



**HAL**  
open science

# Émergence, dynamique évolutive et écologie de lignées pathogènes de bivalves marins au sein de l'espèce bactérienne *Vibrio aestuarianus*

Aurélie Mesnil

► **To cite this version:**

Aurélie Mesnil. Émergence, dynamique évolutive et écologie de lignées pathogènes de bivalves marins au sein de l'espèce bactérienne *Vibrio aestuarianus*. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2022. Français. NNT : 2022LAROS050 . tel-04267633

**HAL Id: tel-04267633**

**<https://theses.hal.science/tel-04267633v1>**

Submitted on 2 Nov 2023

**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.



# LA ROCHELLE UNIVERSITE

ÉCOLE DOCTORALE

-  
Euclide

Unité Adaptation et Santé des Invertébrés Marins (PDG-RBE-ASIM), IFREMER La Tremblade  
UMR Interaction Hôte Pathogène Environnement (IHPE), Montpellier

THÈSE

présentée par :

Aurélie Mesnil

soutenue le 11 octobre 2022

pour l'obtention du grade de Docteur de La Rochelle Université

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

**Émergence, dynamique évolutive et écologie de lignées pathogènes de bivalves marins au sein de l'espèce bactérienne *Vibrio aestuarianus***

---

JURY :

Marianne GRABER  
Sophie GAUDRIAULT  
Christine PAILLARD

Xavier BAILLY

Yann REYNAUD  
Maude JACQUOT

Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN

Marie-Agnès TRAVERS

Professeur, Université de la Rochelle, Président de jury  
Directrice de recherche, INRAe, Montpellier, Rapporteur  
Directrice de recherche, CNRS, Université de Bretagne  
Occidentale, Rapporteur

Directeur de recherche, INRAe, Clermont-Ferrand,  
Examineur

Cadre de recherche, IFREMER, Nantes, Examineur  
Cadre de recherche, IFREMER, La Tremblade, Encadrante  
scientifique

Directrice de recherche, CNRS, Montpellier, Co-directrice  
de thèse

Cadre de recherche, IFREMER, Montpellier, Directrice de  
thèse



## Remerciements

Cette thèse a été une formidable aventure avec son lot de difficultés, mais aussi de moments de joies, et surtout de belles rencontres. Je n'aurais pas pu aller au bout de cette aventure sans l'aide de très nombreuses personnes que je tiens à remercier chaleureusement.

Je remercie tout d'abord Marianne Graber pour avoir accepté de présider ce jury de thèse ainsi que les professeurs Sophie Gaudriault et Christine Paillard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également les professeurs Xavier Bailly et Yann Reynaud pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.

Merci aux différents responsables des laboratoires qui m'ont accueillie : Christian Béchemin, Isabelle Arzul, Yannick Gueguen et Caroline Montagnani. Merci également à Bénédicte Charrier, cheffe de la station IFREMER à la Tremblade.

Merci également aux membres de mes comités de suivi : Yannick Labreuche, Philippe Gouletquer, Yannick Gueguen, Jean-Claude Ogier et Mathieu Sicard, qui ont prodigué leurs conseils tout au long de ma thèse.

Merci à la région Aquitaine et à l'IFREMER pour le financement de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directrices et encadrante de thèse. Merci à toi, Agnès. Merci de m'avoir donné cette chance, malgré mon profil légèrement atypique (même si je sais que ça n'a jamais été un problème pour toi). Depuis toute petite je voyais la recherche scientifique comme un rêve inaccessible. Tu m'as permis d'y croire. Grâce à toi, j'ai passé quatre années à faire un travail que j'ai adoré, certes exigeant, mais tellement intéressant et stimulant. Tu as été la meilleure directrice de thèse que je pouvais espérer, me donnant la liberté dont j'avais besoin, me guidant lorsqu'il le fallait, trouvant toujours les mots lorsque j'étais en perte de confiance. Merci d'avoir toujours tout fait pour que ma thèse puisse se dérouler dans les meilleures conditions.

Merci à toi Delphine (Destoumieux-Garzón) de m'avoir accueilli avec tant de gentillesse à l'IHPE, et en plus d'avoir accepté d'encadrer ma thèse. Merci pour tes conseils et pour ta bienveillance. Merci aussi pour ta confiance. Merci d'avoir consacré du temps à ma thèse malgré toutes les responsabilités dont tu as la charge.

Un énorme merci à Maude, d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Sans toi, elle aurait été très différente. Merci pour tous tes conseils, pour toutes les connaissances que tu m'as apporté en phylogénie, en génétique des populations, en épidémiologie moléculaire. Tout ce que j'ai appris, grâce à toi, a attisé ma curiosité et m'a donné envie d'en savoir toujours plus. Ton travail a été une grande source d'inspiration et ton arrivée à l'Ifremer, une énorme chance pour moi.

Merci également à Christophe Lambert qui a co-encadré ma première année de thèse. Merci pour ton accueil au LEMAR et pour tes enseignements notamment en biologie cellulaire.

Je veux remercier également les nombreuses personnes qui ont contribué à ce travail. Un énorme merci à Delphine (Tourbiez) et Céline. Merci pour votre aide pour les expérimentations et la

rédaction des articles. Delphine, ça a été un bonheur de te côtoyer pendant ma première année de thèse. Merci encore pour ton soutien, ta bonne humeur et tes petites blagues. Et merci d'avoir continué à m'aider malgré la distance, notamment pour les nombreuses livraisons express dont j'ai eu besoin. Merci également à Lionel Dégremont, pour la production des animaux, sans lesquels rien n'aurait été possible. Et merci à Frédéric Girardin et la PMMLT pour la mise à disposition des installations expérimentales. Je tiens également à remercier Marion Richard et Franck Lagarde. Notre collaboration dans le projet MIRAGE a été très enrichissante pour moi.

Merci aux nombreuses personnes grâce à qui nous avons pu réaliser ces études, sur le terrain, et grâce à qui nous avons pu collecter toutes les souches de *V. aestuarianus* : le réseau REPAMO et le réseau des laboratoires européens (EURL), ainsi que le groupement d'étude des milieux estuariens et littoraux (GEMEL) et le CRPMEM (Comité régional des pêches maritimes et des élevages marins), Simon Julien et Philippe Vaudo de huitres-bouzigues.com.

Un très grand merci à Alexandre Cormier et Cyril Noel, du SEBIMER, toujours disponibles pour répondre à mes nombreuses questions en bioinformatique.

Merci à Annick Jacq et Luo Xing pour leur accueil à l'I2BC. Leurs enseignements et leur aide pour tenter de réaliser des banques de transcriptome bactériens ont été très précieux.

Merci aux membres de l'IHPE. En particulier, merci à Arnaud pour toutes les connaissances que tu m'as apportées sur les génomes de Vibrios et pour avoir consacré du temps à ma thèse. Merci également à Guillaume pour t'être impliqué dans plusieurs aspects de ma thèse avec curiosité. Merci pour toutes tes idées de tests et pour les échanges scientifiques toujours très intéressants. Un énorme merci à Viviane et Jean-Michel qui ont toujours répondu présent lorsque j'avais besoin d'aide. Merci à Marco pour ton aide inestimable et pour ta bonne humeur et tes histoires. Un grand merci à Yann. Merci pour tes partages d'astuces et de bonnes pratiques en bioinformatique, que je compte bien utiliser dorénavant. Je te souhaite bonne chance pour la suite. Juliette, Océane et Gaëlle, vous êtes indispensables à tous nos travaux et je tiens à vous dire à quel point je vous suis reconnaissante pour toute votre aide. Ça a été un plaisir de travailler avec vous pendant ces années. Merci également à Eric Smagghue, Diane Merceron et Anne Modat, pour leur aide au quotidien.

Je veux également remercier Julien de Lorgeril, Jérémy Vidal-Dupiol, Christian Chaparro et Guillaume Mitta, grâce à qui j'ai beaucoup appris sur l'analyse de données transcriptomiques. Un grand merci également à Eve Toulza, Jean-François Alienne, Margot Doberva pour leur aide lors de la réalisation des banques de séquençage.

Merci aux membres de l'ASIM, en particulier, merci à Isabelle, Germain, Mathilde, Nicole, Lydie. Merci pour votre aide, pour votre écoute et pour vos conseils.

Merci à mes deux stagiaires, Gabriel Bonnefoy et Audrey Bidois. Merci pour votre aide, votre enthousiasme et votre rigueur, qui ont permis de faire avancer mon travail de thèse.

Un énorme merci à Erika et Gaëlle qui ont rendu ma thèse encore plus belle. J'ai adoré tous les moments que nous avons passé ensemble, au labo et en dehors. Vous êtes tout simplement extraordinaires !

Merci aux doctorants que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ces années de thèse, à La Tremblade et à Montpellier. Coralie, Clément et Nicolas, je me souviendrais toujours avec beaucoup de bonheur et un peu de nostalgie de cette période où j'ai eu la chance de partager un bureau avec vous, mais aussi des super soirées que nous avons passées ensemble. Camille, j'ai passé un super moment avec toi au colloque des doctorants, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Et à Montpellier, merci à Jean, avec qui j'ai adoré parler bioinfo, merci à Daniel pour ta gentillesse et ton aide, merci à Maurine pour ta bonne humeur et ton soutien. Merci à Janan pour ton accueil à l'IHPE. Merci aussi pour ta curiosité et ton écoute. Louis, Noémie, Laura et Sébastien, ça a été super de partager ces moments avec vous. Je vous souhaite bon courage et bonne chance.

Pour terminer, je veux remercier mes amis, Aurélie, Aurélie (encore une !), Alex. Et merci à ma famille. Merci pour votre enthousiasme et votre soutien, quels que soient mes choix.



## Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des figures et des tableaux	9
Liste des abréviations	13
Introduction	15
1. Les maladies infectieuses émergentes	15
1.1. Les agents responsables de maladies infectieuses	15
1.2. Les maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes	16
1.3. L'impact grandissant des maladies infectieuses émergentes	18
2. Émergence et évolution des lignées pathogènes bactériennes	22
2.1. Mutations, transferts horizontaux et recombinaisons	24
2.2. Impact de la sélection naturelle et de la dérive génétique	29
2.3. Application aux lignées pathogènes bactériennes	31
3. Vibrios et émergences en aquaculture	36
3.1. Le genre bactérien <i>Vibrio</i>	36
3.2. Facteurs environnementaux favorisant l'émergence d'agents pathogènes en aquaculture	38
3.3. Exemples d'émergences de vibrios pathogènes en aquaculture	49
4. L'espèce bactérienne <i>Vibrio aestuarianus</i> , pathogène de bivalve	53
4.1. Diversité au sein de l'espèces <i>V. aestuarianus</i>	55
4.2. Préférences écologiques de <i>V. aestuarianus</i>	56
4.3. Interactions entre <i>V. aestuarianus</i> et les huîtres	58
Problématiques et plan de thèse	61
Chapitre 1 : Les différentes lignées pathogènes se répartissent dans des sous-espèces avec un tropisme d'hôte spécifique	65
Article 1 : <i>Vibrio aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> , pathogenic to the edible cockles <i>Cerastoderma edule</i> in France, and establishment of <i>Vibrio aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> and <i>Vibrio aestuarianus</i> subsp. <i>Francensis</i>	67
Résumé de l'article 1	67
Données supplémentaires à l'article 1 : Spectre d'hôte des sous-espèces <i>V. aestuarianus cardii</i> et <i>V. aestuarianus francensis</i>	79

Chapitre 2 : Émergence et expansion clonale de lignées pathogènes d'huîtres chez <i>V. aestuarianus</i> à l'échelle européenne	95
Article 2: Emergence and clonal expansion in Europe of <i>Vibrio aestuarianus</i> lineages pathogenic for oysters	97
Résumé de l'article 2	97
Données supplémentaires à l'article 2 : Écologie de <i>V. aestuarianus francensis</i>	125
Chapitre 3 : Dynamique de <i>Vibrio aestuarianus</i> chez les coques <i>Cerastoderma edule</i> dans des gisements exploités des Hauts de France	135
Article 3: Ecology and population genetic of <i>Vibrio aestuarianus cardii</i> in cockle beds in Hauts-de-France	137
Résumé de l'article 3	137
Chapitre 4 : Interactions cellulaires entre <i>V. aestuarianus</i> et les hémocytes d'huîtres creuse <i>C. gigas</i>	161
Introduction	163
Matériel et méthodes	164
Résultats et discussion	169
Conclusions	175
Discussion générale	177
Structuration génomique en fonction de l'espèce-hôte chez <i>V. aestuarianus</i>	178
<i>V. aestuarianus francensis</i> , une bactérie pathogène spécialisée envers les huîtres	180
Diversité d'habitats de <i>V. aestuarianus cardii</i>	183
Dynamique des séquences d'insertion chez <i>V. aestuarianus</i>	184
Rôles des facteurs anthropiques dans l'émergence et la propagation de lignées pathogènes chez <i>V. aestuarianus</i>	185
Les souches non-cliniques, réservoir de lignées pathogènes ?	188
Lutter contre l'émergence et la propagation de maladies infectieuses en aquaculture : un défi dans les conditions d'ostréiculture actuelles	190
Références bibliographiques	193
Annexes	219
Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article 1	221
Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article 2	225
Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 3	235

## Liste des figures et des tableaux

### Figures

Figure 1 : Causes de décès, en pourcentage, par région OMS, groupe de revenu de la Banque mondiale et monde, en 2000 et 2019 (World Health Organization, 2022). .....	18
Figure 2 : Changement moyen de la richesse en espèces d'agents pathogènes sous le scénario de forçage radiatif RCP 6.0 sur tous les mois.....	21
Figure 3 : La mutation et la recombinaison entraînent une variation de la séquence d'ADN.....	25
Figure 4 : La structure de la population bactérienne « épidémique ».....	34
Figure 5 : Représentation schématique de l'émergence et de l'évolution du <i>V. cholerae</i> pandémique.....	37
Figure 6 : Comparaison de la médiane locale 2003-2007 à la médiane nationale des concentrations en cuivre dans la chair des moules et des huîtres.....	40
Figure 7 : Impacts du changement climatique sur les relations hôte-pathogène-environnement marin. ...	42
Figure 8 : Cycle de vie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> (Fabioux, 2004).....	46
Figure 9 : A gauche, collecteurs en plastique utilisés pour le captage des larves d'huîtres. A droite, sur l'estran, poches d'huîtres alignées sur des tables recouvertes à marée haute.....	46
Figure 10 : Aire de répartition de la coque <i>C. edule</i> . .....	48
Figure 11 : Analyse phylogénétique de 16 souches de <i>V. nigripulchritudo</i> (ATCC 27043T comme groupe externe). .....	50
Figure 12 : Diversité plasmidique parmi les différents pathotypes de <i>V. nigripulchritudo</i> (Goudenège et al., 2013). .....	50
Figure 13 : Les étapes de la pathogenèse du syndrome de mortalité estivale des huîtres du Pacifique (POMS), une maladie polymicrobienne induite par une primo-infection par OsHV-1, qui altère la physiologie des hémocytes.....	51
Figure 14 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes isolées dans l'hémolymphe des huîtres .....	53
Figure 15 : Pourcentage de mortalité chez des huîtres infectées par OsHV-1 (en bleu) et par <i>V. aestuarianus</i> (en rouge) dans des conditions de laboratoire, à plusieurs stades de vie.....	54
Figure 16 : Analyse phylogénétique basée sur l'alignement concaténé des séquences nucléotidiques de 2866 gènes communs à 14 souches de <i>V. aestuarianus</i> . .....	56
Figure 17 : Quantification de <i>V. aestuarianus</i> et de l'ADN <i>Vibrio</i> total par qPCR (axe y) dans les sédiments (gris), fractions d'eau de mer (rouge, zooplancton ; jaune, gros phytoplancton et particules organiques ; vert, particules organiques plus petites ; bleu, cellules bactériennes libres) et l'hémolymphe de l'huître (violet, moyenne sur 30 individus).....	57
Figure 18 : Mortalités moyennes d'huîtres juvéniles infectées par (A) injection intramusculaire de <i>V. aestuarianus</i> et (B) cohabitation avec des huîtres infectées par <i>V. aestuarianus</i> .....	79
Figure 19 : Evolution du nombre d'individus morts observé dans des lots d'huîtres creuses, d'huîtres plates, de coques, de moules et de palourdes, placées en cohabitation avec des huîtres infectées. ....	86
Figure 20 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires d'huîtres creuses receveuses, mise en contact avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041. ....	87

Figure 21 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires d'huîtres plates receveuses, mise en contact avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041. ....	88
Figure 22 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires de coques receveuses, mise en contact avec des coques infectées par la souche 12/122 3T3.....	89
Figure 23 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires de huîtres creuses receveuses, mise en contact avec des coques infectées par la souche 12/122 3T3. ....	90
Figure 24 : Relations phylogénétiques entre des souches <i>V. aestuarianus</i> et mortalités d'huîtres creuses et de coques injectées avec ces souches.....	91
Figure 25 : Synthèse des résultats obtenus et taxonomie des bivalves testés. ....	92
Figure 26 : Localisation des zones de suivi dans le Bassin de Thau (Source : Geoportail.fr). ....	127
Figure 27 : A : Moyennes ( $\pm$ Ecart type) du taux mensuel de mortalité observés dans le cadre du projet MIRAGE en 2021 et des projets MIRAGE et MICROLAG en 2021, dans le bassin de Thau. B : Boxplot représentant la distribution des taux cumulés de mortalité.....	131
Figure 28 : Evolution mensuelle de A) la température de l'air ( $^{\circ}$ C), B) du cumul de pluie, C) de la température de l'eau et C) de la salinité de l'eau observés au niveau de Sète (A, B) et au niveau du site REPHY Bouzigues a (C, D) en 2020 et 2021. ....	132
Figure 29 : A) Relation linéaire significative observée entre les taux cumulés mensuels moyens de mortalités et les moyennes de salinité mensuelles, B) taux cumulés mensuels moyens de mortalité représentés en fonction des températures moyennes mensuelles de l'eau.....	132
Figure 30 : Charges bactériennes mesurées par qPCR dans l'hémolymphe d'huîtres injectées avec <i>V. aestuarianus</i> .....	169
Figure 31 : Charges bactériennes mesurées par qPCR dans l'hémolymphe d'huîtres immergées dans de l'eau de mer contaminée avec <i>V. aestuarianus</i> . ....	170
Figure 32 : Pourcentages de gènes (A) sous-exprimés chez le mutant 12/016 $\Delta$ varS par rapport à la souche WT et (B) de gènes sur-exprimés chez le mutant, dans les différentes catégories fonctionnelles. ....	172
Figure 33 : Cycle proposé pour la sous-espèce <i>V. aestuarianus francensis</i> .....	180
Figure 34 : Evolution de la teneur en cuivre moyenne dans plusieurs sites du bassin d'Arcachon entre 1979 et 1994. ....	186
Figure 35 : Arbre phylogénétique de l'espèce <i>V. aestuarianus</i> calculé à partir de l'alignement des régions génomiques n'ayant pas été impacté dans des événements de recombinaison. ....	189

## Tableaux

Tableau 1 : Souches de <i>V. aestuarianus</i> utilisées pour les tests par injection.....	81
Tableau 2 : Protocoles d'amplification .....	84
Tableau 3 : Nombre d'échantillons positifs / nombre d'échantillons total prélevés dans plusieurs compartiments de l'environnement. ....	133
Tableau 4 : Nombre de reads et pourcentage des reads totaux alignées sur les génomes de <i>V. aestuarianus</i> 02/041 et <i>C. gigas</i> , dans les différents échantillons.....	167
Tableau 5 : Gènes de l'hôte différenciellement exprimés en présence de différentes souches, impliqués dans la réponse inflammatoire.....	171
Tableau 6 : Gènes bactériens différenciellement exprimés par la souche 12/016 et par 12/016 $\Delta$ carS en présence d'hémocytes d'huîtres. ....	173
Tableau 7 : Caractéristiques générales des deux sous-espèces identifiées chez <i>V. aestuarianus</i> .....	179



## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANI : Average nucleotide identity

ARN : Acide ribonucléique

ASI : Animaux standardisés IFREMER

ASSW : Artificial and sterilised seawater

CTX : Cholera toxine

ECP : Extracellular products

HGT : Horizontal gene transfer

IL-17 : Interleukine 17

IS : Insertion sequence

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight

MIE : Maladie infectieuse émergente

MGE : Mobile genetic element

MTN : Maladies tropicales négligées

OMS : Organisation mondiale de la santé

ROS : Reactive oxygen species

RNA-SEQ : Ribonucleic acid sequencing

SNP : Single nucleotide polymorphism

T1SS : Type 1 secretion system

T4SS : Type 4 secretion system

T6SS : Type 6 secretion system

TCP : Toxin coregulated pilus

VAM : *Vibrio aestuarianus* metalloprotease

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VPP : Vam processing protease

VSM : *Vibrio splendidus* protease



## Introduction

Régulièrement, de nouvelles maladies infectieuses apparaissent. Elles sont essentiellement d'origine bactérienne, virale ou protozoaire. Les animaux d'élevage, et parmi eux, les animaux d'aquaculture sont fortement concernés, avec des conséquences économiques importantes. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'émergence de lignées de bactéries pathogènes de bivalves au sein de l'espèce *Vibrio aestuarianus*. Cette espèce est connue comme étant pathogène pour l'huître creuse *Crassostrea gigas* en Europe depuis le début des années 2000, et depuis 2012, des souches appartenant à cette espèce ont été associées à des mortalités de coques *Cerastoderma edule* en France. Comprendre comment les agents infectieux émergent est une question importante en santé publique et en santé vétérinaire. En effet, la lutte et la prévention de ces émergences passent nécessairement par la compréhension des mécanismes et l'identification des facteurs les favorisant. Dans cet état de l'art, après une première partie décrivant les maladies infectieuses émergentes et leurs impacts, je présenterai dans une deuxième partie les processus gouvernant l'émergence et l'évolution des agents pathogènes bactériens. La troisième partie est consacrée au cas particulier des environnements marins, en décrivant certains facteurs y favorisant les émergences d'agents pathogènes, notamment dans le genre *Vibrio*. Enfin, je donnerai une description du modèle d'étude *V. aestuarianus* utilisé pour mes travaux et présenterai les problématiques et les questions abordées pendant ma thèse.

