasmaniensis* LGP32 ( $1 \times 10^7$  CFU/oyster), an oyster pathogen (22) recently assigned to *V. tasmaniensis* within the Splendidus clade (23). After 24 h, gills were dissected, frozen at  $-80^\circ\text{C}$ , and ground to fine powder. Gill powder was resuspended in 5% acetic acid and a mixture of protease inhibitors (Sigma). After sonication, proteins were acid-extracted for 3 h at  $4^\circ\text{C}$  and centrifuged

twice at  $13,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min. pH was adjusted to 6.8 before the addition of a cation exchange resin (CM Macro-Prep, Bio-Rad). After overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the resin was washed with 25 mM ammonium acetate, pH 6.8, and proteins were eluted twice with 1% TFA in ultrapure water.

**Purification of Antimicrobial Proteins**—Cation exchange extracted proteins were fractionated on a C18 reversed-phase HPLC column (UP5ODB 25QS,  $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 2.0 \text{ mm}$ , Interchim) using a linear gradient of 0% to 80% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) over 90 min at a flow rate of 0.7 ml/min. Fractions were dried under vacuum, dissolved in ultrapure water, and tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* SG511. Antimicrobial fractions were purified by a second step of reversed-phase HPLC (X-bridge BEH130,  $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ , Waters) using a biphasic gradient of 0–26% and 26–46% acetonitrile in 0.05% TFA over 5 and 80 min at a flow rate of 0.25 ml/min. Fractions were dried under vacuum, dissolved in ultrapure water, and tested for antimicrobial activity.

**Protein Identification**—Purity of active fractions was assessed by MALDI-TOF-MS, while sequences were obtained by nano-LC-MS/MS after digestion with trypsin or V8 endopeptidase. LC-MS/MS spectra were analyzed using the automated Mascot algorithm (Matrix Science Ltd., London, UK), and homology searches of the purified protein sequences were performed using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Results were validated by the software IRMa (Mascot Results Interpretation). Sequence alignment was performed with the ClustalW2 tool of European Bioinformatics Institute server (EBI).

**Antimicrobial Assays**—Antibacterial activity of HPLC fractions was assayed against the Gram-positive *Micrococcus lysodeikticus* Collection de l'institut Pasteur (CIP) 5345, *Bacillus megaterium* CIP 66.20, *S. aureus* SG 511, as well as the Gram-negative *Escherichia coli* SBS363 and *V. tasmaniensis* LGP32. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined in poor broth (1% Bacto-Tryptone, 0.5% NaCl w/v, pH 7.5) medium by the liquid growth inhibition assay as described previously (24). Poor broth was supplemented with 2.9% NaCl for the marine *V. tasmaniensis*. Incubation was performed for 18 h

under shaking (150 rpm) at 30 °C for *M. lysodeikticus* and *B. megaterium*, at 37 °C for *S. aureus* and *E. coli*, and at 20 °C for *V. tasmaniensis*. Growth was monitored by optical density at 620 nm on a microplate reader infinite M200 (Tecan).

**Induction of Extracellular Traps**—Hemolymph withdrawn from the oyster pericardial cavity was kept on ice before plating hemocytes on 13-mm glass coverslips in 24-well culture plates at  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. One h after plating, ET formation was induced by adding *V. tasmaniensis* LGP32, *V. tasmaniensis* LMG20012T, *Brevibacterium stationis* CIP 101282, or Zymosan particles to hemocytes at a multiplicity of infection of 50:1. Plates were centrifuged for 5 min at  $500 \times g$  to synchronize binding and further incubated at 20 °C for 30 min, 1 h, or 2 h. To assess the involvement of reactive oxygen species (ROS) in ET formation, hemocytes were pretreated with 10  $\mu$ M diphenylene iodonium chloride (DPI, Sigma) for 1 h before microbial challenge. For microscopy analyses of living cells, 0.5  $\mu$ M Sytox Green nucleic acid stain (Molecular Probes) was added to hemocytes. Live imaging was performed on an Axiovert 200M Zeiss inverted microscope. For other experiments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min and stained with 1.25  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma) and either 16.5 nM phalloidin-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) or 2  $\mu$ g/ml wheat germ agglutinin (WGA)-TRITC (Sigma). Immunostaining was performed with a rabbit anti-H5-like histone antibody generated against the NH<sub>2</sub>-TPKPAKAKKAAPKPKPASHC-COOH

peptide conjugated to Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Proteogenix). Fixed and permeabilized hemocytes were first incubated for 45 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl and then for 20 min in PBS containing 5% BSA. Then, 20  $\mu$ g/ml antibody dissolved in PBS containing 5% BSA was added to coverslips and incubated for 1 h. After three washes in PBS, 10  $\mu$ g/ml anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 was added and incubated for 1 h. Coverslips were then washed, stained with DAPI, and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO).

**Monitoring of Reactive Oxygen Species Production**—Hemocytes freshly withdrawn from oysters were plated on a 96-well plate at a density of  $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. After 1 h of incubation at 17 °C to let the cells settle down, the wells were washed with sterile seawater (SSW) and incubated for 1 h in SSW supplemented with 1  $\mu$ M luminol (Sigma). Then, zymosan particles (at a multiplicity of infection of 50:1) or PMA (at a final concentration of 1  $\mu$ M, Sigma) were quickly added, and the plate was immediately placed into a microplate reader infinite M200 (Tecan) to quantify the luminescence emission every 2 min for 2 h. To inhibit ROS production, 10  $\mu$ M DPI was added to hemocytes 1 h before the addition of ROS inducers (PMA or zymosan).

**Histology**—Whole oysters were fixed with Davidson's fixative for 42 h. After dissection, muscles and gills were embedded in paraffin. Histological sections and hematoxylin-eosin staining were performed at the technical platform of RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier UMS3426 CNRS, US9 INSERM, University Montpellier 1 and 2). After rehydration, histological sections were permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min, washed three times in PBS, and stained with 0.25  $\mu$ g/ml DAPI for 1 h. After three washes in PBS, coverslips were mounted over histological sections with fluorescent mounting medium (DAKO).

**Image Acquisition and Extranuclear Histone Quantification**—Histological sections stained with DAPI; coverslips labeled with DAPI, WGA-TRITC, and phalloidin were observed with 40 $\times$  or 63 $\times$  objectives, and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope. Extranuclear histones were quantified on hemocytes immunostained with anti-H5-like histone antibody and counterstained with DAPI using a method adapted from Brinkmann *et al.* (25). Briefly, for every conditions, 80 images were taken randomly over the entire surface of the coverslip (covering more than a thousand hemocytes) using a 40 $\times$  objective on a Zeiss Axio Imager upright fluorescence microscope

TABLE 1

MICs of native H1-like histone (GenBank EKC17653)

	MIC
	$\mu$ M
<i>M. lysodeikticus</i> CIP 53.45	0.7
<i>B. megaterium</i> CIP 66.20	0.18
<i>S. aureus</i> SG511	0.7
<i>E. coli</i> SBS363	0.7
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32	>0.7

TABLE 2

Estimated MIC of the LGP32–36 HPLC fraction

	MIC <sup>a</sup>
	$\mu$ M
<i>M. lysodeikticus</i> CIP 53.45	0.35
<i>B. megaterium</i> CIP 66.20	0.35
<i>S. aureus</i> SG511	0.7
<i>E. coli</i> SBS363	0.7
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32	>0.7

<sup>a</sup> MICs were determined in  $\mu$ g/ml and converted into  $\mu$ M considering an average molecular mass of 20176 Da (Fig. 2).

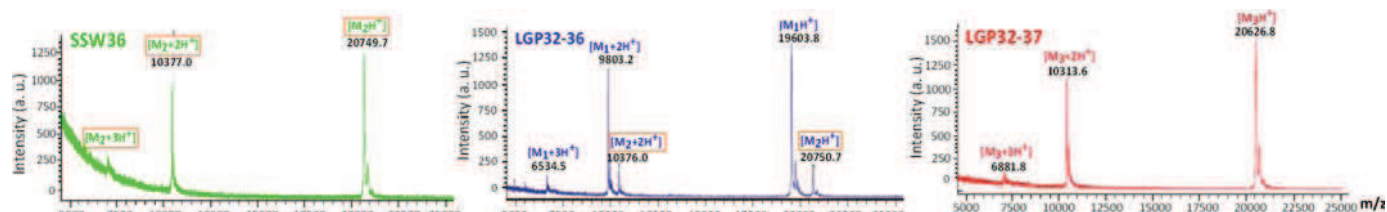


FIGURE 2. **Mass spectrometry analysis of antimicrobial HPLC fractions.** MALDI-TOF spectra were acquired on the antimicrobial fractions issued from two rounds of reversed-phase HPLC. The SSW36 fraction (green) is pure, showing single-, double-, and triple-charged ions of one single molecule (molecular mass M2) at  $MH^+ = 20,749.7$  Da. The LGP32–36 fraction (blue) contains two molecular species, showing ions of one major molecule (molecular mass M1) at  $MH^+ = 19,603.8$  Da and ions of a minor molecule at  $MH^+ = 20,750.7$  Da also found in SSW36. The LGP32–37 fraction (red) is pure, showing ions of one single molecule (molecular mass M3) at  $MH^+ = 20,626.8$  Da. a. u., arbitrary units.

## DNA Extracellular Traps in Oyster Defense

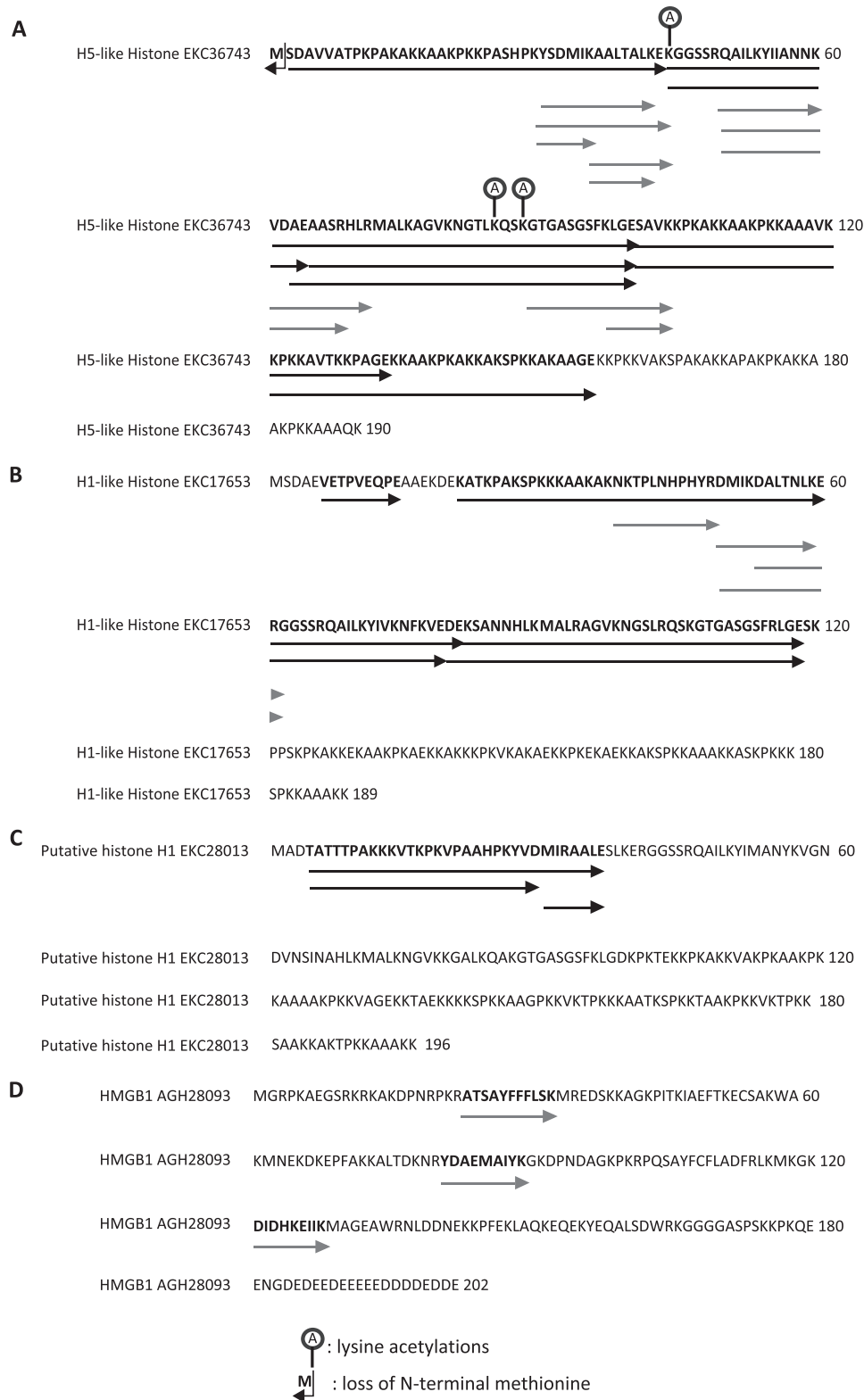


FIGURE 3. Alignment of LC-MS/MS sequenced peptides with the full-length sequences of H1- and H5-like histones and HMGB1. A–D, H1-like histone (A), H5-like histone (B), putative H1-like histone (C), and HMGB1 (D) full sequences were aligned with LC-MS/MS peptides. Black arrows indicate peptides obtained after endopeptidase V8 digestion, and gray arrows indicate for peptides obtained after trypsin digestion. Sites of acetylation observed by LC-MS/MS are displayed above the sequences.

equipped with an AxioCam MRm 2 digital microscope camera. The image files were then analyzed with FIJI software (26). For every image, the DAPI-stained nuclei of hemocytes

were counted. The total area revealed by anti-H5-like histone staining and the total area revealed by DNA staining DAPI-staining were measured in  $\mu\text{m}^2$ . The area occupied by

extranuclear histones only was obtained by subtracting the DAPI-stained area to the anti-H5-like histone stained area. The area of extranuclear histones was finally divided by the number of counted hemocytes (nuclei) to normalize on hemocyte density ( $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ).