### 1. Les maladies infectieuses émergentes

#### 1.1. Les agents responsables de maladies infectieuses

Jusqu'au 19e siècle, les causes des maladies infectieuses n'étaient pas comprises (Debré, 2020). La théorie microbienne, également appelée « théorie pathogénique » ou « théorie des germes », selon laquelle des micro-organismes sont à l'origine de maladies, et que ces micro-organismes peuvent être transmis, n'a été validée qu'à la fin de ce siècle, notamment grâce aux travaux menés par Louis Pasteur (Pasteur, 1861). Cette théorie a bénéficié de plusieurs avancées comme l'observation directe des micro-organismes par microscopie grâce à Antoni van Leeuwenhoek (Finlay & Esteban, 2001), ou les premières études épidémiologiques. Par exemple, l'étude menée par le médecin John Snow dans le quartier de Soho à Londres en 1854 a permis d'identifier l'eau contaminée comme vecteur de propagation lors de la troisième épidémie de choléra qui était en cours (Kohn, 2007). Le développement de la théorie microbienne a conduit à une lutte plus efficace contre les micro-organismes pathogènes car elle s'est accompagnée de la pratique de l'hygiène préventive, de la désinfection, de la découverte des antibiotiques (Fleming, 1929) et de la vaccination. Permettant d'établir le lien de cause à effet entre un agent pathogène et une maladie, les postulats de Henle-Koch (Evans, 1976), définis entre la fin du 19e siècle et le

20e siècle, sont encore utilisés aujourd'hui. Ils stipulent par exemple que pour qu'un micro-organisme soit reconnu comme étant la cause d'une maladie, il doit être retrouvé en abondance dans les organismes atteints de cette maladie. De plus, il doit provoquer cette maladie lorsqu'il est inoculé à un organisme sain, et être à nouveau isolé de l'organisme hôte rendu malade. En 1996, une nouvelle adaptation des postulats est proposée, adaptée aux techniques moléculaires, qui permet d'inclure les organismes non cultivables (Fredericks & Relman, 1996).

Les agents pathogènes sont les organismes qui sont dotés de mécanismes favorisant la colonisation directe ou indirecte d'un hôte pour se multiplier en son sein (Baudart & Paniel, 2014). La pathogénicité est définie comme la capacité à infecter un hôte et à causer une maladie chez l'hôte infecté (S. R. Thomas & Elkinton, 2004). La virulence correspond à la sévérité de la maladie chez les hôtes infectés (S. R. Thomas & Elkinton, 2004). Selon le cadre, elle peut être mesurée pour un agent pathogène donné, par sa vitesse d'envahissement d'un hôte, ou encore par la diminution de la valeur sélective de l'hôte (sa capacité à se reproduire), due à l'infection. Des agents pathogènes existent parmi les virus, les bactéries, les champignons, les parasites eucaryotes et les prions (K. E. Jones et al., 2008). Certains peuvent être qualifiés d'agents pathogènes primaires et d'autres d'agents pathogènes opportunistes. Les premiers sont capables de causer des maladies chez des hôtes préalablement sains, indépendamment de leur statut immunitaire. Les agents pathogènes opportunistes sont, quant à eux, présents dans l'environnement ou dans la flore commensale (par ex. intestinale, cutanée, voies respiratoires, génitales) de l'hôte. Ils se distinguent des agents pathogènes primaires par la colonisation d'hôtes fragilisés (par ex. par une immunodépression, un statut reproductif particulier, l'âge, d'autres pathologies sous-jacentes). L'ensemble des microorganismes associés à un hôte et à un état de santé réduit constitue le pathobiome (Bass et al., 2019). La pathogénicité des agents pathogènes opportunistes ne s'exprime que si les conditions offertes par leurs hôtes leur sont favorables (Baudart & Paniel, 2014). La connaissance de ces caractéristiques des agents pathogènes peut être difficile à obtenir. Elle apparaît pourtant nécessaire pour mieux comprendre la pathogénèse et mettre en place des mesures de lutte ou de prévention adaptées.

## 1.2. Les maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes

Comme l'augurait le médecin microbiologiste Charles Nicolle, de nouvelles maladies infectieuses apparaissent fréquemment (Nicolle, 1937). Par exemple, depuis 1980, 87 nouveaux agents pathogènes pour l'être humain sont apparus (Woolhouse & Gaunt, 2007). L'épidémiologiste Stephen S. Morse a proposé la notion de maladies infectieuses émergentes (MIE), et définit ces maladies comme "récemment apparues dans une population ou ayant existé auparavant, mais avec une incidence ou une aire géographique qui augmentent rapidement" (Morse, 1995). Elles

sont causées par des agents pathogènes qui (i) ont augmenté en termes d'incidence, géographique ou de gamme d'hôtes, (ii) ont changé de pathogénèse, (iii) ont récemment évolué ou (iv) ont été découverts ou nouvellement reconnus (P. K. Anderson et al., 2004; Daszak et al., 2000; Engering et al., 2013).

Certaines maladies disparaissent puis réapparaissent de façon sporadique dans leur zone d'endémicité, c'est-à-dire la région ou la population dans laquelle elles sont habituellement présentes. Par exemple, le virus Ebola connaît des émergences répétées ou des réémergences depuis son apparition en République Démocratique du Congo en 1976 (Rojas et al., 2020). De même, des maladies telles que la peste et le choléra, ré-émergent de manière très localisée, comme ce fut le cas pour la souche "El Tor" de choléra en Haïti en 2010 (Ali et al., 2011), suite à l'ouragan Tomas et à un séisme qui avait détruit les infrastructures du pays. Des réémergences de la peste en Asie ont été observées jusqu'à très récemment, comme en Mongolie en 2020 (Shen et al., 2020), les patients ayant potentiellement été infectés par des puces portées par des rongeurs (*Meriones unguiculatus*). Des ré-émergences de peste sont toujours constatées à Madagascar (Randremanana et al., 2019) faisant de cette maladie un problème de santé publique encore aujourd'hui, notamment en raison de la faible capacité financière du pays qui empêche la mise en place d'une stratégie de préparation et de riposte adéquate ([who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/plague---madagascar](http://who.int/fr/emergencies/disease-outbreak-news/item/plague---madagascar), consulté le 15/07/22).

Les MIE concernent tous les environnements et une grande majorité d'êtres vivants. Afin de comprendre quels sont les déterminants et les causes des maladies dans les populations, l'épidémiologie étudie leurs distributions dans le temps et l'espace et les facteurs influençant ces distributions. Ces études sont fondamentales pour la mise en place de mesures de lutte et pour la prévention contre ces maladies (Dufour, 2017). Le champ de l'épidémiologie est vaste, allant de l'étude de terrain à la compréhension des émergences. L'intérêt s'est porté sur les maladies infectieuses qui affectent les humains (Binder et al., 1999), les animaux domestiques (Cleaveland et al., 2001), les plantes cultivées (P. K. Anderson et al., 2004) et la faune sauvage (Daszak et al., 2000). Néanmoins, les connaissances sur ces maladies émergentes sont parfois insuffisantes, en raison par exemple des faibles moyens de recherche qui y sont consacrés comme cela peut-être le cas pour les maladies tropicales négligées (MTN) (Eisenstein, 2021). Il s'agit de maladies infectieuses qui sévissent en zones tropicales et qui ne sont pratiquement pas prises en compte dans l'action mondiale en faveur de la santé humaine ([who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases](http://who.int/fr/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases), consulté le 15/07/22). Elles bénéficient d'allocations de ressources pour la recherche très faibles ce qui limite les opportunités de développer des outils diagnostics et de les contrôler grâce à la mise au point de traitements

et de vaccins. De plus, l'épidémie de COVID-19, si elle a permis une prise de conscience de la gravité des impacts des MIE, a réorienté les priorités de recherche en réduisant encore les moyens alloués aux MTN (Eisenstein, 2021).

### 1.3. L'impact grandissant des maladies infectieuses émergentes

#### 1.3.1. Sur la santé humaine

D'après les chiffres de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), entre 2000 et 2020, en moyenne 9 millions de décès par an ont été imputés aux maladies infectieuses, essentiellement dans les pays à faible revenu, où elles constituent près de la moitié des causes de mortalité chez l'être humain (Figure 1, plages violettes) (World Health Organization, 2022).



Figure 1 : Causes de décès, en pourcentage, par région OMS, groupe de revenu de la Banque mondiale et monde, en 2000 et 2019 (World Health Organization, 2022).  
 LICs : low income countries / pays à faible revenu ; LMICs : lower middle income countries / pays à revenu moyen inférieur ; UMICs : upper middle income countries / pays à revenu intermédiaire supérieur ; HICs : high income countries / pays à revenu élevé.

L'émergence du SARS-CoV-2, le coronavirus responsable de la COVID-19, et sa propagation rapide à l'échelle planétaire ont causé 1,9 millions de décès en 2020 et 3,5 millions en 2021 (<https://covid19.who.int/data>, consulté le 11/07/22). Bien que ces chiffres soient probablement sous-évalués, ils montrent le caractère imprévisible et dramatique de l'impact de ces maladies sur la santé humaine.