## RESULTS

**Antimicrobials Accumulate in Oyster Gills 24 h after Infection or Injury**—Antimicrobial peptides/proteins were isolated from gills of oysters 24 h after an intramuscular injection of *V. tasmaniensis* LGP32 (LGP32) or SSW. For that, the dissected gills were subjected to acid extraction, cation exchange chromatography, and reversed-phase HPLC. Gills of non-injected oysters were used as a negative control. Two absorbance peaks strongly increased upon injection (Fig. 1). The corresponding HPLC fractions were the only fractions showing antimicrobial activity against *S. aureus* SG511 (Fig. 1, Tables 1 and 2). Two were isolated from LGP32-injected oysters (LGP32–36 and LGP32–37), and one was isolated from SSW-injected oysters (SSW36). No antimicrobial activity could be recorded in any fractions isolated from non-injected oysters.

After a second reversed-phase HPLC step, the active fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 2). The SSW36 fraction contained one single molecule with a measured molecular mass of 20,748.7 Da. The LGP32–36 fraction contained two molecules: a major one of 19,602.8 Da and a minor one of 20,749.7 Da, similar to that found in the SSW36 fraction. Finally, the LGP32–37 fraction contained one single molecule of 20,625.8 Da (Fig. 2).

**H1- and H5-like Histones Are the Major Antimicrobials of Challenged Oyster Gills**—The SSW36, LGP32–36, and LGP32–37 antimicrobial fractions were analyzed further by LC-MS/MS after trypsin and endopeptidase V8 digestion. Histones were found in all three fractions (Fig. 1). An H5-like histone (GenBank™ EKC36743) present in the three fractions was identified with a coverage of 81.6% (Fig. 3A). From the molecular mass measured by MALDI-TOF on the LGP32–36 fraction (19,602.8 Da) (Fig. 2) and from the modifications observed by MS/MS sequencing (Fig. 3), it could be deduced that it lacks its N-terminal methionine (–131 Da) and carries one lysine acetylation (+42 Da) (calculated mass = 19,601.8 Da). An H1-like histone (GenBank EKC17653) only found in LGP32–36 and SSW-36 was identified with a coverage of 57.1% (Fig. 3B). This lower coverage prevented its post-translational status to be established accurately. Finally, traces of a putative histone H1 (GenBank EKC28013) and an high mobility group 1 domain protein (HMGB1, GenBank AGH28093) were found in the LGP32–37 fraction (Figs. 1 and 3, C and D). Interestingly, this accumulation of antimicrobial histones in oyster tissues in response to damage/infection (Fig. 1) correlated with hemocyte infiltration in gill tissue (Fig. 4). This suggests that H1-like and H5-like antimicrobial histones could be brought by hemocytes.

**Oyster Histones Present Potent Antibacterial Activity**—Due to minute amounts of native proteins purified to homogeneity from oyster tissues, only the H1-like histone (isolated from SSW36) was tested for antimicrobial activity in a low range of concentrations (0–0.7  $\mu\text{M}$ ). Potent activities were observed against *M. lysodeikticus* CIP 53.45, *S. aureus* SG511, *E. coli* SBS363, and

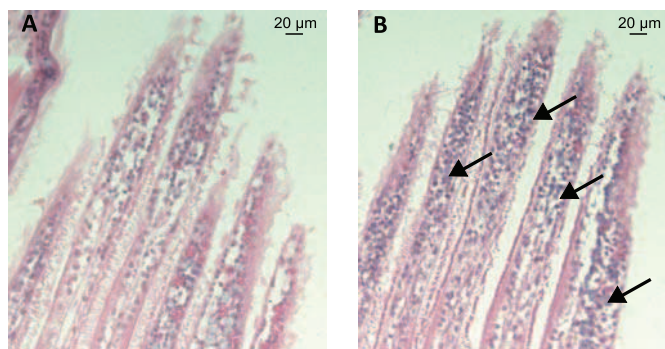


FIGURE 4. Hemocyte infiltration in gills of LGP32-infected oysters. A and B, histological sections of gills of unchallenged oyster (A) and of oysters infected for 24 h with *V. tasmaniensis* LGP32 (B). Hematoxylin-eosin staining shows a major hemocyte infiltration in gills of oyster infected with *V. tasmaniensis* LGP32.

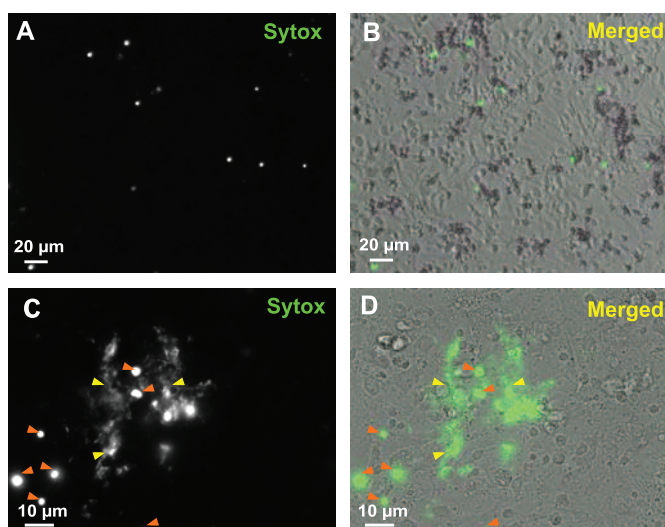
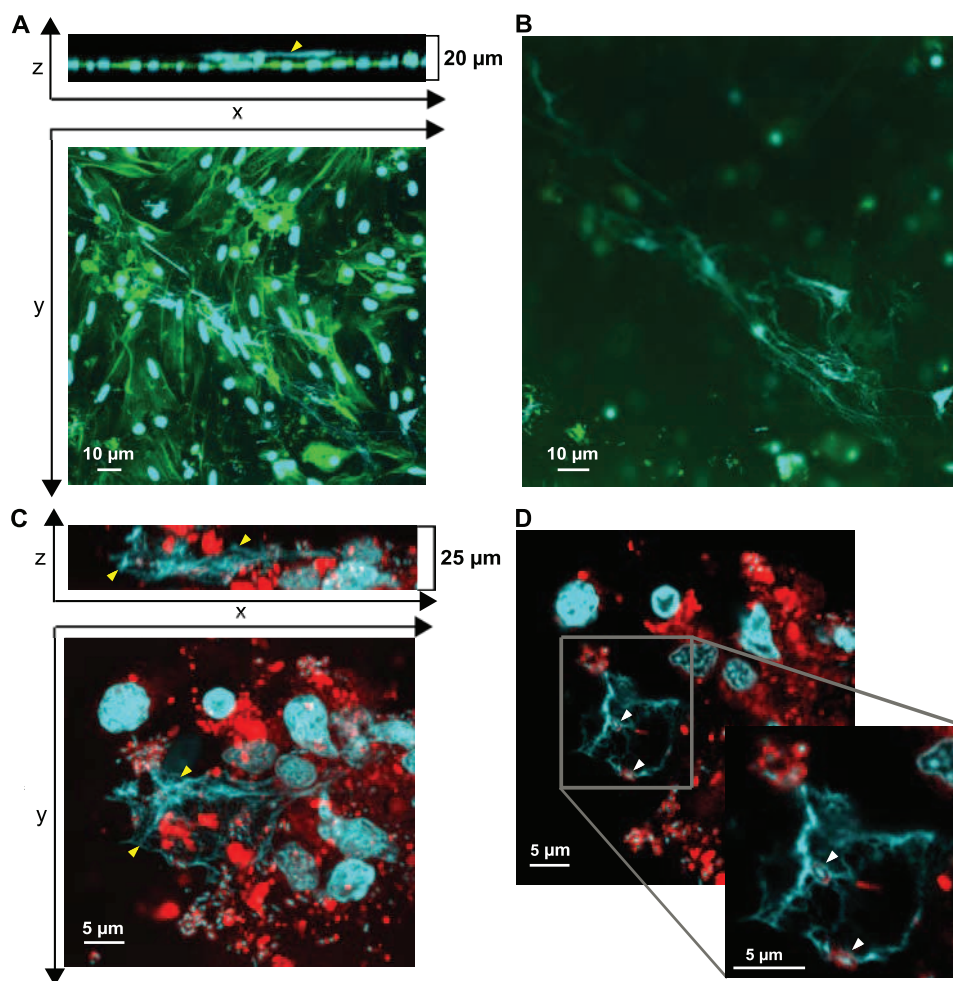


FIGURE 5. Living oyster hemocytes release extracellular DNA upon bacterial challenge. A–D, cultures of unchallenged hemocytes (A and B) and hemocytes challenged for 45 min with *V. tasmaniensis* LGP32 (C and D) were stained with Sytox Green and observed by epifluorescence microscopy to reveal extracellular DNA and dead cell nuclei. B and D, bright field images acquired to visualize total cells were merged to epifluorescence images. C and D, extracellular DNA networks (yellow arrowheads) were observed in areas where cells are dead (orange arrowheads) after *V. tasmaniensis* LGP32 challenge only.

*B. megaterium* CIP 66.20 with MICs < 0.7  $\mu\text{M}$  but not against *V. tasmaniensis* LGP32 (Table 1). The MICs estimated for LGP32–36, which contains the H5-like histone together with low amounts of H1-like histone, were also in the low micromolar range against most of the tested strains (Table 2).

**Oyster Hemocytes Release DNA Extracellular Traps in Response to Bacterial Challenge**—To identify the defense mechanism by which histones are released in oyster tissues, oyster hemocytes were challenged with LGP32 *in vitro*. The cell-impermeant nucleic acid dye, Sytox Green, added to the primary cultures revealed clusters of permeabilized cells and extracellular DNA only 45 min after LGP32 challenge, whereas most of the hemocytes remained unstained (Fig. 5, C and D). In control hemocytes, permeabilized cells were rarely detectable without any visible extracellular DNA (Fig. 5, A and B). To get higher imaging resolution of the extracellular DNA structures, confocal microscopy was per-

## DNA Extracellular Traps in Oyster Defense



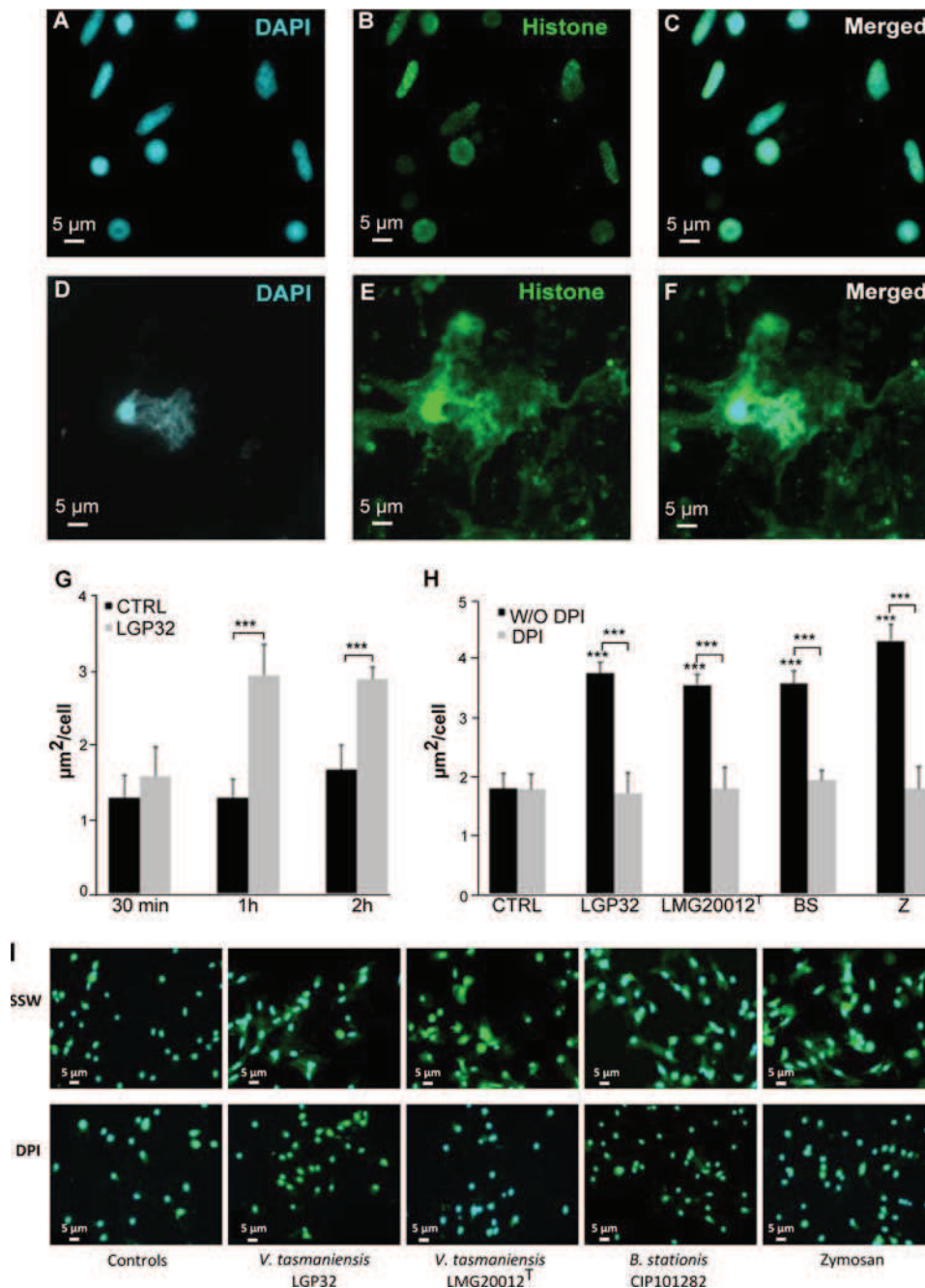
**FIGURE 6. Oyster hemocytes release DNA extracellular traps in which bacteria are entrapped.** *A* and *B*, DNA ETs released by oyster hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32. Confocal microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and filamentous actin with phalloidin-Alexa Fluor 448 (green). *A*, projections of a z stack and a y stack made from 20 confocal sections. An extracellular DNA ET can be observed extending from 5 to 10  $\mu\text{m}$  above the layer of adherent hemocytes (yellow arrowhead). *B*, an upper confocal section depicting the longest ET observed in the preparation. *C* and *D*, bacteria entrapped in ETs of hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32. Confocal microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and cellular membranes with WGA-TRITC (red). *C*, projections of a z stack and a y stack made from 125 confocal sections. ETs stained with DAPI (yellow arrowheads) were observed in areas with a high bacterial density and extending up to 10  $\mu\text{m}$  above adherent hemocytes. *D*, bacteria were found entrapped in ETs (white arrowheads), as revealed by their blue nucleic acid staining (DAPI) and red membrane staining (WGA-TRITC) on one representative confocal section of 0.2- $\mu\text{m}$  thickness. See [Online supplement 1](#) for full z-stack.