Les maladies infectieuses émergentes impactent les sociétés humaines probablement depuis le néolithique (Debré, 2020) alors que les sociétés sédentaires ont commencé à apparaître, favorisant la concentration des populations dans des villes, ainsi que l'agriculture et la domestication des animaux (Armelagos et al., 1991). Ce passage à des sociétés sédentarisées et agricoles est appelé "première transition épidémiologique" (Omran, 2005), et il a entraîné des modifications majeures de l'écologie microbienne : de nouveaux vecteurs et de nouveaux réservoirs sont apparus, le manque d'hygiène et les fortes densités de populations fournissant de multiples opportunités d'émergence et de propagation de lignées pathogènes. Les premières zoonoses ont été favorisées par la domestication de nombreux animaux (Debré, 2020). Par exemple, les agents responsables de la tuberculose, l'anthrax, la fièvre Q et la brucellose pourraient avoir été transmis aux êtres humains par les produits issus de l'élevage d'animaux (Barrett et al., 1998; Tax, 2017). L'amélioration de l'hygiène et la découverte de moyens de lutte contre les agents infectieux (vaccin, antibiotique) ont permis une nette amélioration de l'espérance de vie des êtres humains, notamment en Europe et dans les pays les plus développés, au 19<sup>e</sup> siècle. Cette période de découvertes médicales majeures, appelée "deuxième transition épidémiologique" (Omran, 2005), a laissé penser que les maladies infectieuses pouvaient être contrôlées et ne constituaient plus une menace pour les sociétés humaines. Cependant, l'humanité fait actuellement face à la "troisième transition épidémiologique", dans laquelle une résurgence d'infections familières s'accompagne d'un éventail de nouvelles maladies, qui ont toutes le potentiel de se propager rapidement à l'ensemble de la planète en raison de la mondialisation (Harper & Armelagos, 2010).

Ainsi, la mondialisation apparaît comme un processus favorisant l'émergence et la propagation de nouveaux agents infectieux ou d'agents infectieux ré-émergents, en raison d'une augmentation spectaculaire du commerce international et des transports, de populations, de marchandises et de produits alimentaires (Vouga & Greub, 2016). Par exemple, la réémergence du choléra (*Vibrio cholerae* O1) en Amérique du Sud en 1991 serait liée aux eaux de cale déversées par un navire marchand asiatique au large des côtes péruviennes, à l'origine d'une infection de plus de 1,4 million de personnes sur 6 ans (Mayer, 2000). De plus, les changements environnementaux d'origine anthropique ou non, peuvent être à l'origine d'émergence d'agents pathogènes. Les événements climatiques ont probablement joué un rôle important dans l'émergence de *V. cholerae* O139 au Bangladesh en 1992. La vie marine, comme les algues ou les copépodes, sert de réservoir pour les *V. cholerae* spp. Ils subsistent sous une forme dormante, mais ensuite dans des conditions favorables (*i.e.* température de l'eau plus élevée), ils se réactivent et se propagent parmi les espèces marines (Epstein, 1993). L'émergence réussie d'un nouvel agent infectieux nécessite généralement leur diffusion rapide au sein des populations. Ainsi, l'augmentation de la densité de population a été un facteur important d'émergence de

maladies. En effet, la plus forte concentration de MIE par million de kilomètres carrés a été trouvée entre 30 et 60 degrés nord et entre 30 et 40 degrés sud, avec les principaux points chauds dans le nord-est des États-Unis, l'Europe occidentale, le Japon et le sud-est de l'Australie. Une étude, basée sur un modèle linéaire généralisé, a montré une corrélation positive entre la densité de population et la probabilité d'émergence de maladies infectieuses, suggérant que ce facteur est déterminant pour cette distribution (K. E. Jones et al., 2008). D'autres facteurs sont liés aux pratiques médicales actuelles, telles que l'utilisation abusive ou mal appropriée des antibiotiques, mais aussi l'utilisation croissante de procédures invasives, qui ont entraîné une augmentation des infections nosocomiales, résistantes aux antibiotiques, telles que les infections à *Clostridium difficile*, qui représentent désormais un enjeu de santé publique important (Ghose, 2013; Vouga & Greub, 2016). Parmi les décès dus aux maladies infectieuses, actuellement, 700 000 par an sont dus à des bactéries résistantes aux antibiotiques. Il a été estimé que ce nombre de décès pourrait atteindre 10 millions par an en 2050 (O'Neill, 2016). Enfin, au cours des 30 dernières années, il y a eu une augmentation du nombre de patients dont le système immunitaire est affaibli (Vouga & Greub, 2016). Les avancées médicales récentes contribuent en partie à ce phénomène en permettant des taux de survie plus élevés des patients atteints de cancer, de maladies chroniques telles que l'insuffisance rénale et le diabète, ou les thérapies de transplantation. Les autres facteurs contributifs incluent le vieillissement de la population et, à l'opposé, un taux plus élevé de bébés prématurés ainsi que l'épidémie de VIH et l'utilisation courante de traitement immunosuppresseur dans la gestion des maladies auto-immunes. Ainsi, des syndromes atypiques dus à des bactéries généralement inoffensives sont apparus parmi les populations vulnérables. Par exemple, *Bartonella henselae* ou *B. quintana* sont responsables de l'angiomatose bacillaire potentiellement mortelle chez les patients VIH, alors que ces bactéries n'entraînent que très peu de symptômes dans la population générale (Vouga & Greub, 2016).

### 1.3.2. Sur la sécurité alimentaire mondiale

Les agents pathogènes impactent les animaux d'élevage et les plantes cultivées, menaçant ainsi la sécurité alimentaire mondiale. Par exemple, le champignon *Phytophthora infestans* (mildiou) a été responsable de la famine la plus meurtrière qui a particulièrement touché l'Irlande entre 1845 et 1851. Le nombre total de victimes a été estimé à un million en cinq ans, et autant de personnes obligées de fuir le pays pour survivre (Ó Gráda, 2007; Woodham-Smith, 1962). *P. infestans* détruit environ un tiers de la récolte de pommes de terre en 1845, et presque toute celle de 1846 (Ó Gráda, 2007).

Pourtant, ce n'est que récemment que les agents pathogènes et les maladies ont été considérés comme des menaces directes à la sécurité alimentaire mondiale (Brooks et al., 2022). Dans les régions de l'hémisphère Nord, les agents pathogènes émergents devraient entraîner une augmentation significative et directe des menaces pesant sur les ressources alimentaires. En effet, une projection récente basée sur des modèles de circulation générale (MCG, modèles climatiques qui simulent la circulation atmosphérique et océanique (Manabe & Bryan, 1969)) a suggéré que, même si les rendements des principales cultures tempérées et tropicales sont susceptibles d'augmenter, le risque de maladies liées à des champignons et à des oomycètes augmentera davantage à des latitudes plus élevées. En effet, selon leurs calculs, à mesure que la frontière des terres arables progresse vers les pôles, les agents pathogènes qui étaient autrefois séquestrés dans les zones plus chaudes suivent. Ainsi, les pays situés plus près des pôles finiront par devenir suffisamment propices à l'installation de nouveaux agents pathogènes (Chaloner et al., 2021) (Figure 2). En effet, un déplacement moyen des agents pathogènes fongiques et oomycètes de 2,7 km par an vers les pôles est observé depuis 1960 (Bebber, 2013). De plus, la température influence le taux de reproduction de base des agents pathogènes ( $R_0$ , encadré 2) et donc leur potentiel de transmission dans les populations. En effet, il existe un seuil de température au-dessus duquel cette valeur de  $R_0$  devient supérieure à 1, c'est-à-dire que l'agent pathogène devient potentiellement épidémique. Avec l'augmentation globale des températures, la durée pendant laquelle les agents pathogènes sont potentiellement épidémiques devrait augmenter (Harvell, 2002).

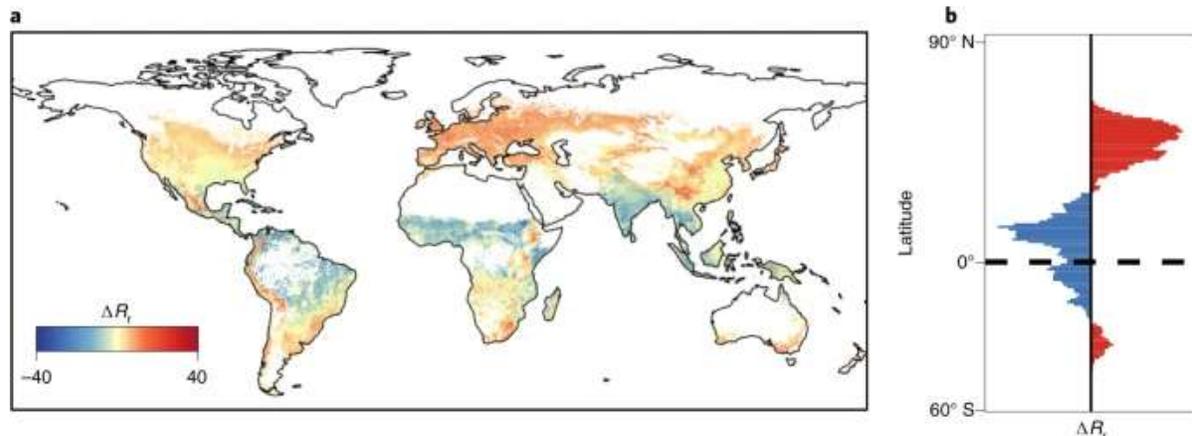


Figure 2 : Changement moyen de la richesse en espèces d'agents pathogènes sous le scénario de forçage radiatif RCP 6.0 sur tous les mois.

Chaloner et ses collaborateurs ont défini la richesse en espèces d'agents pathogènes,  $R_r$ , comme le nombre d'agents pathogènes avec un taux d'infection  $r(T) \geq 0,5$  pour leurs hôtes dans un endroit particulier. Le rouge et le bleu indiquent respectivement des augmentations et des diminutions de  $R_r$  (Chaloner et al., 2021).

Malgré une sous-représentation importante dans le débat mondial sur la sécurité alimentaire (Béné et al., 2015), les produits de la mer (les poissons, les invertébrés et les algues) sont les produits alimentaires les plus commercialisés (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2012;

R. A. Norman et al., 2019), jouant un rôle clé dans la sécurité nutritionnelle et financière, en particulier dans les économies en développement (Béné et al., 2015). Ils fournissent environ 15% de l'apport en protéines animales pour la population mondiale (Cooley et al., 2012). Plusieurs études ont suggéré que l'évolution de l'alimentation humaine vers une consommation accrue de poisson et de fruits de mer pourrait être une solution au besoin de protéines qui soutiendrait la santé humaine et environnementale (Froehlich et al., 2018; Springmann et al., 2015; Thilsted et al., 2016). Pourtant, dans certains secteurs (conchyliculture et crevetticulture), les maladies infectieuses ont des impacts économiques et sociaux particulièrement dévastateurs, avec des pertes totales dépassant 40 % de la capacité mondiale (Arthur et al., 2002; Stentiford et al., 2012). Les environnements aquatiques imposent un risque constant et omniprésent d'exposition aux agents pathogènes pour les hôtes résidents, peut-être même plus que les systèmes terrestres (Oidtmann et al., 2013) et nécessitent ainsi toute notre attention.

Bien que l'émergence de maladies infectieuses se produise couramment et dans tous les environnements, chaque événement est le produit de mécanismes évolutifs et de facteurs environnementaux particuliers. Dans une optique de lutte contre les émergences de maladies infectieuses, la connaissance de ces mécanismes et des facteurs les favorisant est nécessaire. Certains d'entre eux sont présentés dans les deux parties suivantes.

## 2. Émergence et évolution des lignées pathogènes bactériennes

Parmi les agents pathogènes responsables de MIE, les bactéries sont associées à un peu plus de la moitié des MIE affectant la santé humaine. Environ 160 nouvelles MIE causées par des bactéries ont été découvertes au cours des 70 dernières années (K. E. Jones et al., 2008). Une importante part des maladies affectant les plantes sont également d'origine bactérienne, avec une estimation de 200 espèces bactériennes impliquées (Buttimer et al., 2017). La part des infections bactériennes affectant le bétail est, elle aussi, devenue très importante notamment à cause de l'utilisation massive d'antibiotiques et l'émergence de bactéries pathogènes résistantes (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) et al., 2021).

La définition d'une espèce bactérienne est une question largement débattue. Selon le concept d'espèce biologique, proposé par Ernst Mayr, « toute espèce est séparée des autres par des mécanismes d'isolement reproductif » (Mayr, 1942). Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, les échanges génétiques entre bactéries sont possibles, même si elles appartiennent à des espèces différentes, rendant caduc la définition de Mayr. Pour des raisons pratiques, les limites d'une espèce sont généralement fixées par un seuil arbitraire (Achtman &

Wagner, 2008) de similarité entre les séquences nucléotidiques. Cette similarité peut être évaluée par le degré d'hybridation de séquences ADN (acide désoxyribonucléique) dans des conditions standards. Les bactéries sont assignées à une même espèce si le taux d'hybridation de leur ADN est supérieur ou égal à 70 % (Wayne et al., 1987). Plus récemment, face au nombre croissant de génomes bactériens disponibles, la définition des espèces s'est tournée vers des mesures *in silico* avec en particulier le pourcentage-seuil d'identité moyenne des nucléotides (ANI : Average nucleotide identity) qui a été fixé à 95%. Il s'agit de l'identité moyenne de toutes les séquences qui ont montré plus de 30 % d'identité de séquence globale (recalculée en une identité sur toute la séquence) sur une région alignable d'au moins 70 % de leur longueur (Goris et al., 2007). De plus, toutes les souches d'une espèce doivent posséder un certain degré de cohérence phénotypique (Wayne et al., 1987). Cependant, selon ces critères, la diversité au sein d'une espèce peut être très importante et regrouper des lignées qui ont des trajectoires évolutives indépendantes. Par conséquent, l'identification des espèces ne fournit pas d'informations écologiques spécifiques sur ses membres (Cohan & Perry, 2007). Au sein d'une espèce pathogène, les populations peuvent différer dans leurs gammes d'hôtes (N. H. Smith et al., 2006), leurs tissus cibles (Enright et al., 2001), ou dans le mode de transmission (Paraskevopoulos et al., 2006). Il apparaît donc plus pertinent de s'intéresser aux populations écologiques ou écotypes (Cohan, 2002a, 2002b; Cohan & Perry, 2007; Wiedenbeck & Cohan, 2011), qui peuvent être définis comme des groupe monophylétiques partageant la même niche écologique. Ils forment donc des ensembles plus cohérents pour les études épidémiologiques.

Un écotype peut être considéré comme une subdivision de l'espèce. Il s'agit de populations génétiquement cohésives et écologiquement distinctes : chaque écotype a ses propres préférences écologiques et au sein d'un écotype, les préférences écologiques sont homogènes. Tout l'écotype est issu d'un unique évènement fondateur. Il peut s'agir d'un mutant ou d'un recombinant adaptatif qui a été favorisé par la sélection naturelle dans une niche, ce qui conduit à une purge de la diversité à tous les locus de l'écotype. A chaque fois qu'une mutation ou une recombinaison adaptative apparaît, une nouvelle purge de la diversité a lieu : c'est la sélection périodique (Cohan, 2006). Cohan et ses collaborateurs expliquent que plusieurs écotypes peuvent cohabiter à l'intérieur d'une niche en raison de leurs divergences écologiques (utilisation de différentes ressources). Ils soutiennent que la systématique devrait chercher à reconnaître et à caractériser ces groupes, car ce sont les unités fondamentales jouant des rôles uniques dans l'assemblage de la communauté, la fonction de l'écosystème et les interactions biotiques (Cohan & Perry, 2007; Koeppel et al., 2008). Cette approche vise à satisfaire la mission centrale de la systématique de Hutchinson : s'assurer que le nom taxonomique d'un organisme peut nous informer précisément sur les propriétés écologiques et physiologiques de l'organisme (G. E. Hutchinson, 1968).

Les populations ainsi définies se caractérisent par différentes dynamiques évolutives qui vont être influencées par des processus responsables de la diversité génétique (les mutations qui génèrent de la diversité génétique dans une population, les transferts génétiques et les recombinaisons qui permettent la création de nouvelles combinaisons alléliques) et par les mécanismes évolutifs (sélection et dérive génétique). La génétique des populations est l'analyse de la distribution dans le temps et l'espace des fréquences alléliques résultant de ces forces ou processus évolutifs (Milgroom, 2015).

La génétique des populations bactériennes a largement bénéficié de l'arrivée des données moléculaires, sur quelques loci dans un premier temps (MLST = multi-locus sequence typing, MLSA = multi-locus sequence analysis), jusqu'au séquençage de génomes complets actuellement. Il s'agit d'une discipline récente qui a considérablement enrichi les études épidémiologiques. Auparavant, les microbiologistes n'avaient à leur disposition que des caractères phénotypiques (forme de la cellule, mobilité, morphologie de la colonie, variation antigénique, sensibilité aux bactériophages, capacité métabolique) qui ne sont pas suffisamment résolutive pour permettre d'étudier la diversité génétique au sein des populations bactériennes. Les données moléculaires ont permis de mettre en évidence la diversité génétique jusque-là insoupçonnée des procaryotes (bactéries et archées) (Denamur & Picard, 1995) et ainsi que l'adoption d'une approche phylogénétique, autorisant la délimitation de groupes avec des trajectoires évolutives distinctes.

L'un des enjeux dans l'étude d'une espèce bactérienne pathogène est donc la délimitation de ces écotypes, pour ensuite pouvoir étudier la dynamique de leur population, définir la ou les espèces hôtes, les modes de transmission, ou encore les préférences écologiques.

## 2.1. Mutations, transferts horizontaux et recombinaisons

### 2.1.1. Processus

Deux processus majeurs génèrent de la diversité génétique chez les bactéries : (a) les erreurs lors de la réplication de ADN bactérien, qui génèrent des mutations, des réarrangements et des délétions (Sheppard et al., 2018) (Figure 3,a), et (b) la recombinaison, c'est à dire l'incorporation ou le remplacement d'ADN d'une cellule donneuse dans le génome d'une cellule receveuse (Vos, 2009), qui fait intervenir du transfert horizontal d'ADN (Figure 3,b). La recombinaison permet donc la création de nouvelles combinaisons alléliques (ou en modifie la fréquence) à partir d'allèles présents. Lorsque l'ensemble de la séquence nucléotidique de l'ADN exogène est très semblable

à une portion d'ADN de la cellule receveuse, la recombinaison est dite homologue. Dans le cas contraire, elle est dite non-homologue.

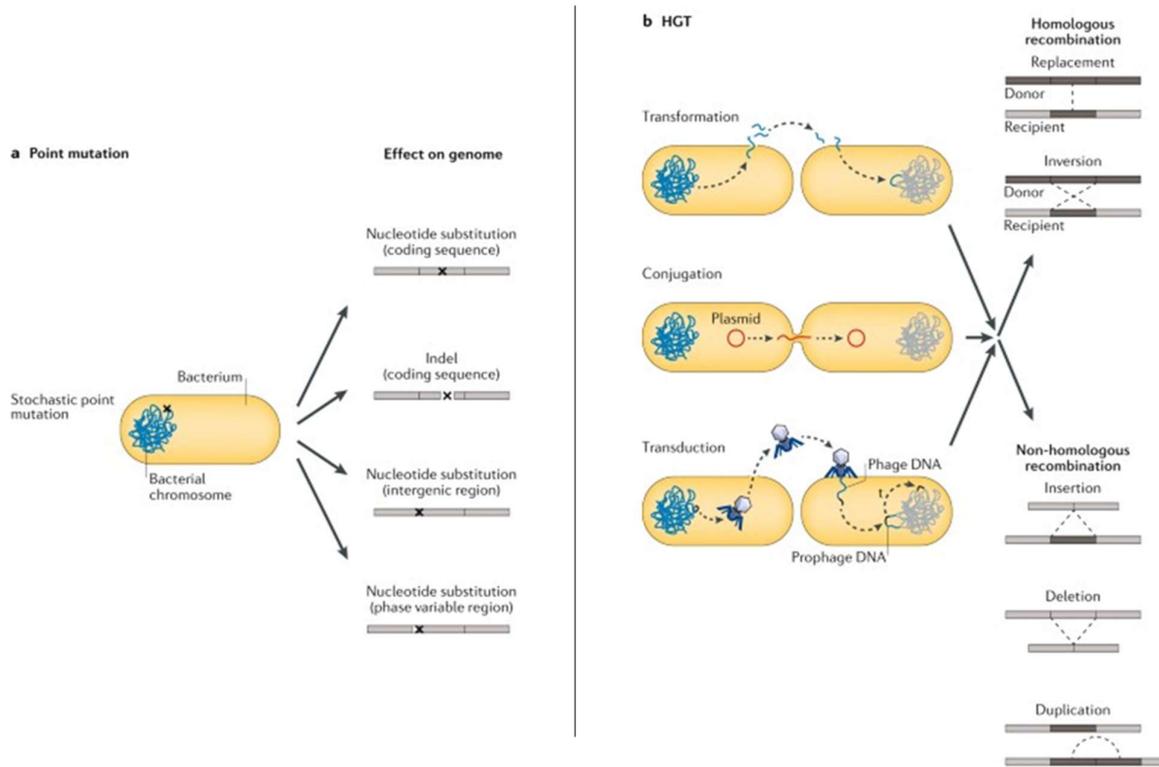


Figure 3 : La mutation et la recombinaison entraînent une variation de la séquence d'ADN.

a : Lorsqu'une mutation (par substitution non synonyme, insertion ou délétion d'une à plusieurs paires de bases) impacte une région codante, elle peut conduire à de nouvelles isoformes de protéines ayant une nouvelle fonction ou ayant perdu sa fonction. b : Le transfert horizontal de gènes (HGT) conduit soit au remplacement de l'ADN homologue par une séquence d'une autre lignée (recombinaison homologue), soit à l'insertion ou à la suppression de matériel génétique non homologue (via une recombinaison non homologue) (Sheppard et al., 2018).