formed. Extracellular networks of DNA filaments were observed 1 h after LGP32 challenge. They were found to extend 5–10  $\mu\text{m}$  above the hemocyte monolayer whose actin cytoskeleton was stained with fluorescent phalloidin (Fig. 6, *A* and *B*). To determine whether vibrios could be entrapped into the extracellular DNA, confocal three-dimensional imaging was performed at a higher magnification after staining the bacterial cell wall with the WGA-TRITC lectin. Numerous vibrios were found entrapped in these extracellular DNA networks as shown on a representative confocal section (0.2- $\mu\text{m}$  thickness) (Fig. 6, *C* and *D*) and in the reconstituted z-stack containing all the focal planes ([Online supplement 1](#)). Altogether, these data show that (i) *C. gigas* hemocytes can form large DNA ETs upon challenge with *V. tasmaniensis* LGP32, and (ii) vibrios are entrapped into these ETs.

**Release of H5-like Histones Is Associated with ET Formation and Dependent on the Production of ROS**—To determine whether the antimicrobial histones isolated from gills of infected/wounded oysters could be released during ET for-

mation, a polyclonal antibody was raised against an N-terminal peptide designed on the sequence of the H5-like histone. Immunostaining was performed on both control and LGP32-challenged hemocytes. As expected, in control hemocytes, H5-like histones were found only within hemocyte nuclei (Fig. 7, *A–C* and *I*). Conversely, in LGP32-challenged hemocytes, a significant amount of H5-like histones was found to be extranuclear both in the cytosol and in the extracellular space surrounding ETs, showing that H5-like histones are released along with DNA during ET formation (Fig. 7, *D–F* and *I*). Thanks to the H5-like histone immunostaining, we were able to develop a method by automated image analyses to quantify the release of H5-like histone by oyster hemocytes, which is indicative of ET formation (see “Experimental Procedures”). In control hemocytes, the amounts of extranuclear histones remained stable over time (Fig. 7*G*). In accordance with our previous observations (Figs. 5 and 6), a significant nuclear release of H5-like histones was measured in LGP32-challenged hemocytes as soon





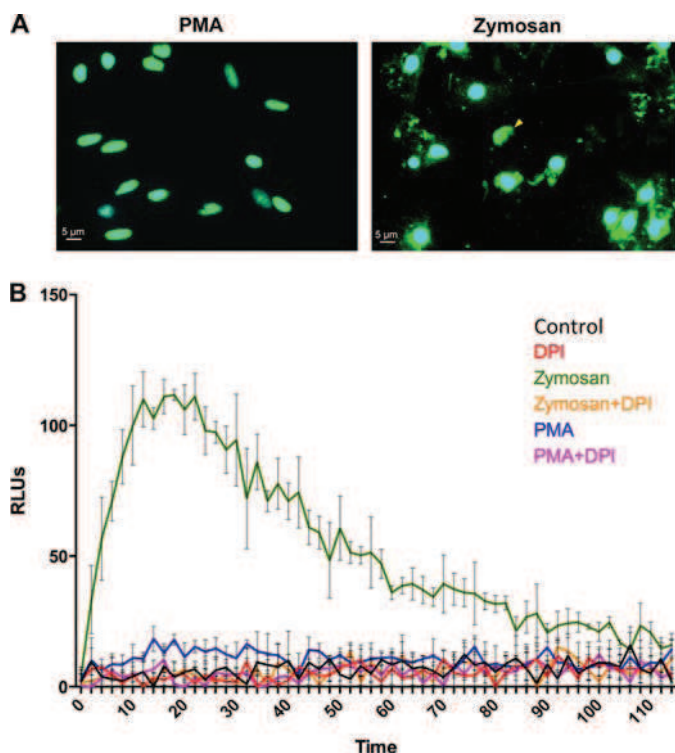
**FIGURE 7. ET release is triggered by different microbes and depends on ROS production.** A–F, H5-like histone immunostaining of ETs. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue, A and D) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green, B and E). In unchallenged hemocytes (A–C), H5-like histones co-localized with nuclear DNA (merge in C). In hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32 (D–F), H5-like histones formed large extranuclear areas around ETs (merge in F). G, time course of ET formation in response to challenge with *V. tasmaniensis* LGP32. Extranuclear histone areas ( $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ) were similar to unchallenged hemocytes (controls (CTRL), black) at 30 min. A 2-fold increase was observed 1 and 2 h after *V. tasmaniensis* LGP32 challenge (*V. tasmaniensis*, light gray). Averages and standard deviations were calculated from two independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$  (Student's *t* test). H, inhibition of ET formation upon blocking of ROS production. *V. tasmaniensis* LGP32 (LGP32), *V. tasmaniensis* LMG20012<sup>T</sup> (LMG20012<sup>T</sup>), *B. stationis* CIP101282 (BS), or zymosan (Z) triggered similar ET formation (black) after a 1-h challenge as indicated by extranuclear histone quantification. In all challenge conditions, DPI treatment (light gray) was sufficient to inhibit release of extranuclear histone down to levels of unchallenged hemocytes. Averages and standard deviations were calculated from three independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$  (Student's *t* test). I, the most representative photographs of the hemocyte response to microbial challenge in the presence/absence of DPI. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green). The extracellular histones observed in non-treated samples (SSW) are absent in DPI-treated samples. Sets of eighty similar images were used for extranuclear histone quantification.

as 1 h after challenge with a 2-fold increase in the average size of extranuclear histone areas ( $p < 0.001$ , Fig. 7G). There was no significant difference in the amount of extranuclear histones between 1 and 2 h, indicating that the release of H5-like histone and ET formation was rapid and synchro-

nized for most hemocytes capable of forming ETs in our experimental conditions.

To investigate the diversity of microbial challenges that could trigger ET formation, different bacterial strains and microbe-associated molecular patterns were tested including

## DNA Extracellular Traps in Oyster Defense



**FIGURE 8. Zymosan but not PMA induces ROS production and ET formation by oyster hemocytes.** A, representative photographs of the hemocyte response to stimulation with PMA or zymosan. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green). The extranuclear histones and ETs observed in zymosan-stimulated samples are absent in PMA-stimulated samples. B, ROS production was monitored in control hemocytes (black line) and after hemocyte stimulation with PMA (blue line) or zymosan (green line). The inhibition of ROS production by DPI treatment was monitored in control hemocytes (red line), PMA-stimulated hemocytes (pink line), and zymosan-stimulated hemocytes (orange line). Results are expressed in relative luminescence units (RLUs) indicative of luminol oxidation. Averages and standard deviations were calculated from three independent experiments.

the Gram-negative *Vibrio tasmaniensis* LMG20012<sup>T</sup> and LGP32, the Gram-positive *B. stationis* CIP 101282, and zymosan particles used as a yeast surrogate. All of them induced a massive release of H5-like histones indicative of ET formation without significant difference between microbial challenges (Fig. 7, *H* and *I*). As neutrophil ET formation in mammals has been shown to depend on the production of ROS (27), a ROS production inhibitor (DPI) was used in our assays. Remarkably, DPI treatment was sufficient to completely inhibit the release of extranuclear H5-like histones, whose quantities remained as low as in unchallenged hemocytes for any kind of microbial challenge (Fig. 7, *H* and *I*).

To determine whether ROS production is sufficient to induce ET formation by oyster hemocytes, we used PMA, a well described inducer of oxidative burst and ET formation in mammalian neutrophils (27). Surprisingly, in contrast to zymosan, PMA did not induce ET formation nor the release of extranuclear H5-like histones by hemocytes (Fig. 8A). This correlated with a lack of ROS production in PMA-stimulated hemocytes, as determined by chemiluminescence (Fig. 8B). On the contrary, zymosan induced a strong oxidative burst in hemocytes, which correlated with the induction of ET formation and the release of extranuclear H5-like histones (Fig. 8, A and B). Sup-

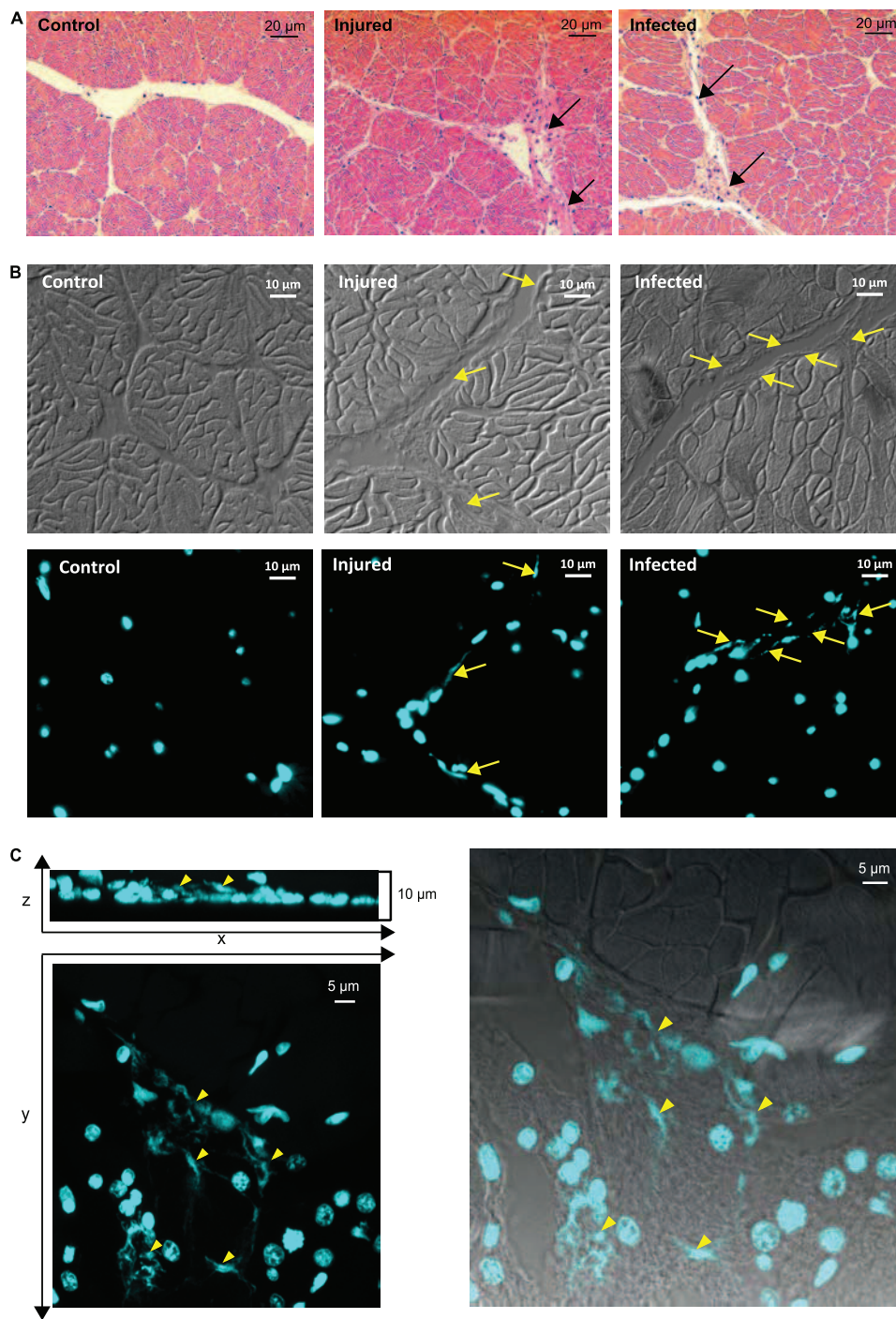
porting the hypothesis of a ROS-dependent process, DPI was sufficient to inhibit zymosan effects, *i.e.* ROS production (Fig. 8B) and ET formation (Fig. 7). Taken together, these results show that ET formation in *C. gigas* hemocytes can be triggered by a broad diversity of microbial agents and depends strongly on ROS production.