Trois principaux mécanismes permettent à de l'ADN étranger de pénétrer dans une cellule bactérienne : la conjugaison, la transduction et la transformation (Figure 3, b). Dans le cas de la conjugaison, un contact direct temporaire (par l'intermédiaire de pili sexuels) conduit à l'échange d'ADN plasmidique (voir Encadré 1). Il faut donc qu'une bactérie donneuse se trouve à proximité d'une bactérie receveuse, comme lors de co-infection d'un hôte ou d'un vecteur. Pendant la transduction, l'ADN de la cellule donneuse est transmis par un bactériophage et est intégré dans le génome de la cellule receveuse en tant que prophage (voir Encadré 1). Enfin, lors de la transformation, la bactérie receveuse absorbe l'ADN extracellulaire d'un donneur. Il faut donc que la bactérie receveuse soit compétente, c'est-à-dire, qu'elle soit dotée d'une machinerie de compétence fonctionnelle et active, permettant l'absorption d'ADN de l'environnement. Cela nécessite un ensemble de loci hautement spécialisés qui sont souvent répartis dans tout le génome et qui sont conservés au sein d'une espèce (Croucher et al., 2016).

### **Encadré 1 : Les éléments génétiques mobiles (MGE)**

Les éléments génétiques mobiles (MGE), découverts par la cytogénéticienne Barbara McClintock, comprennent des éléments qui interviennent dans la mobilité des morceaux d'ADN, soit intracellulaire, soit entre les cellules (Botelho & Schulenburg, 2020). Chez les bactéries, ces éléments sont déterminants pour leur permettre de s'adapter aux changements environnementaux. Les MGE peuvent s'intégrer dans le chromosome de leur hôte ou rester extra-chromosomiques. Ils sont habituellement classés dans trois catégories : les éléments transposables, les plasmides et les prophages.

#### 1/ Les éléments transposables

Cette catégorie contient les séquences d'insertion (IS), les intégrons et les transposons. Les IS sont les plus petits éléments transposables. Ils ne contiennent que les gènes qui codent pour leur fonction de transposition, c'est-à-dire une ou deux transposases (enzyme dont la fonction est d'exciser la séquence transposon du génome hôte et de l'insérer dans un nouveau site accepteur) flanquée de séquences inversées répétées, qui constituent les sites de recombinaison. Les IS peuvent être associées avec des gènes passagers, présents dans une cassette de gènes située dans un intégron, le tout formant un transposon. Les éléments transposables ne peuvent pas se transférer à un autre organisme sans l'aide d'éléments génétiques mobiles autotransmissibles (comme des plasmides), ou en utilisant des mécanismes de transfert horizontal comme la transformation ou la formation de vésicules de la membrane externe. Plusieurs études ont proposé que le mode de vie de la cellule hôte influence la dynamique des éléments transposables dans le génome (Moran & Plague, 2004; Plague et al., 2008). Par exemple, une expansion des IS est observée chez les bactéries ayant récemment adopté un mode de vie restreint à l'hôte. Il pourrait s'agir d'une première étape dans un processus de réduction génomique, résultant d'une diminution des pressions de sélection s'appliquant sur des gènes qui deviennent inessentiels dans l'environnement nutritionnellement riche de l'hôte de ces bactéries (Siguier et al., 2014).

#### 2/ Les plasmides

Il s'agit de molécules d'ADN circulaire extrachromosomique, capables de se répliquer de manière autonome. La taille varie entre 2 kb et 400 kb. Ils peuvent être présents en plusieurs copies. Certains plasmides, dits "conjuguatifs", contiennent des gènes qui codent pour une machinerie de conjugaison par des pili sexuels (T4P chez les bactéries à Gram négatif), permettant leurs transferts d'une bactérie à une autre lors de la conjugaison. D'autres plasmides, dits "mobilisables", ne contiennent pas ces gènes et ne sont donc pas auto-transférables. Ils peuvent néanmoins être transférés d'une bactérie à une autre grâce à un autre plasmide, conjuguatif, qui va encoder la machinerie de conjugaison. Les plasmides peuvent servir de véhicule pour le transfert d'éléments transposables (Norman et al., 2009).

#### 3/ Les prophages

Parmi les virus bactériophages, il y a les phages purement lytiques et les phages tempérés. Alors que les phages lytiques ne vont qu'infecter les cellules bactériennes et les tuer pour libérer leur descendance, les phages tempérés peuvent aussi s'intégrer dans le chromosome bactérien, ou persister sous forme extrachromosomique. Ils deviennent alors des prophages. Le portage du prophage s'accompagne d'un certain danger pour la bactérie puisque celui-ci peut réintégrer le cycle lytique. Mais il y a également trois avantages potentiels majeurs du portage de prophage : en tant qu'agents de transfert horizontal de gènes (HGT), en tant que sources de variation génétique pour l'innovation évolutive et en tant qu'armes de compétition bactérienne (Harrison & Brockhurst, 2017).

Une fois entré à l'intérieur du cytoplasme, l'ADN exogène peut être détruit par les systèmes de dégradation de l'ADN étranger. Ces systèmes de protection sont capables de cliver spécifiquement l'ADN étranger. Il s'agit des endonucléases et des systèmes CRISPR-Cas (Cohan, 2002a). L'ADN exogène peut aussi se maintenir en tant qu'unité répliquative autonome, le plus souvent sous forme de plasmide. Mais une réduction de la valeur sélective peut être associée au portage plasmidique (Carroll & Wong, 2018), en raison du coût métabolique lié à la répllication des gènes plasmidiques et du détournement de ressources que cela implique pour le micro-organisme porteur. De plus, l'expression des gènes plasmidiques entraîne une séquestration des ribosomes et des problèmes liés à l'utilisation des codons et à l'approvisionnement limité en ARNt (ARN de transfert). En effet, certains codons sont reconnus avec plus de précision et/ou d'efficacité par les ARNt les plus abondants, par rapport à d'autres codons dont ils sont synonymes (Ikemura, 1985; Plotkin & Kudla, 2011; Sharp et al., 2005). Il est donc possible que la population d'ARNt de l'hôte ne soit pas adaptée aux codons constituant les gènes plasmidiques. Par exemple, ce problème lié à l'utilisation des codons a été observé pour l'expression de gènes plasmidiques chez *Escherichia coli* (Gouy & Gautier, 1982). Pour les plasmides conjugatifs, la production de la machinerie conjugative du système de sécrétion de type 4 (voir Encadré 1) a un coût pour la cellule bactérienne. Même dans les cas où le portage de plasmide n'est pas coûteux, on s'attend à ce que les plasmides soient lentement perdus par hasard lors des divisions cellulaires (Lenski & Bouma, 1987; Nordström et al., 1984; Scott, 1984), sauf si des gènes à valeur sélective forte s'y trouvent (Lenski et al., 1994). Il arrive donc que les gènes plasmidiques s'intègrent dans le ou les chromosomes de l'hôte. Cette intégration va dépendre de plusieurs facteurs comme le degré de similarité avec les séquences d'ADN de l'hôte dans le cas d'une recombinaison homologue, ou de la liaison physique des gènes plasmidiques avec d'autres séquences susceptibles de s'intégrer, comme les éléments transposables ou des gènes de bactériophages (voir Encadré 1). Ainsi, le taux de succès du transfert horizontal est réduit à mesure que la distance génétique entre un hôte et un receveur augmente et que l'homologie entre leurs séquences génomiques s'affaiblit (Cohan, 1994). La distance génétique entre les bactéries peut également réduire l'efficacité des plasmides et des bactériophages en tant que vecteurs de transferts horizontaux car leurs gammes d'hôtes sont limitées à des bactéries similaires (Cohan, 2002a).

Les transferts horizontaux peuvent générer une diversité du contenu en gènes entre des cellules appartenant à une même espèce. Cette observation a conduit à développer la notion de pangéome (Tettelin et al., 2005), qui divise le répertoire de gènes d'une espèce procaryote en deux parties : le core génome contient les gènes qui sont partagés par l'ensemble des individus appartenant à cette espèce, et le génome accessoire (ou flexible) contient des gènes dont l'occurrence varie au sein de l'espèce. Les changements dans le core génome impliquent des

mutations transmises verticalement et des mutations acquises horizontalement *via* des événements de recombinaison homologue (Polz et al., 2013; C. M. Thomas & Nielsen, 2005). Les changements dans le génome accessoire des procaryotes sont souvent associés à des transferts horizontaux et des recombinaisons non homologues impliquant des éléments génétiques mobiles (MGE).

### 2.1.2. Détection des événements de recombinaison

Historiquement, trois approches ont été adoptées pour la détection des événements de recombinaison. La première approche est basée sur la détection d'échanges au sein d'un échantillon, c'est-à-dire, la recherche de similitudes locales inattendues entre des séquences divergentes, qui sont supposées représenter le mouvement de séquence d'un donneur vers un receveur, ou un donneur commun agissant comme source de la séquence pour les deux indépendamment (Sneath et al., 1975). Ces méthodes sont plus efficaces lorsque des séquences sont disponibles pour les génotypes donneur, receveur et recombinant. Ceci n'est souvent pas le cas chez les bactéries en raison de la diversité non échantillonnée de donneurs potentiels, qui peuvent être membres d'une espèce différente ou ne plus exister dans la population (Croucher et al., 2015).

Par conséquent, une deuxième approche s'intéresse à la structure en mosaïque de régions génomiques dérivées de différents ancêtres (J. Smith, 1992). Une telle structure est une preuve d'importation de séquences divergentes provenant de sources éloignées et les recombinaisons sont identifiées comme des régions contenant une densité élevée de polymorphismes par rapport au niveau basal (Croucher et al., 2015), qui correspond au "cadre clonal" (Milkman & Bridges, 1993). Le cadre clonal représente l'ADN ancestral au sein d'une lignée clonale, qui au fil du temps est de plus en plus perturbé par l'accumulation de recombinaisons localisées. L'une des premières méthodes de ce type a été l'application du test  $\chi^2$  maximal aux gènes bactériens mosaïques (J. Smith, 1992), développée par John Maynard Smith. Cette méthode a permis d'identifier les frontières entre les régions de différentes densités de polymorphisme nucléotidique. Les méthodes actuelles (Croucher et al., 2015; Didelot & Falush, 2007; Didelot & Wilson, 2015) reposent sur l'examen de la distribution des sites polymorphes le long d'alignements de séquences. En l'absence de recombinaison, les sites polymorphes doivent être réparties approximativement au hasard le long d'un gène. Les échanges de matériel génétique intragénique impliquant des isolats génétiquement distincts entraînent une distribution non aléatoire du polymorphisme nucléotidique (structure en mosaïque). Par exemple, un gène provenant de deux isolats peut être identique sauf dans une région où les séquences diffèrent

sensiblement en raison de l'apparition dans un isolat d'un échange recombinaire à partir d'un troisième isolat génétiquement éloigné.