*ETs Are Observed in Vivo in Infected or Wounded Tissues*—Finally, we assessed whether ETs could form *in vivo*. Oysters were either challenged with a sublethal injection of *V. tasmaniensis* LGP32 or injured by a sterile puncture in the adductor muscle. Massive hemocyte infiltrations were observed in gills (Fig. 4) and in the adductor muscles (Fig. 9A). In gills, the high hemocyte density precluded the imaging resolution needed to observe extracellular DNA filaments. In adductor muscles, cell infiltrates were found within interstitial tissue between fascicles of muscle fibers at the wound periphery in both LGP32-challenged and injured oysters 1 day after the challenge (Fig. 9, A and B). More importantly, DNA filaments were observed in these hemocyte-infiltrated regions, whereas only intact cell nuclei were observed in control animals after DAPI staining (Fig. 9C). Confocal microscopy was performed on a thick tissue section to get a better three-dimensional reconstruction of the areas containing extracellular DNA. Images confirmed the presence of ETs between fascicles of muscle fibers, and in the z-projected image, intact cell nuclei were observed above and below the ET areas, indicating that the DNA was not released as a result of any nuclei damaging during the preparation of histological sections (Fig. 9C). Taken together, these data showed that infiltrating hemocytes can release ETs *in vivo* in response to infection or tissue damage.

## DISCUSSION

Results showed that antimicrobial histones accumulate together with extracellular DNA in oyster tissues in response to infection and injury. Tissues of non-injected oysters were devoid of such antimicrobial histones (Fig. 1), indicating that histone accumulation in tissues was induced by the challenges. The major antimicrobial histones isolated here were H5-like and H1-like histones. Antimicrobial H2B and H4 histones have also been isolated from another oyster species, *C. virginica* (7) (8). Similar to our observations, protein levels of H4 histone strongly increased in hemocyte lysates and extracellular hemolymph of *C. virginica* oysters infected with *Perkinsus marinus* (8). Therefore, accumulation of histones in oyster tissues could be a common response to infection and injury.

The antimicrobial histones isolated from oyster gills showed a broad spectrum of antimicrobial activities with MICs as low as 0.18  $\mu\text{M}$  against *Bacillus megaterium* CIP 66.20 for native H1-like histone (Table 1). Together with oyster defensins (24), the H1-like histone is therefore one of the most potent antimicrobials of *C. gigas* described so far. No activity could be recorded against the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32, whereas the H2B and H4 histones from *C. virginica* were reported to be active against vibrios (7, 8). This may be due to the intrinsic resistance of *V. tasmaniensis* LGP32 to antimicrobials (28) or to the low range of concentrations tested (0–0.7  $\mu\text{M}$ ). Because tissues of *C. gigas* oysters are poor in antimicrobial peptides/proteins (29), the isolation of histones as the only



**FIGURE 9. ETs are observed *in vivo* in muscles of infected or injured oysters.** *A*, hematoxylin-eosin stained adductor muscles of unchallenged (*Control*), *V. tasmaniensis* LGP32-infected, and injured oysters. Infiltrating hemocytes are found between muscle fascicles after injury (*black arrows, middle panel*) or after infection (*black arrows, right panel*). *B*, epifluorescence microscopy observation of DAPI-stained ETs within histological sections of muscle infiltrated with hemocytes. Contrast phase images are shown below epifluorescence images. ETs are observed in cell-infiltrated interstitial tissues between fascicles of muscle fibers after injury (*yellow arrows, middle panel*) or after *V. tasmaniensis* LGP32 infection (*yellow arrows, right panel*). No ETs are observed in muscle of control animals (*left panel*). *C*, confocal microscopy observation of DAPI-stained ETs within a thick histological section of muscle infiltrated with hemocytes. Projections of a z stack and a y stack display several ETs (*yellow arrowheads, left panel*). Intact cell nuclei are observed above and below ETs (z projection, *left panel*). Superposition of the phase confocal section and y projection (*right panel*) shows that ETs located in cell-infiltrated interstitial tissues between fascicles of muscle fibers.

antimicrobials found in gills of challenged oysters strongly argues in favor of their role in the oyster antimicrobial defense.

*In vitro*, antimicrobial histones were rapidly released (in less than 1 h) by oyster hemocytes together with extracellular DNA when exposed to diverse microbial agents (Figs.

5–8 and [Online supplement 1](#)). Importantly, this phenomenon was also observed *in vivo* (Fig. 9). Indeed, both LGP32-infected and injured oysters showed a massive hemocyte infiltration and release of extracellular DNA in tissues surrounding the site of injury (Fig. 9). These DNA structures are

## DNA Extracellular Traps in Oyster Defense

reminiscent of the neutrophil ETs well studied in vertebrates such as mammals, birds, and fish over the past decade (15, 16, 30). In the present work, bacteria were found entrapped into such extracellular DNA networks (Fig. 6 and Online supplement 1). This strongly suggests that, as in vertebrates, oyster ETs participate in host defense by capturing large numbers of microbes and preventing their dissemination (16). Surrounding and entangling of bacteria in DNA or peptide networks are indeed increasingly recognized as conserved mechanisms of antimicrobial defense (31). Moreover, as shown in some vertebrates, the antimicrobial properties of the ET-associated antimicrobials including histones (Table 1) and their concentration on ETs could also contribute to kill the entrapped microorganisms (10, 16, 19).

The formation of oyster ETs was shown here to be dependent on ROS production by hemocytes (Fig. 7H), which results from NADPH-oxidase activity and/or mitochondrial respiration (32). Indeed, we observed a strong positive correlation between ROS production and ET formation (Figs. 7 and 8). This result is particularly important because ROS play a central role in initiating ET formation in vertebrates (27). However, unlike in vertebrates, PMA failed to trigger the oxidative burst and the formation of ETs by oyster hemocytes under our experimental conditions. Along with ROS, damage-associated molecular patterns (DAMPs) released by injured tissues (33) likely regulate ET formation in oysters. Indeed, we first showed that an aseptic injury is sufficient to induce accumulation of histones and extracellular DNA release *in vivo*. Second, an HMG domain protein group 1 (HMGB1) was identified in the LGP32–37 HPLC fraction, issued from LGP32-infected oysters (Fig. 1). HMGB1 is a DAMP of intracellular origin well known in vertebrates (34) but also in *C. gigas*, in which it enhances the Rel-dependent NF- $\kappa$ B activation (35). Importantly, HMGB1 was recently shown to promote neutrophil ET formation through TLR-4 activation (36). Therefore, the ROS-dependent production of ETs by oyster hemocytes can be triggered by microbial agents and potentially by DAMPs released in the extracellular milieu in response to injury or cell lysis.

One limitation of the present study is that the hemocyte subset producing ETs has not been identified. We believe that ETs are produced by certain hemocyte subsets only because numerous intact cells are observed in ET-containing regions in both *in vivo* and *in vitro* microscopy observations (Figs. 5 and 8). In vertebrates, ETs are formed mostly by neutrophils (9, 15, 16). However, the accurate determination of ET-forming hemocytes remains challenging in oysters, hemocytes subsets being still mainly classified based on morphological features rather than molecular markers (37).

In conclusion, the present study shows that oysters use the release of DNA extracellular traps and antimicrobial histones as part of their immune defense. Therefore, this defense mechanism is shared by relatively distant species belonging to the different branches of the Bilateria, not only the Deuterostomia (mammals, birds, fishes) and the Ecdysozoa (shrimp) but also the Lophotrochozoa (oyster). The identification of ROS as a secondary messenger required for ET formation in oysters supports the evolutionary conservation within Bilateria of an important immune strategy without ruling out the hypothesis

of a convergent evolution between phylogenetically distant species.

*Acknowledgments*—We are grateful to Agnès Vergnes and Marc Leroy for technical assistance. We thank the Montpellier RIO Imaging platform for access to confocal and epifluorescence microscopy, the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” histology facility for histology expertise and tissue processing, and the mass spectrometry platform of the “Institut des Biomolécules Max Mousseron” for MALDI-TOF-MS.

## REFERENCES

1. Parseghian, M. H., and Luhrs, K. A. (2006) Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 589–604
2. Miller, B. F., Abrams, R., Dorfman, A., and Klein, M. (1942) Antibacterial properties of protamine and histone. *Science* **96**, 428–430
3. Kawasaki, H., and Iwamuro, S. (2008) Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug. Targets* **8**, 195–205
4. Patat, S. A., Carnegie, R. B., Kingsbury, C., Gross, P. S., Chapman, R., and Schey, K. L. (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur. J. Biochem.* **271**, 4825–4833
5. Li, C., Song, L., Zhao, J., Zhu, L., Zou, H., Zhang, H., Wang, H., and Cai, Z. (2007) Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* **22**, 663–672
6. De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Whang, I., Lee, J. S., and Lee, J. (2009) Abhisin: a potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 639–646
7. Seo, J. K., Stephenson, J., and Noga, E. J. (2011) Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **158**, 223–229
8. Dorrington, T., Villamil, L., and Gómez-chiarri, M. (2011) Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 94–101
9. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532–1535
10. Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytniuk, L. D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H. C., Malawista, S. E., de Boisleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., and Kubes, P. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393
11. Jenne, C. N., Wong, C. H., Zemp, F. J., McDonald, B., Rahman, M. M., Forsyth, P. A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013) Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* **13**, 169–180
12. Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Wardini, A. B., Pinto-da-Silva, L. H., and Saraiva, E. M. (2012) ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death. *J. Parasitol. Res.* **2012**, 929743
13. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., and Coonrod, S. A. (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* **184**, 205–213
14. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* **8**, 668–676
15. Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 577–582
16. Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* **30**, 513–521
17. Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., and Henriques-Normark, B. (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* **16**, 401–407

18. Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñoz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S., and Estrada-García, I. (2009) Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* **89**, 29–37
19. McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., and Kubes, P. (2012) Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host. Microbe* **12**, 324–333
20. Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T., and Vilcinskas, A. (2008) Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J. Immunol.* **181**, 2705–2712
21. Ng, T. H., Chang, S. H., Wu, M. H., and Wang, H. C. (2013) Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **41**, 644–651
22. Gay, M., Renault, T., Pons, A. M., and Le Roux, F. (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ* **62**, 65–74
23. Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., and Hayashi, T. (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front Microbiol.* **4**, 414
24. Schmitt, P., Wilmes, M., Pugnière, M., Aumelas, A., Bachère, E., Sahl, H. G., Schneider, T., and Destoumieux-Garzón, D. (2010) Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *J. Biol. Chem.* **285**, 29208–29216
25. Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L. I., and Zychlinsky, A. (2012) Automatic quantification of *in vitro* NET formation. *Front Immunol.* **3**, 413
26. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682
27. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* **176**, 231–241
28. Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (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
29. Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2012) The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: how diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Front Microbiol.* **3**, 160
30. Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C. B., and Roth, J. A. (2007) Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* **31**, 805–816
31. Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S. P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., Winter, M. G., Winter, S. E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N. H., Underwood, M. A., Tsolis, R. M., Young, G. M., Lu, W., Lehrer, R. I., Bäuml, A. J., and Bevins, C. L. (2012) Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* **337**, 477–481
32. Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A. K., and Sou-dant, P. (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* **7**, e46594
33. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045
34. Rubartelli, A., and Lotze, M. T. (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* **28**, 429–436
35. Li, J., Zhang, Y., Xiang, Z., Xiao, S., Yu, F., and Yu, Z. (2013) High mobility group box 1 can enhance NF- $\kappa$ B activation and act as a pro-inflammatory molecule in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 63–70
36. Tadie, J. M., Bae, H. B., Jiang, S., Park, D. W., Bell, C. P., Yang, H., Pittet, J. F., Tracey, K., Thannickal, V. J., Abraham, E., and Zmijewski, J. W. (2013) HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **304**, L342–349
37. Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., and Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* **198**, 149–168

Article

## Exposure to the Neurotoxic Dinoflagellate, *Alexandrium catenella*, Induces Apoptosis of the Hemocytes of the Oyster, *Crassostrea gigas*

Walid Medhioub<sup>1</sup>, Simon Ramondenc<sup>2</sup>, Audrey Sophie Vanhove<sup>2</sup>, Agnes Vergnes<sup>2</sup>, Estelle Masseret<sup>2</sup>, Veronique Savar<sup>3</sup>, Zouher Amzil<sup>3</sup>, Mohamed Laabir<sup>2</sup> and Jean Luc Rolland<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Laboratoire Milieu Marin, 28 rue du 2 mars 1934, Salammbô 2025, Tunisia; E-Mail: medhwalid@yahoo.fr

<sup>2</sup> Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Montpellier 2, Université de Montpellier 1, Institut de la Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche 5119 “Ecologie des Systèmes Marins Côtiers”, Place Eugene Bataillon, CC93, Montpellier cedex 5, 34095, France; E-Mails: simon.ramondenc@gmail.com (S.R.); audrey.vanhove@ifremer.fr (A.S.V.); agnes.vergnes@ifremer.fr (A.V.); estelle.masseret@univ-montp2.fr (E.M.); mohamed.laabir@univ-montp2.fr (M.L.)

<sup>3</sup> Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Laboratoire Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, Rue de l’Ile d’Yeu BP 21105, Nantes CEDEX 3 44311, France; E-Mails: veronique.savar@ifremer.fr (V.S.); zouher.amzil@ifremer.fr (Z.A.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jean.luc.rolland@ifremer.fr; Tel.: +33-467-144-709; Fax: +33-467-144-622.

Received: 27 September 2013; in revised form: 31 October 2013 / Accepted: 6 November 2013 / Published: 2 December 2013

---

**Abstract:** This study assessed the apoptotic process occurring in the hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, exposed to *Alexandrium catenella*, a paralytic shellfish toxins (PSTs) producer. Oysters were experimentally exposed during 48 h to the toxic algae. PSTs accumulation, the expression of 12 key apoptotic-related genes, as well as the variation of the number of hemocytes in apoptosis was measured at time intervals during the experiment. Results show a significant increase of the number of hemocytes in apoptosis after 29 h of exposure. Two pro-apoptotic genes (Bax and Bax-like) implicated in the mitochondrial pathway were significantly upregulated at 21 h followed by the overexpression of two caspase executor genes (caspase-3 and caspase-7) at 29 h, suggesting

that the intrinsic pathway was activated. No modulation of the expression of genes implicated in the cell signaling Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) and initiation-phase (caspase-2) was observed, suggesting that only the extrinsic pathway was not activated. Moreover, the clear time-dependent upregulation of five (Bcl2, BI-1, IAP1, IAP7B and Hsp70) inhibitors of apoptosis-related genes associated with the return to the initial number of hemocytes in apoptosis at 48 h of exposure suggests the involvement of strong regulatory mechanisms of apoptosis occurring in the hemocytes of the Pacific oyster.