Il faut aussi noter que les loci dans un génome sont physiquement liés, et que ce lien est d'autant plus fort que les loci sont proches, c'est-à-dire qu'ils ont plus de chance d'être transmis ensemble à la génération suivante. Or, la recombinaison a pour conséquence de perturber l'association entre les loci puisque des morceaux d'ADN peuvent s'intégrer dans le génome. Ainsi, moins il y a de recombinaison dans un génome, plus les loci sont liés entre eux, c'est ce qu'on appelle le déséquilibre de liaison. Une autre méthode pour quantifier la recombinaison consiste à estimer l'association entre des loci dans les génomes d'une population (Crawford et al., 2004).

L'estimation des taux de recombinaison dans une population, liée aux échanges génétiques à l'intérieur d'une population ou entre populations, est nécessaire en épidémiologie moléculaire. Elle permet de formuler des hypothèses sur l'écologie et le mode de vie de cette population.

## 2.2. Impact de la sélection naturelle et de la dérive génétique

Le paradigme Darwinien repris dans la première moitié du 20<sup>e</sup> siècle, notamment par R.A. Fisher (Fisher, 1958), J.B.S. Haldane (Haldane, 1932), S. Wright (S. Wright, 1931) et J. Huxley (Huxley, 1942), dans la théorie synthétique de l'évolution, considère la sélection comme le moteur de l'évolution. Selon ce paradigme, toutes les mutations qui apparaissent dans la séquence génomique d'un individu (issues d'erreurs lors de la réplication ou de la recombinaison) sont soumises à des pressions de sélection. Celles qui apportent un avantage sont rapidement fixées dans la population, alors que celles qui sont délétères sont rapidement purgées de la population. Tous ces processus adaptatifs ont donc tendance à purger la diversité génétique dans une population. Néanmoins, d'autres processus, tels que la sélection balancée, qui favorise la coexistence de plusieurs allèles, ou la sélection diversifiante qui favorise les phénotypes extrêmes par rapport aux intermédiaires, peuvent maintenir une certaine quantité de polymorphisme génétique dans une population.

Dans la deuxième moitié du 20<sup>e</sup> siècle, grâce à l'arrivée de données moléculaires et à l'observation de quantités de polymorphisme génétique (existence de plusieurs allèles différents sur un locus) dans les populations plus élevées que celles attendues dans le cas d'une évolution adaptatrice, Kimura a proposé la théorie neutre (Kimura, 1983). Elle a introduit le fait que c'est en priorité la dérive génétique, c'est-à-dire le hasard, et non l'adaptation, qui détermine le changement de fréquence des allèles au cours des générations dans une population. Après la découverte de l'ADN comme support de l'information génétique, le code génétique a pu être

décrypté. Compte-tenu de sa redondance, une mutation dans la séquence nucléotidique peut être synonyme, c'est-à-dire qu'elle n'entraîne pas de changement dans la séquence protéique après traduction. De telles mutations sont considérées neutres, c'est-à-dire non soumises à des pressions de sélection, de même que les mutations qui apparaissent dans les parties non codantes du génome. La dérive génétique est donc, *a priori*, la seule force qui s'applique à ces mutations. L'effet de la dérive génétique sur la fréquence des mutations étant beaucoup plus lent que celui de la sélection, cette fréquence va dériver entre 0 et 1 pendant un temps assez long, expliquant pourquoi une quantité importante de polymorphisme se maintient.

En réalité, dans la plupart des cas, le comportement d'une mutation est influencé à la fois par la sélection et par la dérive génétique (Ohta, 1992). Les effets relatifs de la sélection et de la dérive génétique sur les fréquences des mutations dépendent de la force de l'avantage (ou du désavantage) associé à ces mutations, et également du nombre de géniteurs dans la population, c'est-à-dire la taille efficace de la population ( $N_e$ ). Le coefficient de sélection ( $s$ ) augmente avec l'avantage (ou le désavantage) associé à la mutation. Le coefficient de dérive ( $1/N_e$ ) augmente lorsque la taille efficace diminue. Si le coefficient de sélection d'une mutation est petit face au coefficient de dérive ( $s \ll 1/N_e$ ), alors le destin de la mutation sera dicté par la dérive génétique. Ainsi, lorsque la taille efficace est petite, la pression de sélection agissant sur des allèles faiblement délétères va être moins importante et la dérive génétique devient la force prédominante, conduisant à une fixation aléatoire de ces variants dans la population (Bobay & Ochman, 2017). A l'inverse, lorsque la taille efficace est importante, on considère que la dérive n'a plus d'impact par rapport à la sélection.

Cependant, E. Rocha a nuancé les implications des théories de Kimura et Ohta en génétique des populations bactériennes (Rocha, 2018). En effet, chez les bactéries, les gènes correspondent à 85 à 90 % du génome et les régions intergéniques sont petites et portent un grand nombre de sites régulateurs (Mira et al., 2001). De plus, les gènes ont peu ou pas d'introns et sont généralement organisés en opérons où les insertions et les délétions de matériel génétique ont généralement des effets délétères sur l'expression des gènes (Price et al., 2006). Le code génétique indique que les mutations non synonymes, qui ont des effets sur la valeur sélective, sont beaucoup plus nombreuses que les mutations synonymes (Nei & Gojobori, 1986). Parce que ces effets sur la valeur sélective sont généralement négatifs, ces mutations sont progressivement purgées des populations par la sélection naturelle - sélection purificatrice - conduisant à de faibles ratios de taux de substitution non synonymes ( $dN$ ) sur synonymes ( $dS$ ) ( $dN / dS \ll 1$ ) (Kuo et al., 2009). De plus, les substitutions synonymes peuvent également être affectées par la sélection naturelle. Par exemple, certains codons sont reconnus avec plus de

précision et/ou d'efficacité par les espèces d'ARNt les plus abondantes, par rapport à d'autres codons dont ils sont synonymes. Les gènes exprimés à des niveaux élevés présentent un biais vers ces codons (Ikemura, 1985; Plotkin & Kudla, 2011; Sharp et al., 2005), en particulier chez les bactéries à croissance rapide (Vieira-Silva & Rocha, 2010).

Enfin, un autre paramètre peut influencer la destinée d'une variation : il s'agit de la liaison entre les loci. Ainsi, une mutation presque neutre ou neutre peut se transmettre dans une population à la même fréquence qu'une mutation avantageuse, par auto-stop, et finalement, être rapidement fixée dans la population. Ce processus de remplacement allélique défini par Maynard-Smith et Haig est appelé le "balayage sélectif" (Smith & Haigh, 1974).

L'effet de la sélection sur la diversité génétique dans une population peut être difficile à différencier d'effets démographiques. Chez les bactéries pathogènes, les dynamiques de transmission peuvent impliquer des goulots d'étranglement dans la population, avec une diminution brutale du nombre de géniteurs (Toft & Andersson, 2010). En effet, la taille efficace se limitera aux bactéries qui ont pu se transmettre à un nouvel individu. Pourtant, les effets démographiques s'appliquent à l'ensemble des génomes alors que les effets sélectifs sont localisés. Il apparaît donc possible d'identifier des loci sous sélection, potentiellement liés à l'adaptation à un environnement dans une population.

## 2.3. Application aux lignées pathogènes bactériennes

### 2.3.1. Emergence de lignées pathogènes grâce à l'acquisition de nouveaux traits

Grâce aux mutations, au transfert horizontal de gènes et aux recombinaisons, les bactéries peuvent acquérir de nouvelles caractéristiques qui vont entraîner une poussée soudaine de la maladie chez les mêmes hôtes (Engering et al., 2013). Par exemple, dans certaines conditions, elles peuvent développer un plus grand degré de virulence (Encadré 2). L'implication du transfert latéral dans l'acquisition de la virulence a été mise en évidence dès 1928, par Frederick Griffith qui observa que des pneumocoques non virulents pouvaient acquérir un pouvoir pathogène par simple contact avec des bactéries virulentes (Griffith, 1928). Elles peuvent aussi développer une résistance nouvelle ou accrue aux antibiotiques. Par exemple, Wirth et ses collaborateurs, en 2020, ont montré que chez l'espèce *Staphylococcus capitis*, le clone NRCS-A, responsable de décès d'enfants de moins de 5 ans, se distingue des autres lignées de l'espèce par plusieurs polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism, SNP) dans des gènes codant des protéines impliquées dans la résistance à des antibiotiques (Wirth et al., 2020). L'acquisition de nouveaux traits peut aussi permettre d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. Par exemple, des souches pathogènes d'*E. coli* et du genre *Shigella* sont capables de sécréter des

effecteurs qui vont inhiber une voie de signalisation impliquée dans les défenses immunitaires humaines (de Jong & Alto, 2018). On peut alors observer une transition du statut de commensal à celui de pathogène.

Si, dans de nombreux cas, l'acquisition de traits de pathogénicité est liée à l'acquisition de gènes ou à des mutations bénéfiques, la pseudogénéisation peut aussi jouer un rôle. Les pseudogènes sont des segments génomiques homologues à des gènes fonctionnels qui ne codent pas pour des produits fonctionnels en raison de la présence de défauts génétiques. Par exemple, il arrive que la pseudogénéisation entraîne une augmentation de la virulence, comme chez *Salmonella enterica* serovar *Typhi*. En effet, Valenzuela et ses collaborateurs ont montré que le gène *sopE2*, qui code un facteur d'échange de guanine nécessaire à l'invasion des cellules épithéliales, a été perdu par pseudogénéisation. Or, une expérience de complémentation restaurant le gène codant une protéine fonctionnelle, résulte en une invasion altérée par le mutant dans toutes les cellules épithéliales testées (Valenzuela et al., 2015).

Un autre enjeu dans les études d'épidémiologie moléculaire sera alors, après avoir délimité la population pathogène, d'identifier des mutations, des recombinaisons, des acquisitions de gènes, voire d'ilots génomiques, qui ont pu permettre l'émergence de cette population.

### 2.3.2. Structure des populations bactériennes pathogènes

Selon l'importance relative des forces évolutives, les populations bactériennes occupent un spectre de structures populationnelles allant de la panmixie avec une structure fortement sexuée (terme qui indique une très grande proportion d'échanges horizontaux entre souches (Martinez, 1991)) à la structure "épidémique" (Figure 4).