**Keywords:** shellfish; toxins; apoptosis; gene expression

---

## 1. Introduction

Apoptosis or type I programmed cell death was reported to play an important role in organism immunity, especially in mollusks [1,2]. Based on the recent generation of Expressed Sequences Tags (EST) in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the basic genes and domains related to apoptosis-associated proteins were demonstrated to be conserved [3]. Apoptosis is initiated by either extracellular or intracellular signals. Extracellular signals activate the extrinsic pathway (receptor-mediated) through death receptors. These activated receptors recruit the cell signaling Fas-Associated protein with Death Domain (FADD), forming the death-inducing signaling complex (DISC), inducing the activation of initiator cysteine proteases of the caspase family. The intrinsic apoptotic pathway (mitochondrial) is activated in response to cytotoxic stimuli or environmental stressors. In vertebrates when stressed, mitochondria become permeable and release cytochrome C into the cytosol [4]. Cytochrome C induces the formation of the apoptosome complex (Apaf-1/cytochrome c/caspase-9), then activates executor caspases, which play a central role in the execution phase of cell apoptosis [5]. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins regulate this process by releasing apoptotic signals from the mitochondria [6–9]. Members of this family are conserved in invertebrate [10]. This family is composed of pro- and anti-apoptotic members. Anti-apoptotic Bcl-2 members display sequence homology in four  $\alpha$ -helical domains, called BH1–BH4 [10,11]. Pro-apoptosis can be further subdivided into more fully conserved, “multi-domain” members with homology in the BH1–BH3 domains and BH3-only Bcl-2 family proteins. The cell death process is also regulated by inhibitors of caspase, inhibitors of apoptosis (IAPs) [6] and heat shock proteins (Hsps) [12–14].

PSPs (paralytic shellfish poisons) are neurotoxins naturally produced by cyanobacteria and a number of toxic dinoflagellate species, such as *Alexandrium catenella*, *Gymnodinium catenatum* and *Pyrodinium bahamense* [15,16]. These toxins were demonstrated to be highly accumulated in oysters that feed on dinoflagellates [17]. Globally, such paralytic shellfish toxin (PST) producing species negatively affect the clearance rate, the feeding and digestive capacity of exploited bivalves [18–22]. However, no direct lethal effect on oyster has been shown. Saxitoxin and its analogs are potent Na<sup>+</sup> channel blockers in vertebrate cells and mitochondria and have negative effects on the cellular integrity of mollusk cells [23–25].

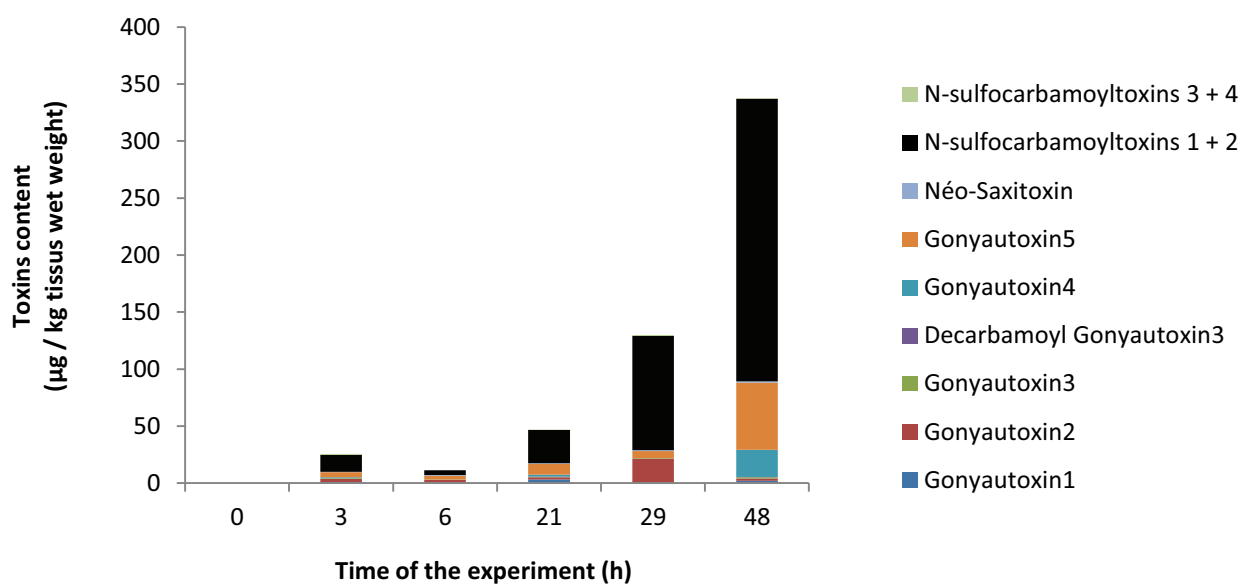
The aim of the present study was to investigate if exposure to a dense concentration of the toxic dinoflagellate, *A. catenella*, induces the apoptosis of the effective cells involved in the immune responses of oyster, the hemocytes. Oysters were experimentally exposed during 48 h to a toxic strain of *A. catenella* or a strain of *A. tamarensis*, a non-producer of PSTs, considered as the control. PST accumulation was measured in oyster tissues. Temporal expressions of putative apoptotic-related genes previously identified from the 210,895 ESTs from *C. gigas* reported in the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database as of 1 May 2013, were determined. Additionally, evolutions of the number of apoptotic cells were determined by microscopy during the experiment.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. PSP Accumulation in Oyster Tissues

The *Alexandrium catenella* (ACT03) strain contained  $5.3 \pm 0.4$  pg toxins/cell. The following toxins were found in decreasing concentrations: *N*-sulfocarbamoyltoxins 1 + 2 (51%), Gonyautoxins 5 (35%), Gonyautoxins 4 (12%), Gonyautoxins 1 (1%) and neo-Saxitoxin (1%) with *N*-sulfocarbamoyltoxins 4, Gonyautoxins 3, Saxitoxin and decarbamoyl saxitoxin present as trace amounts (not show). During the 48 h of the experiment, PSP toxins accumulated in oysters (Figure 1). The toxicity level reached 10 (2.2), 40 (2.07), 40 (7.4), 130 (13.6) and 360 (53.2)  $\mu\text{g/kg}$  tissue wet weight ( $\mu\text{g}$  Saxitoxin diHCl equivalent/kg wet weight) at three, six, 21, 29 and 48 h, respectively. Due to the small amount of cells available for the analysis, the PST accumulation in hemocytes was not determined.

**Figure 1.** Evolution of the paralytic shellfish poison (PSP)-toxin content ( $\mu\text{g/kg}$  wet weight) in *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium catenella*; the bar charts represent (in %) the temporal toxin.



The PST concentration in oyster after 48 h of exposure reaches 360 (53.2)  $\mu\text{g/kg}$  tissue wet weight ( $\mu\text{g}$  STX diHCl equivalent/kg wet weight). Such a level of toxicity was low, but close to that generally found in oyster in the environment. Since 1988, oysters cultivated in the French Mediterranean Thau



lagoon were frequently contaminated by PSP toxins during spring and/or autumn, but rarely did their contamination exceed the sanitary threshold (800 µg Saxitoxin diHCl equivalent/kg tissue wet weight) excepted in 2001 and 2003 [26].

## 2.2. Level of Hemocytes in Apoptosis

Exposure of oysters to *A. catenella* increased the number of nuclear degradations at 29 h (ANOVA,  $p < 0.01$ ), which coincided with a toxins concentration of 130 µg/kg oyster wet tissue (Figure 2). The hallmark of apoptosis is DNA degradation, which, in the early stages, is selective to the internucleosomal DNA linker regions. Many chemical agents have been shown to induce apoptosis in mollusks. Among these agents, heavy metals have been well documented in terms of their toxicity on ionic channels and the ability to bioaccumulate in the tissues [27]. For example, cadmium has been demonstrated to inhibit GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium levels in snail neurons [28] and to induce apoptosis in the hemocytes of the oyster, *Crassostrea virginica*, through a mitochondria/caspase-independent pathway [29]. Like heavy metals, saxitoxin and its analogs, all potent Na<sup>+</sup> channel blockers, may be responsible for the apoptosis observed here.

Surprisingly, after 48 h of exposure, while the concentration still increased to reach 0.36 µg/kg wet weights, no significant difference in the number of hemocytes in apoptosis was observed in comparison to the control (Figure 2). This suggests the implementation of an efficient regulatory mechanism to control apoptosis.

**Figure 2.** Evaluation of the number of hemocytes in apoptosis in oysters exposed for 48 h to *A. catenella*, (A) Percentage of cells in apoptosis. Oyster not exposed (white), exposed to *Alexandrium tamarens* (grey) or to *Alexandrium catenella* (dark grey), \* (ANOVA,  $p < 0.01$ ); (B) Hemocyte observations of oyster non-exposed (a), exposed for 29 h to *A. tamarens* (b) or to *A. catenella* (c) after Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling (TTMRNEL) staining (nuclei are stained in blue and apoptotic cells in red).

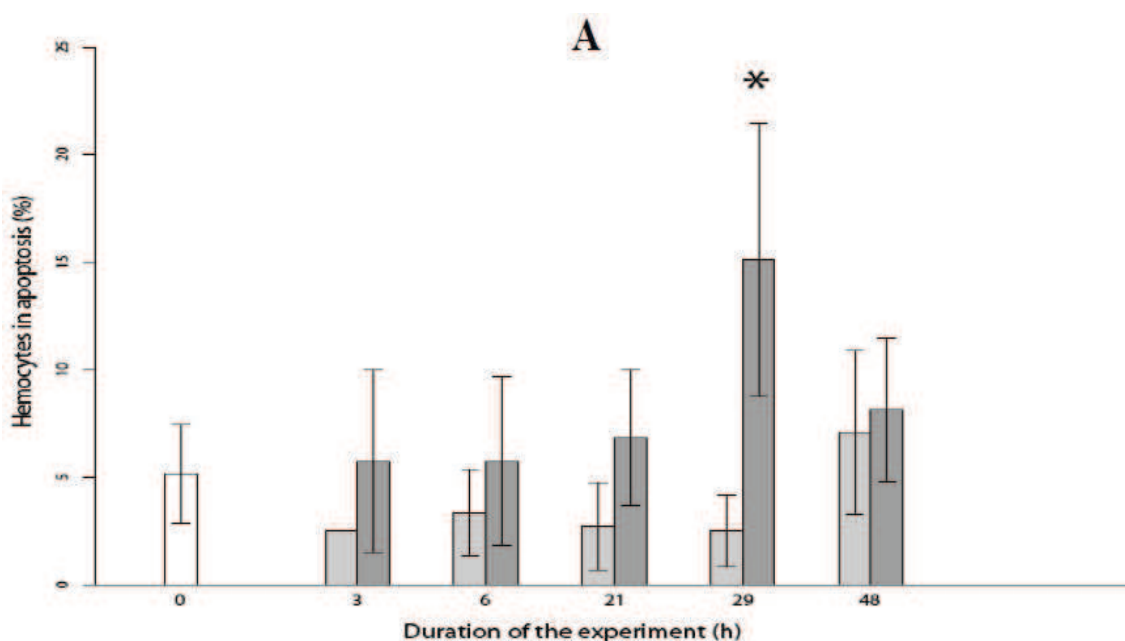
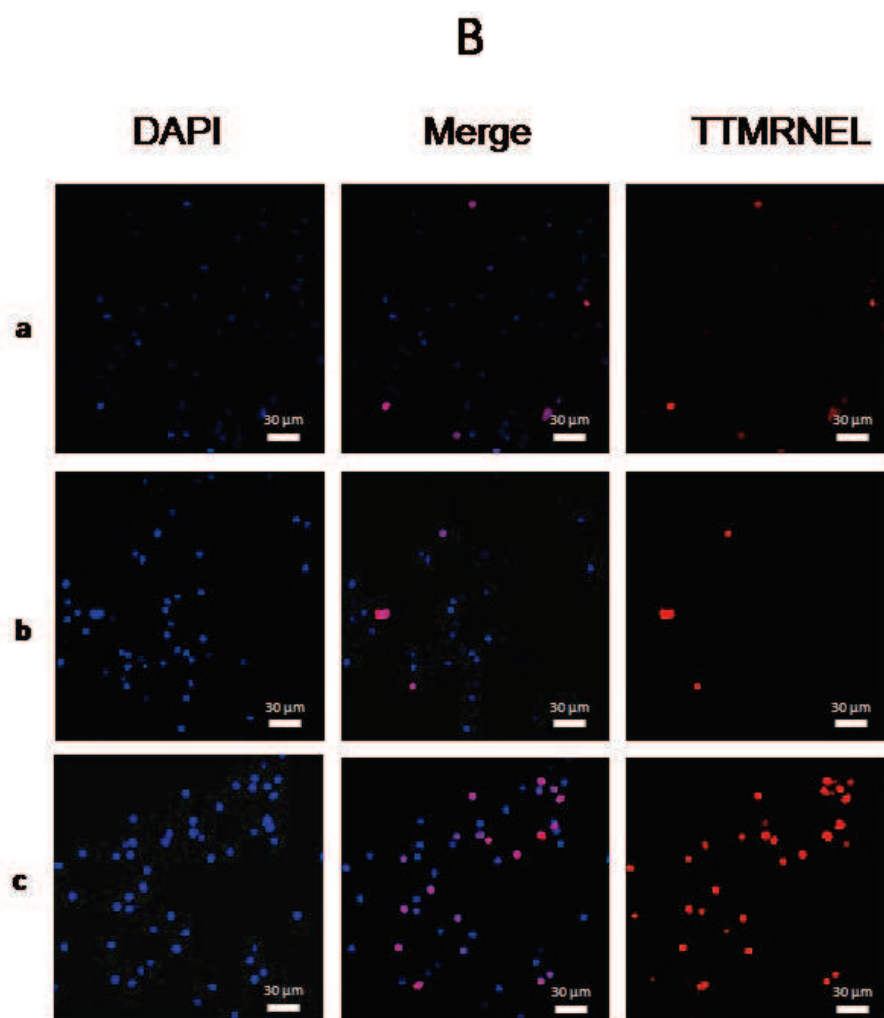


Figure 2. Cont.



### 2.3. Temporal Expression of the Genes Related to Apoptotic Processes

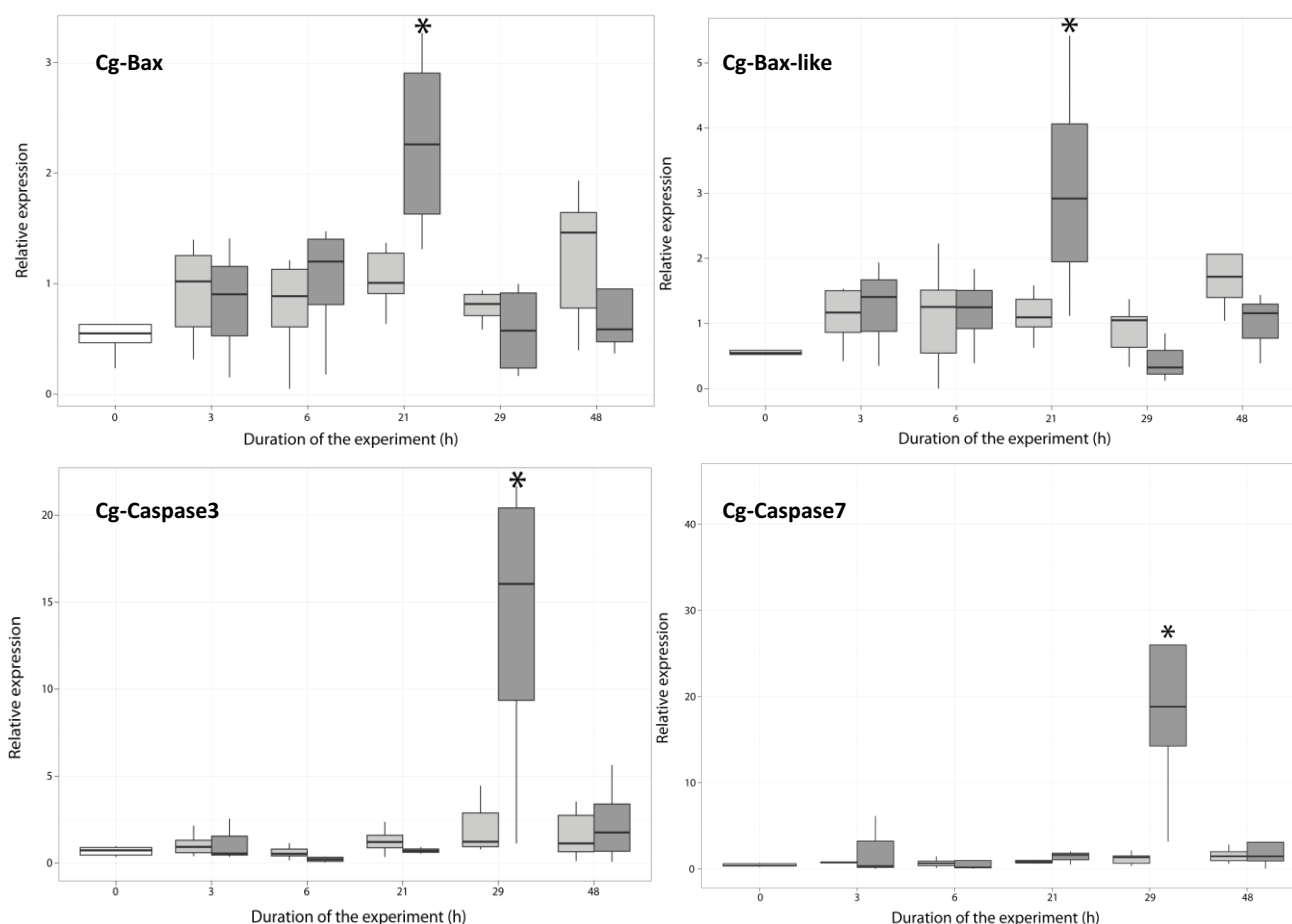
The expression level of putative apoptotic-related genes was evaluated in hemocytes of *C. gigas* exposed to toxic *A. catenella* or to the non-toxic *A. tamarensis* at zero, three, six, 21, 29 and 48 h after the beginning of the experiment. The genes selected are involved in the intrinsic pathway (Bax, Bax-like, Bcl2, BI-1), cell signaling (FADD), initiation-phase (caspase-2) and execution phase of cell apoptosis (caspase-3 and caspase-7). Other key genes associated with the regulation of the apoptosis system, executor caspase inhibitors (IAP1 and IAP-7B) and stress proteins (Hsp70 and Hsp27), were also analyzed.

#### 2.3.1. Expression of Apoptosis-Related Genes

The deduced amino-acid sequence of cg-Bax and cg-Bax-like display more than 40% identity with apoptotic Bax family members in three-helical domains, called BH1–BH3. Interestingly, cg-Bax-like shows more than 97% identity with the apoptosis regulator, Bcl-2 (EKC30556), and the Bcl-2-like protein 1 (EKC30554) and 72% identity with the Bcl-2-associated X protein from the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (AGK88247.1), but has no BH4 domain. Results showed that Bax transcripts were significantly overexpressed (ANOVA,  $p < 0.01$ ) at 21 h in oysters exposed to *A. catenella*

(Figure 3), whereas these genes were not modulated in the hemocytes of oysters exposed to *A. tamarensis*. In mammals, Bax members play a central role in the induction of the mitochondrial apoptosis pathway. When cells are exposed to various apoptotic stimuli, the proteins are overexpressed [30] and translocated into the mitochondria [31,32]. In the mitochondria, Bax forms oligomers in the outer membrane, permeabilizing the membrane and promoting the release of apoptotic factors, such as cytochrome c, into the cytosol [33,34].

**Figure 3.** Expression of cg-Bax, cg-Bax-like, cg-caspase-3 and cg-caspase-7 in the hemocyte of *Crassostrea gigas* not exposed (time 0, white), exposed to *Alexandrium tamarensis* (grey) or to *Alexandrium catenella* (dark grey). \* (ANOVA,  $p < 0.01$ ).



Cg-caspase-3 protein (EKC30354.1) and Cg-caspase-7 protein (EKC34323.1) display high identity with members of the executioner caspase (cysteine aspartate protease) family of proteins. Interestingly, *C. gigas* translated caspase-7 partial coding sequence (CU988427.1) and caspase-1 complete coding sequence (HQ425703.1) mRNA sequences display high identity with cg-caspase-3 (EKC30354.1). The *C. gigas* translated caspase-3/-7 complete cds (HQ425703.1) mRNA sequences display high identity with the cg-caspase-7 (EKC34323.1). Compared to the control, the level of cg-caspase-3 and cg-caspase-7 transcript increased significantly at 29 h (Figure 3) in the hemocytes of oysters fed the toxic *A. catenella* ( $p < 0.05$ ), but was not modulated in the hemocytes of oysters fed with the non-toxic *A. tamarensis*. In vertebrates, caspases play a central role in the execution-phase of cell apoptosis [35–37].

FADD and caspase-2 gene expression was not modulated in the hemocytes of *C. gigas* exposed to toxic or nontoxic *Alexandrium species* (not shown). In response to cytotoxic stimuli, DNA damage or environmental stressors, the signaling of the vertebrate extrinsic pathway begins with death receptor activation. It requires the interactions of their death domains and the downstream adapter, FADD [38]. Then, caspase-2 is activated, and apoptosis occurs [39]. These two genes were shown to be upregulated in *C. gigas* infected with *Vibrio anguillarum* [3]. This result suggests that the extrinsic pathway of apoptosis was not activated.

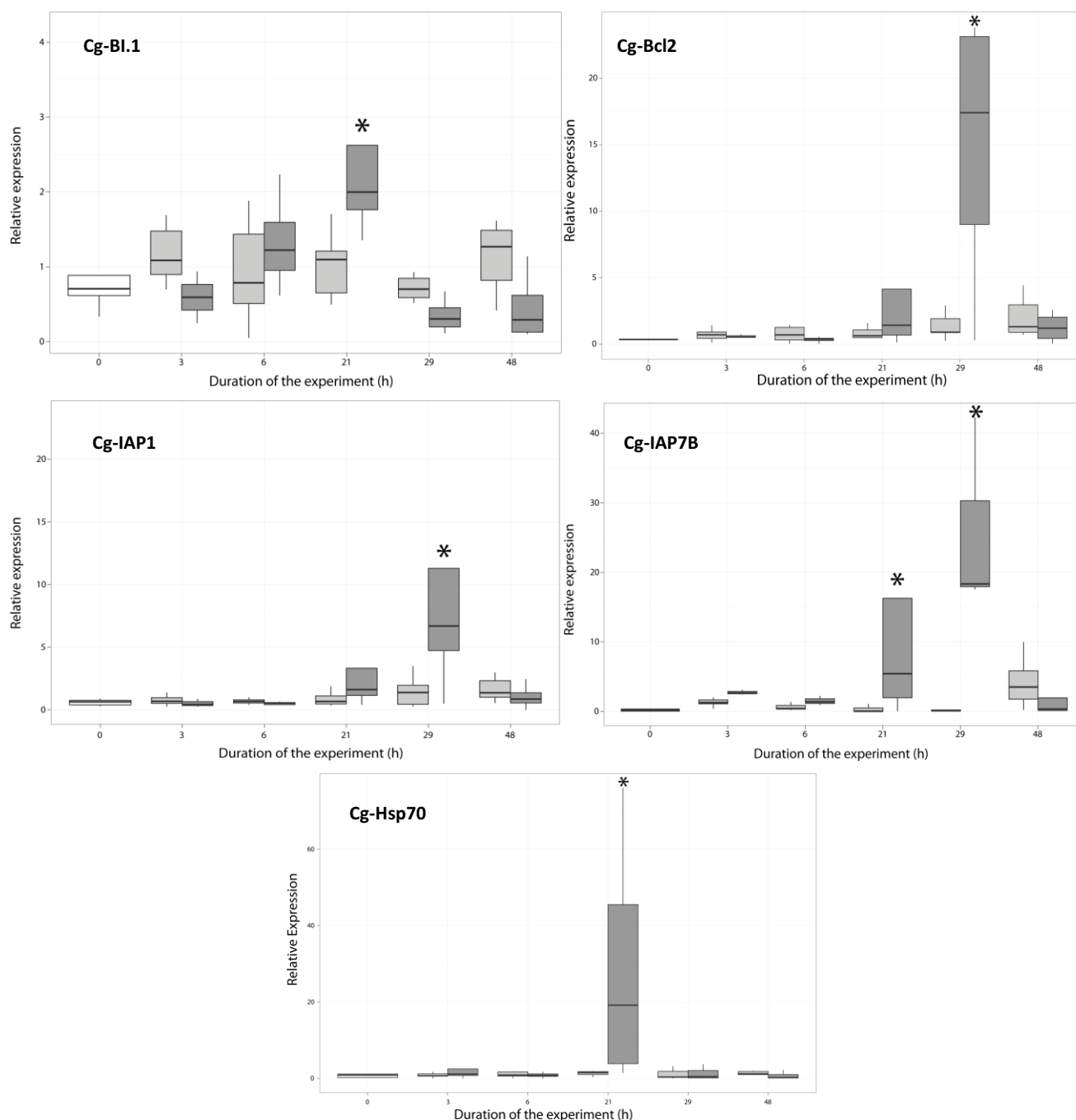
### 2.3.2. Expression of Anti-Apoptosis-Related Genes

The cg-*Bcl2* protein displays more than 30% identity with anti-apoptotic Bcl-2 family members in four-helical domains, called BH1–BH4. This transcript was significantly overexpressed at 29 h (ANOVA,  $p < 0.01$ ) in oysters exposed to *A. catenella* (Figure 4). Bcl2 members are present in the mitochondrial membrane and are able to form a heterodimer with Bax [40]. The observed time-dependent regulated expression of this anti-apoptosis-related gene suggested the involvement of regulatory mechanisms to control apoptosis.

The transmembrane Bax inhibitor (cg-BI.1) displays sequence homology with Golgi Anti-Apoptotic Protein (GAAP) or the transmembrane Bax inhibitor motif containing the 4.Cg-BI.1 transcript was significantly overexpressed at 21 h (ANOVA,  $p < 0.01$ ) in oysters fed with *A. catenella* (Figure 4). Moreover, the upregulation at 21 h of cg-BI.1 was followed by the downregulation of cg-Bax and the upregulation of cg-Bcl2 at 29 h (Figure 3). In mammalian cells, the transmembrane Bax inhibitor was demonstrated to inhibit the decrease in the mitochondrial membrane potential, by either stimulating the anti-apoptotic function of Bcl-2 or inhibiting the pro-apoptotic effect of Bax [41,42]. Another study showed that BI.1 interacts with Bcl2 to increase the acidity of the cytoplasm, promoting ATP production by mitochondria, which contributes toward maintaining a neutral Ph in the cytosol [43].

Inhibitors of caspases (IAPs) were known to contribute significantly to cell death regulation by blocking the catalytic site of the caspase executor [44]. In the genome of *C. gigas*, 48 genes coding IAPs were identified [45], when only three and seven genes found in human and in sea urchin, respectively. In this work, we analyze the expression of two of them, because their sequences are available in GenBank. The two IAP genes display 25% to 44% identity with IAP family members in two baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat (BIR) domains. IAP1 and IAP7B display 43% and 44% identity with the IAP of the giant panda, *Ailuropoda melanoleuca* (XP002922057), respectively. In this experiment, the transcript levels of cg-IAP1 and cg-IAP7B proteins increased from 21 h to reach their highest levels at 29 h ( $p < 0.01$ ) in the hemocytes of oysters exposed to *A. catenella*, whereas those genes were not modulated in the hemocytes of oysters exposed to *A. tamarensis* (Figure 4). IAPs were overexpressed after the expression of Bax (Figure 3). This result is in accordance with the work of Wei and Devreaux (1999), who demonstrated that the overexpression of the apoptotic inhibitor in human was induced by Bax or other Bcl2 apoptosis family members [6,46].

**Figure 4.** Relative expression of cg-BI.1, Cg-Bcl2, Cg-IAP1, Cg-IAP7B and cg-Hsp70 in the hemocytes of *Crassostrea gigas* not exposed (time 0, white), exposed to *Alexandrium tamarense* (grey) or to *Alexandrium catenella* (dark grey). \* (ANOVA,  $p < 0.01$ ).



Cg-Hsp70 was significantly overexpressed at 21 h (ANOVA,  $p < 0.01$ ) in oysters exposed to *A. catenella* (Figure 4), and the Cg-Hsp27 transcript was not modulated (not show). The induction of chaperones has already been demonstrated in many organisms [47–50] as a response to stress. Moreover, Hsp70 and Hsp27 have been demonstrated to be anti-apoptotic, interacting with the components of the apoptotic pathways [12–14,51]. The parasite, *Perkinsus marinus*, employs heat shock proteins as part of its adaptive survival repertoire in the oyster, *C. Virginica* [52,53]. Interestingly, in *C. gigas*, the expression of Hsp70 was demonstrated to decrease when the oyster is

exposed to cadmium [54]. Furthermore, cadmium is known to induce apoptosis in oyster hemocytes by disturbing the cellular energy balance [29]. Together with the result obtained in the present study, the upregulation of cg-Hsp70 could be associated with the ability of *C. gigas* to control apoptosis.

Nevertheless, the clear upregulation of the expression of five of six inhibitors of apoptosis-related genes tested suggests the involvement of strong regulatory mechanisms to control the apoptosis occurring in the hemocytes of the Pacific oyster.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Oysters and Microalgae

Adult Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) were collected in November, 2011, from an oyster farm in the Thau lagoon (Masson, Société A Responsabilité Limitée, Languedoc-Roussillon, France) during periods when blooms did not occur. The average total oyster fresh weight was  $13.0 \pm 2.9$  g (average  $\pm$  SD); the average digestive gland weight was  $1.8 \pm 0.5$  g, and the average shell length was  $11.0 \pm 1.0$  cm. Before the experiments, oysters were exposed to a continuous flow of filtered (10  $\mu$ m) Mediterranean seawater, maintained in partial starvation, having only bacteria and nanoplankton to feed, at a constant temperature of  $20 \pm 1$  °C for two weeks for acclimatization.

The experiments were carried out with a toxic *A. catenella* (ACT03 strain) and a non-producer of PSTs, *A. tamarensis* (ATT07 strain), isolated from the Thau lagoon in 2003 and 2007, respectively. The ENSW (enriched natural sea water) [55] culture medium used was characterized by a salinity of 35 practical salinity units (PSU). The two dinoflagellate species were cultivated in batch cultures and were grown at  $20 \pm 1$  °C, under cool-white fluorescent illumination (100  $\mu$ moles photons/m<sup>2</sup>/s) and a 12 h:12 h light:dark cycle. For the feeding experiments, we used algae in their exponential growth phase.

#### 3.2. Experimental Exposures

Two independent experimental exposures were carried out. For each experiment, after two weeks of acclimatization, 180 oysters were randomly placed into six tanks (30 individuals per tank) containing 10 L of filtered (0.2  $\mu$ m) seawater. The experiments were conducted at a constant temperature of  $20 \pm 1$  °C. Cells of *A. catenella* (two tanks) or *A. tamarensis* (two tanks) were added into tank water regularly to maintain cell concentrations ( $1 \times 10^6$  cells/L) corresponding to the *in situ* bloom in Thau lagoon [56]. In two control tanks, oysters were incubated in filtered (0.2  $\mu$ m) sea water without algae. The mean concentrations in the tank water of the experiments for toxic *A. catenella* and non-toxic *A. tamarensis* were  $(1.35 \pm 0.02) \times 10^6$  cells/L and  $(2.20 \pm 0.23) \times 10^6$  cells/L, respectively. Fresh cells were regularly added at 3, 6, 21 and 29 h to approach the initial cell concentrations. However, during the 48-h experiment, the concentrations in tank water ranged between  $1 \times 10^6$  cells/L and  $2.5 \times 10^6$  cells/L. To estimate the concentration of cells in tanks during the experiment, triplicates of 1 mL of water were collected, and cells were fixed with Formalin (2%), then counted in a Nageotte counting chamber using a photonic microscope.

### 3.3. Tissue Sampling

Hemolymph from 5 oysters randomly taken from tanks (containing 30 individuals each) was collected at time 0 (control), 3, 6, 21, 29 and 48 h for analysis. The remaining tissues were pooled and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the toxin extraction was performed.

### 3.4. Chemical Analysis of PSP Toxin by Liquid Chromatography/Fluorescence Detection (LC/FD)

One milliliter of 0.1 N acetic acid was added to the pooled tissues, and the samples were frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the extraction and analysis were performed. To release the toxins, the samples were sonicated for 5 min in a water bath three times and centrifuged at  $17,000\times g$  for 10 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The supernatants were used for the subsequent LC/FD PSP toxin analyses, using the method of Oshima [57]. The toxins were separated by reverse chromatography using a  $\text{C}_8$  column (5  $\mu\text{m}$  Develosil, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm) with a flow rate of 0.8 mL/min. The eluent pH and/or column temperature were calibrated to optimize the separation of some gonyautoxins (dc-DTX3/B1/dc-GTX-2). The toxins were quantified using certified standards provided by the National Research Council of Canada (Halifax, Canada). B2 and C2-toxins were detected and quantified indirectly after acid hydrolysis (HCl 0.4 N at  $97\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min). The toxin concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) was converted into  $\mu\text{g}$  STX equiv/Kg wet weight of tissues using the conversion factors determined by Oshima [58].

Triplicates of 10 mL batch cultures (cell concentration  $\geq 10^7$  cells/L) were taken during the exponential growth phases of the cultivated dinoflagellates. After centrifugation ( $3000\times g$ , 8 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), the cells were suspended in 1 mL of 0.1 N acetic acid and frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The extraction and toxin analyses were performed as explained above.

### 3.5. Expression Analysis of Putative Apoptotic-Related Genes

The expression levels of putative apoptotic-related genes were measured in hemocytes of *C. gigas* fed with *A. catenella* or *A. tamarensis* at 0, 3, 6, 21, 29 and 48 h after the beginning of the experiment. Hemocytes from one milliliter of hemolymph were collected and placed in 0.5 mL of Trizol buffer and conserved at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Total RNA was isolated from the oyster hemocytes using the standard Trizol method (Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France), then treated with DNase (Invitrogen) to eliminate the contamination of genomic DNA. After sodium acetate precipitation, the quantity and quality of total RNA were determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and agarose gel electrophoresis, respectively. Following heat denaturing ( $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 5 min), reverse transcription was performed using 0.1  $\mu\text{g}$  of hemocyte RNA prepared with 50 ng/ $\mu\text{L}$  oligo-(dT)<sub>12mer-18mer</sub> in a 20- $\mu\text{L}$  reaction volume containing 1 mM dNTPs, 1 unit/ $\mu\text{L}$  of RNaseOUT and 200 units/ $\mu\text{L}$  Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) in reverse transcriptase buffer, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France).

The primer pairs used to quantify the expression level of apoptotic-related genes were designed according to the sequence available in Gene-Bank. The expression of the ribosomal protein, F40, was used as the housekeeping gene control. All sequences of primers used for the amplification are shown in Table 1. Real-time PCR amplifications were performed in the Light Cycler 480 (Roche). In short,

the following components were mixed to the indicated end-concentration: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM of each primer, 2.5 μL of reaction mix (Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR<sup>®</sup> Green I Master mix) in a final volume of 5 μL. Reverse transcribed RNA (1 μL) diluted 1/10 was added as the PCR template to the Light-Cycler master mix, and the following run protocol was used: initial denaturing at 95 °C for 5 min; 95 °C for 10 s; 10 s at 58 °C; 72 °C for 10 s with a single fluorescence measurement; a melting curve program (65–97 °C) with a heating rate of 0.11 °C/s; a continuous fluorescence measurement; and a cooling step to 40 °C. Each PCR was performed in triplicate. To determine the qPCR efficiency of each primer pair used, standard curves were generated using six serial dilutions (1:1, 1:3, 1:7, 1:15, 1:31, 1:63) of a unique cDNA sample constituted from a pool of all cDNAs obtained from each condition; qPCR efficiencies of the tested genes varied between 1.85 and 1.99. Moreover, the real-time PCR product analysis on agarose gel and by melting curve revealed a unique lane and a unique peak, respectively, indicating the formation of a single PCR product with no artefacts (data not shown). For further expression level analysis, the crossing points (CP) were determined for each transcript using the Light Cycler software. The amount of apoptotic-related genes expressed was calculated relative to the amount of the ribosomal protein F40 housekeeping gene (because of its lower coefficient of variation) using the delta-delta threshold cycle ( $\Delta\Delta C_t$ ) method [59].

**Table 1.** Primers sequences for amplification, and the size of the obtained products.

Gene	Primers sequences 5'→3'	Product size (bp)	GenBank ID
Cg-FADD	AAGAGAAAGTGTCAACCGAC CTCTCAAACATCAAGACGG	134	HQ425700
Cg-Bax like	AGGATAGCACTCTATGCAGG TCAACTCCTAGCAACCATGG	198	AM855407
Cg-Bax1	TCCACTGGAATATGTTTCGAG GAAAGTTTCATGGTTTGCAC	124	HS140552
Cg-Bcl2	CAACTGTGACAAACGAGATG AGTCTACTAACTGTGGCATG	123	EU678310
Cg-BI-1	AATGGGCTTCCTGAGGAAGG GCAACCAACAGCATCCAGTG	134	HS115415
Cg-IAP1	TCGAGCAGCAATTTAACGC GAGGAAGGAGCTTTACCAC	160	HQ425702
Cg-IAP7B	CATTATGGAAGCAGATAGATC ATGATGTCATCTTCCTTTGTC	249	FP000296
Cg-caspase-2	ACAGGGGAAATACTGAAGGAC AGCTACAGCTGTCAGAAAACC	162	HQ425706
Cg-caspase-3	ATCACCAGGAAGGATCATGG GTTTCATCCGAACACGACTCG	139	CU988427
Cg-caspase-7	ATTGGACCACAGAGACAACG TGTTGCCTTTGAAGGGCTCC	125	HQ425703
Cg-Hsp27	GGCAAAGACCCATTTGGTAA ACAGTCAAGTTCCGGTCCAC	206	AM862573
Cg-Hsp70	TCATCAAGTGGATGGACCAG CATTCCTCCAGGCATGCCA	149	AF144646
Ribosomal protein F40 (RPL40)	AATCTTGCACCGTCATGCAG AATCAATCTCTGCTGATCTGG	149	FP004478



### 3.6. Determination of Hemocyte Apoptosis Levels

Samples of hemolymph were collected in Modified Alsever Solution (MAS), pH 4 (v/v), then diluted in Alsever, pH 4, +8% Paraformaldehyde (v/v), and the samples were conserved at 4 °C until the analysis were performed. Single or double-stranded DNA breaks that occur at the early stages of apoptosis were detected by the red fluorescent label of DNA fragmentation (*In Situ* Cell Death Detection Kit, TetraMethylRhodamine (TMR) red, Roche®), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, hemocytes were permeabilized for 8 min. TMR red was added; then cells were incubated in the dark for 60 min at 37 °C. After three washes in phosphate buffer saline (PBS), 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) as added to the fixed hemocytes in the dark for 10 min. Upon staining, the fluorescent products generated by the two dyes can be visualized using a wide-field fluorescence microscope equipped with standard red (540 nm–580 nm, TMRred) and blue (358 nm–461 nm, DAPI) filter sets. The percentage of apoptotic cells was determined by counting one thousand cells from 2 × 5 individual slides by condition.

### 3.7. Statistics

Data were analyzed using two-way ANOVA followed by the Wilcoxon test (R software). Values are the median ± SD of 10 individuals from two independent experiments. \*  $p < 0.01$ .

## 4. Conclusions

Apoptosis is highly conserved among species. In *C. gigas*, key genes involved in this process appear to be similar to those of the vertebrate model. Although Sokolova and Kiss highlighted the importance of the apoptotic process in the molluscan immune defense system [1,24], few studies have assessed the effects of harmful algae and their toxins upon the immune system of bivalves, especially on the modulation and/or regulation of the different apoptotic pathways [50]. In this study we show, for the first time, that the toxic dinoflagellate, *A. catenella*, was able to induce the apoptosis of *C. gigas* hemocytes at a toxin concentration level similar to that generally observed *in situ* during a toxic event. Since 1970, periodic and large episodes of the mortality of *C. gigas* occurred along the French coast at a level never observed before. Although several pathogens (*Vibrio splendidus*, *Vibrio aestuarianus* and Oyster Herpesvirus type 1) were demonstrated to be associated with those mortalities in the environment [58,60,61], no mortality was induced when oysters were exposed to the pathogens in our experimental conditions. It is likely that this phenomenon has a multifactorial origin. The results of this work suggest that the induction of apoptosis by PSP-producing algae may affect the efficiency of the oyster to resist microbial infection in the environment. We should further investigate this particular point.

## Acknowledgments

We thank Marc Leroy for technical assistance and the Montpellier RIO imaging platform of University of Montpellier 2 for the fluorescence microscopy access. This work was supported by the “Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer” (IFREMER), by the unité mixte de

recherche 5119, Ecologie des Systèmes Marins Côtiers” and funded by the French National program Ecosphère Continentale et Côtière (EC2CO).

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Sokolova, I.M. Apoptosis in molluscan immune defense. *ISJ-Invertebr. Surv. J.* **2009**, *6*, 49–58.
2. Sunila, I.; LaBanca, J. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Org.* **2003**, *56*, 163–170.
3. Zhang, L.; Li, L.; Zhang, G. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev. Comp. Immunol.* **2011**, *35*, 603–610.
4. Armstrong, J.S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* **2006**, *6*, 225–234.
5. Wolf, B.B.; Green, D.R. Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20049–20052.
6. Deveraux, Q.L.; Reed, J.C. IAP family proteins: Suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 239–252.
7. Cory, S.; Huang, D.C.; Adams, J.M. The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **2003**, *22*, 8590–8607.
8. Robertson, D.M.; Ladage, P.M.; Yamamoto, N.; Jester, J.V.; Petroll, W.M.; Cavanagh, H.D. Bcl-2 and Bax regulation of corneal homeostasis in genetically altered mice. *Eye Contact Lens* **2006**, *32*, 3–7.
9. Orme, M.; Meier, P. Inhibitor of apoptosis proteins in Drosophila: Gatekeepers of death. *Apoptosis* **2009**, *14*, 950–960.
10. Tatsushi, I.; Masayuki, M. Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1644*, 73–81.
11. Green, D.R.; Bissonnette, R.P.; Cotter, T.G. Apoptosis and cancer. *Important Adv. Oncol.* **1994**, *11*, 37–52.
12. Mosser, D.D.; Caron, A.W.; Bourget, L.; DenisLarose, C.; Massie, B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 5317–5327.
13. Garrido, C.; Bruey, J.M.; Fromentin, A.; Hammann, A.; Arrigo, A.P.; Solary, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J.* **1999**, *13*, 2061–2070.
14. Pandey, P.; Farber, R.; Nakazawa, A.; Kumar, S.; Bharti, A.; Nalin, C.; Weichselbaum, R.; Kufe, D.; Kharbanda, S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* **2000**, *19*, 1975–1981.
15. Clark, R.F.; Williams, S.R.; Nordt, S.P.; Manoguerra, A.S. A review of selected seafood poisonings. *Undersea Hyperb. Med.* **1999**, *26*, 175–184.
16. Landsberg, J.H. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* **2002**, *10*, 113–390.

17. Li, A.M.Y.; Yu, P.K.N.; Hsieh, D.P.H.; Wang, W.X.; Wu, R.S.S.; Lam, P.K.S. Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green lipped mussel, *Perna viridis*: A dynamic model. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 129–135.
18. Shumway, S.E. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *J. World Aquacul. Soc.* **1990**, *21*, 65–104.
19. Bardouil, M.; Bohec, M.; Cormerais, M.; Bougrier, S.; Lassus, P. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* **1993**, *12*, 417–422.
20. Wildish, D.; Lassus, P.; Martin, J.; Saulnier, A.; Bardouil, M. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **1998**, *11*, 35–43.
21. Lassus, P.; Baron, R.; Garen, P.; Truquet, P.; Masselin, P.; Bardouil, M.; Leguay, D.; Amzil, Z. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **2004**, *17*, 207–214.
22. Rolland, J.L.; Pelletier, K.; Masseret, E.; Rieuvilleneuve, F.; Savar, V.; Santini, A.; Amzil, Z.; Laabir, M. Paralytic toxins accumulation and tissue Expression of  $\alpha$ -amylase and lipase genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* fed with the neurotoxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2519–2534.
23. Song, L.; Wang, L.; Qiu, L.; Zhang, H. Bivalve Immunity. In *Invertebrate Immunity*; Soderhall, K., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2010; Volume 708, p. 316.
24. Kiss, T. Apoptosis and its functional significance in mollusks. *Apoptosis* **2010**, *15*, 313–321.
25. Matozzo, V.; Rova, G.; Marin, M.G. Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* **2007**, *23*, 732–746.
26. Ifremer Environnement Littoral. Available online: <http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/toxines10ans/> (accessed on 18 November 2013).
27. Kiss, T.; Osipenko, O.N. Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol. Rev.* **1994**, *46*, 245–267.
28. Molnar, G.; Salanki, J.; Kiss, T. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Res.* **2004**, *1008*, 205–211.
29. Sokolova, I.M.; Evans, S.; Hughes, F.M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 3369–3380.
30. Guo, B.; Yin, M.B.; Tóth, K.; Cao, S.; Azrak, R.G.L.; Rustum, Y.M. Dimerization of mitochondrial Bax is associated with increased drug response in Bax-transfected A253 cells. *Oncol. Res.* **1999**, *11*, 91–99.
31. Jurgensmeier, J.M.; Xie, Z.; Deveraux, Q.; Ellerby, L.; Bredesen, D.; Reed, J.C. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4997–5002.
32. Rautureau, G.J.P.; Day, C.L.; Hinds, M.G. Intrinsically disordered proteins in Bcl-2 regulated apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 1808–1824.

33. Hsu, Y.T.; Wolter, K.G.; Youle, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3668–3672.
34. Antonsson, B.; Montessuit, S.; Sanchez, B.; Martinou, J.-C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11615–11623.
35. Enari, M.; Talanian, R.V.; Wong, W.W.; Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* **1996**, *380*, 723–726.
36. Slee, E.A.; Harte, M.T.; Kluck, R.M.; Wolf, B.B.; Casiano, C.A.; Newmeyer, D.D.; Wang, H.G.; Reed, J.C.; Nicholson, D.W.; Alnemri, E.S.; *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.* **1999**, *144*, 281–292.
37. Salvesen, G.S.; Abrams, J.M. Caspase activation—stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* **2004**, *23*, 2774–2784.
38. Tran, S.E.; Meinander, A.; Eriksson, J.E. Instant decisions: Transcription-independent control of death-receptor-mediated apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 601–608.
39. Guo, Y.; Srinivasula, S.M.; Druilhe, A.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E.S. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13430–13437.
40. Hanada, M.; Aimé-Sempé, C.; Sato, T.; Reed, J.C. Structure-function analysis of Bcl-2 protein identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 11962–11969.
41. Xu, Q.; Reed, J.C. Bax Inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* **1988**, *1*, 337–346.
42. Hetz, C.; Vitte, P.A.; Bombrun, A.; Bombrun, A.; Rostovtseva, T.K.; Montessuit, S.; Hiver, A.; Schwarz, M.K.; Church, D.J.; Korsmeyer, S.J.; *et al.* Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42960–42970.
43. Ahn, T.; Yun, C.H.; Kim, H.R.; Chae, H.J. Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter activity of human Bax inhibitor-1. *Cell Calcium* **2010**, *47*, 387–396.
44. Dubrez-Daloz, L.; Dupoux, A.; Cartier, J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1036–1046.
45. Zhang, G.; Fang, X.; Guo, X.; Li, L.; Luo, R.; Xu, F.; Wang, J. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **2012**, *490*, 49–54.
46. Wei, Y.; Fan, T.; Yu, M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2008**, *40*, 278–288.
47. Feder, M.E.; Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **1999**, *61*, 243–282.
48. Fabbri, E.; Valbonesi, P.; Franzellitti, S. HSP expression in bivalves. *ISJ-Invertebr. Surviv. J.* **2008**, *5*, 135–161.
49. Boutet, I.; Tanguy, A.; Moraga, D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* **2004**, *329*, 147–157.

50. Mello, D.F.; de Oliveira, E.S.; Vieira, R.C.; Simoes, E.; Trevisan, R.; Dafre, A.L.; Barracco, M.A. Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed *in vitro* to brevetoxin (PbTx-2). *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 583–597.
51. Arya, R.; Mallik, M.; Lakhota, S.C. Heat shock genes—integrating cell survival and death. *J. Biosci.* **2007**, *32*, 595–610.
52. Tirard, C.T.; Grossfeld, R.M.; Volety, A.K.; Chu, F.L.E. Heat-shock proteins of the oyster parasite perkinsus-marinus. *Dis. Aquat. Org.* **1995**, *22*, 147–151.
53. Encomio, V.G.; Chu, F.L.E. Seasonal variation of heat shock protein 70 in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) infected with *Perkinsus marinus* (Dermo). *J. Shellfish Res.* **2005**, *24*, 167–175.
54. Boutet, I.; Tanguy, A.; Rousseau, S.; Auffret, M.; Moraga, D. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* **2003**, *8*, 76–85.
55. Harrison, P.J.; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **1980**, *16*, 28–35.
56. Laabir, M.; Jauzein, C.; Genovesi, B.; Masseret, E.; Grzebyk, D.; Cecchi, P.; Vaquer, A.; Perrin, Y.; Colos, Y. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1550–1563.
57. Oshima, Y. Chemical and Enzymatic Transformation of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Organisms. In *Harmful Marine Algal Blooms*; Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C., Eds.; Lavoisier/Intercept: Paris, France, 1995; pp. 475–480.
58. Lacoste, A.; Jalabert, F.; Malham, S.; Cueff, A.; Gelebart, F.; Cordevant, C.; Lange, M.; Poulet, S.A. A vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.* **2001**, *46*, 139–145.
59. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−Delta Delta C(T)) method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.
60. Degremont, L. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* **2011**, *317*, 94–98.
61. Garnier, M.; Labreuche, Y.; Garcia, C.; Robert, A.; Nicolas, J.L. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb. Ecol.* **2007**, *53*, 187–196.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**Survie intracellulaire, effets cytopathiques et virulence de *Vibrio tasmaniensis* LGP32,  
pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*.**

**Résumé :**

Des souches de *Vibrio* appartenant au clade Splendidus sont retrouvées de manière récurrente lors des mortalités estivales d'huîtres juvéniles. La souche *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître, dont elle altère les fonctions de défense. Nous montrons ici que LGP32 se comporte comme un pathogène intravacuolaire qui survit au sein de larges vacuoles intrahémocytaires. Il induit des effets cytopathiques tels qu'une perméabilisation membranaire et un lessivage du contenu cytosolique des hémocytes. Cette cytotoxicité est dépendante de l'invasion hémocytaire. Par ailleurs, à l'intérieur du phagosome, LGP32 sécrète des vésicules de membrane externe (OMVs). Chez LGP32, ces OMVs jouent un rôle protecteur contre les défenses de l'hôte et servent de véhicules pour la délivrance de facteurs de virulence aux cellules de l'hôte. En effet, elles sont capables de titrer les peptides antimicrobiens et présentent un fort contenu en hydrolases (25% du protéome des OMVs). Une sérine protéase, nommée Vsp car elle est uniquement sécrétée par voie vésiculaire participe à la virulence de LGP32 en infections expérimentales mais ne dégraderait pas les peptides antimicrobiens. Par une approche transcriptomique, nous avons identifié une série de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante et l'efflux de cuivre, qui sont surexprimés dans les stades intracellulaires précoces de LGP32. La génomique fonctionnelle a montré que ces deux fonctions importantes sont requises pour la survie intracellulaire, la cytotoxicité et la virulence de LGP32. Leur grande conservation parmi les vibrios laisse supposer qu'elles puissent contribuer à la survie intracellulaire d'autres espèces de *Vibrio*.

**Mots clés :** Interaction hôte-pathogène, *Vibrio*, processus infectieux, mécanismes d'échappement, immunité innée.

**Intracellular survival, cytopathic effects and virulence of *Vibrio tasmaniensis* LGP32,  
a pathogen of *Crassostrea gigas* oyster.**

**Abstract:**

*Vibrio* strains belonging to the Splendidus Clade have been repeatedly found in juvenile diseased oysters affected by summer mortalities. *V. tasmaniensis* LGP32 is an intracellular pathogen of oyster hemocytes which has been reported to alter the oxidative burst and inhibit phagosome maturation. We show here that LGP32 behaves as an intravacuolar pathogen that survives within large cytoplasmic vacuoles. LGP32 induces cytotoxic effects such as membrane disruptions and cytoplasmic disorders. Cytotoxicity was shown to be entirely dependent on LGP32 entry into hemocytes. Moreover, LGP32 releases outer membrane vesicles (OMVs) inside the phagosome. LGP32 OMVs were found to be protective against host defenses and to serve as vehicles for the delivery of LGP32 virulence factors to oyster immune cells. Indeed, OMVs conferred a high resistance to antimicrobial peptides. They also displayed a high content in hydrolases (25 % of total proteome) among which a serine protease, named Vsp for vesicular serine protease, was found to be specifically secreted through OMVs. Vsp was shown to participate in the virulence phenotype of LGP32 in oyster experimental infections but did not degrade AMPs entrapped in OMVs. By developing a transcriptomic approach, we identified a series of *Vibrio* antioxidant and copper efflux genes whose expression is strongly induced within oyster hemocytes. Construction of isogenic deletion mutants showed that resistance to reactive oxygen species and copper efflux are two important functions required for LGP32 intracellular survival, cytotoxic effects and virulence. Their high conservation among vibrios suggests they could contribute to intracellular survival of other *Vibrio* species.

**Keywords :** Host-pathogen interaction, *Vibrio*, infectious process, escape, innate immunity.

**DISCIPLINE**

Microbiologie

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

Equipe Réponse Immunitaire des Macroorganismes et Environnement (RIME), ECOSYM, UMR5119 CNRS-Ifremer-UM2-UM1, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France