Dans les populations panmictiques, le taux de transfert horizontal est supérieur au taux de division cellulaire verticale, ce qui entraîne une association aléatoire (équilibre de liaison) entre les loci du génome (Shapiro, 2016). L'exemple le plus connu est celui de la bactérie *Helicobacter pylori*, qui colonise la muqueuse gastrique de la moitié de la population humaine (Falush et al., 2001). Cette bactérie présente un degré très élevé de diversité génétique, à tel point que presque chaque personne infectée porte une ou plusieurs souches uniques (Suerbaum & Josenhans, 2007). Cette diversité est générée par la combinaison d'un taux de mutation élevé et de recombinaisons fréquentes entre les souches lors d'infections mixtes qui génèrent un grand nombre de combinaisons alléliques (Suerbaum & Josenhans, 2007).

## Encadré 2 : Évolution de la virulence et du potentiel de transmission des bactéries

La virulence est une diminution de valeur sélective d'un hôte face à une infection. Entre la fin du 19e et le début du 20e siècle, plusieurs chercheurs ont émis que la relation hôte-pathogène devrait évoluer vers l'avirulence (T. Smith, 1904; Van Beneden, 1878). Pourtant, chez plusieurs agents pathogènes, la virulence persiste, comme chez *M. tuberculosis* ou *N. gonorrhoeae* malgré une longue histoire de coévolution avec l'être humain (Manchester, 1984). Il est alors apparu que le plus important pour l'agent pathogène, en termes de valeur sélective, est sa capacité de transmission, qui est positivement corrélée à sa multiplication dans un hôte. Et plus il se multiplie, plus un agent pathogène est virulent, puisqu'il utilise des ressources de l'hôte pour sa réplication. Ainsi, une notion importante en épidémiologie est le nombre de reproduction de base,  $R_0$ . Il désigne le nombre moyen de cas secondaires d'infection générés par un seul cas primaire introduit dans une population d'hôtes close précédemment non exposée (équation 1) (Alizon, 2006).

$$R_0 = \frac{\beta \cdot S}{\mu + \nu + \alpha} \quad (\text{Équation 1})$$

$\beta$  : taux de transmission du parasite  
 $\nu$  : taux de guérison des hôtes  
 $\mu$  : mortalité naturelle de l'hôte  
 $\alpha$  : virulence de l'agent pathogène  
 $S$  : Nombre d'individus sains dans la population

Ce paramètre va ainsi nous renseigner sur la capacité d'une maladie à se propager dans une population, c'est-à-dire sur son caractère épidémique. Si le  $R_0$  est inférieur à 1 dans la population d'hôtes, alors il n'y aura qu'une propagation limitée de l'infection au sein de cette population. Si le  $R_0$  est supérieur à 1, alors l'épidémie se développe dans la population hôte. Selon l'équation 1, la virulence optimale qui maximiserait le  $R_0$  serait une virulence nulle. Pour résoudre ce paradoxe, Anderson et May (R. M. Anderson & May, 1982) ont proposé la théorie du compromis entre la virulence et la transmission. Selon cette théorie, il existe un niveau de virulence optimal chez un hôte qui va maximiser le potentiel de transmission de l'agent pathogène. Selon eux, la transmission et la virulence sont liées et ils intègrent ce lien dans l'équation de calcul du  $R_0$  (équation 2).

$$R_0 = \frac{\beta(\alpha) \cdot S}{\mu + \nu + \alpha} \quad (\text{Équation 2})$$

Cette nouvelle équation permet de tracer la courbe suivante, et de déterminer en théorie la virulence optimale d'un agent pathogène (Figure A).

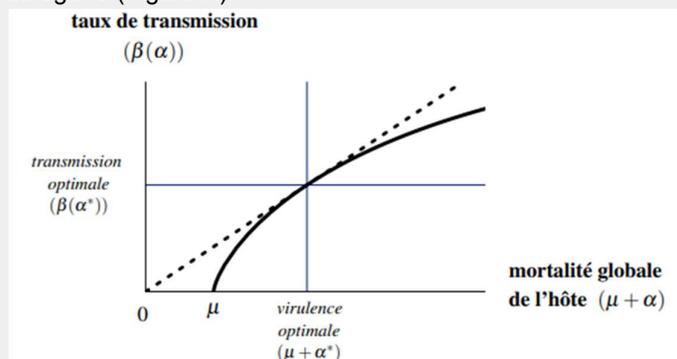


Figure A : Courbe de compromis évolutif entre la transmission ( $\beta$ ) et la virulence ( $\alpha$ ) (Alizon, 2006).

Dans les populations présentant une structure épidémique (Figure 4), la population de fond est panmictique et au sein de cette population de fond, des types particuliers émergent et explosent en évoluant de manière clonale, par des mutations aléatoires qui se produisent lors de la réplication de l'ADN (Shapiro, 2016). Dans ces types particuliers, le transfert horizontal d'ADN est négligeable ou non observable. Ces clones résistent à court terme à l'effet homogénéisant de la recombinaison (J. M. Smith et al., 2000). Un exemple est celui d'un clone de *N. meningitidis* qui avait acquis un avantage sélectif important au sein d'une population panmictique de *N. meningitidis*. Ce clone a émergé et provoqué une pandémie de méningite cérébrospinale sur trois continents dans les années 1980 (Caugant et al., 1986). L'un des meilleurs exemples de bactéries à évolution clonale est le complexe *Mycobacterium tuberculosis* (Dos Vultos et al., 2008), chez qui les transferts horizontaux semblent ne plus se produire depuis longtemps (X. Liu et al., 2006; Rosas-Magallanes et al., 2006).

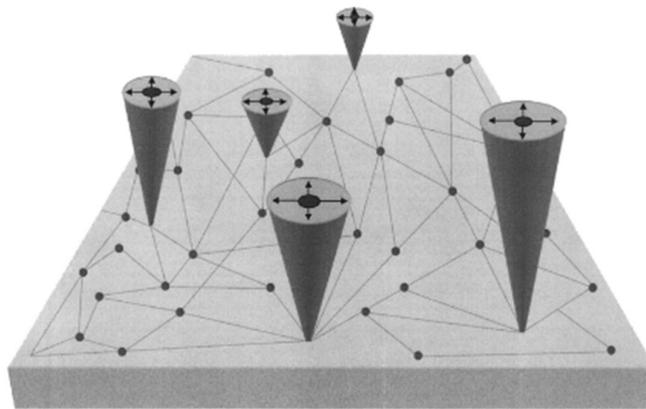


Figure 4 : La structure de la population bactérienne « épidémique ». Une telle population est composée de deux parties. Premièrement, la population de fond est composée d'un grand nombre de génotypes relativement rares et non apparentés (petits cercles) qui recombinent à une fréquence élevée. Sur ce fond se superposent un nombre limité de génotypes (ou des groupes de génotypes étroitement apparentés) très fréquents en raison de leur succès reproducteur, illustrés sous forme de cônes. Ce sont des complexes clonaux qui émergent généralement d'un génotype ancestral unique, hautement adaptatif (les grands cercles), dont la diversification est causée par la mutation et/ou la recombinaison (J. M. Smith et al., 2000).

### 2.3.3. Isolement écologique des lignées bactériennes

Le transfert d'ADN nécessite que les bactéries donneuses et receveuses partagent au moins temporairement la même niche écologique. Elles doivent donc partager un habitat, mais aussi des conditions physico-chimiques (température, salinité, pH, etc.) (G. E. Hutchinson, 1957) propices à leur développement concomitant dans cet habitat. Par conséquent, l'isolement spatial ou écologique peut être un obstacle au flux de matériel génétiques (Cohan, 2002a; Polz et al., 2013).

Or, les populations pathogènes peuvent avoir connu un changement de niche (passage d'un mode de vie libre à parasite obligatoire) se traduisant *in fine* par un isolement et donc l'inhibition de transferts d'ADN avec la population parentale, voire avec la communauté bactérienne au sens large (Bergstrom et al., 1999; Hauck & Maiden, 2018). Dans ce cas, le transfert d'ADN peut avoir lieu à l'intérieur des populations bactérienne isolées, mais la distance génétique entre les individus est tellement faible que l'échange d'ADN est sans conséquence sur les fréquences alléliques dans la population (Tibayrenc & Ayala, 2015). Il peut néanmoins être utile pour la réparation de l'ADN (Feil & Spratt, 2001).

L'isolement spatial ou écologique des lignées pathogènes favorise leur spécialisation et éventuellement leur spéciation. En effet, les transferts horizontaux peuvent fournir de nouveaux gènes à une population bactérienne, leur permettant de s'adapter à une nouvelle niche écologique. L'absence de ces transferts entraîne donc une perte d'adaptabilité des populations isolées, qui vont avoir tendance à se spécialiser de manière irréversible (Moran & Wernegreen, 2000). De plus, en l'absence de recombinaison, les mutations délétères ou faiblement délétères ne peuvent que s'accumuler dans une population isolée. Ce processus est connu sous le nom de « cliquet de Muller » (Muller, 1964). Ainsi, la restriction à une gamme d'hôtes donnée approfondit le niveau extrême de spécialisation que ces populations ont subi. Il peut également entraîner une perte de fitness, en raison de l'accumulation de mutations délétères ou légèrement délétères.

Face aux nombreux facteurs qui peuvent influencer l'évolution des populations bactériennes, il apparaît important de combiner les données génétiques, qui vont nous renseigner sur les distributions alléliques, à des données écologiques et des connaissances sur la biologie des bactéries, afin d'identifier les forces agissant sur ces distributions alléliques.

### 3. Vibrios et émergences en aquaculture

#### 3.1. Le genre bactérien *Vibrio*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des gamma protéobactéries ubiquistes hétérotrophes des environnements aquatiques (Reen et al., 2006). Ce genre regroupe des bactéries très diverses sur le plan génétique, phénotypique et sur le plan écologique. La diversité des vibrios résulte d'une capacité à générer de la diversité génétique, par a) mutations ou petites délétions, transférées verticalement à la progéniture ou b) par transfert horizontal de gènes (HGT) (Hazen et al., 2010). Ils possèdent deux chromosomes : le chromosome 1 contient les gènes qui codent pour la plupart des fonctions essentielles alors que le chromosome 2, de taille plus variable, contient des gènes accessoires, codant pour des fonctions plus ou moins spécifiques, dont des gènes de virulence (Grimes et al., 2009). Les gènes présents sur le chromosome 2 ne sont induits que dans des conditions environnementales particulières (Grimes et al., 2009). Les deux chromosomes ont été façonnés par recombinaison et transfert horizontal de gènes (Baker-Austin et al., 2018). Il a été proposé que cette structure du génome en deux chromosomes est avantageuse pour les vibrios dans les conditions environnementales spécifiques qu'ils rencontrent au cours de leur cycle de vie, et pourrait contribuer à la diversité environnementale du genre (Okada et al., 2005).

Les bactéries du genre *Vibrio* peuvent vivre libres, associées à des particules en suspension, ou être associées à une espèce hôte dans une relation symbiotique, commensale ou parasitaire (Le Roux & Blokesch, 2018). Par exemple, l'association symbiotique entre *Vibrio fischeri* et *Euprymna scolopes* (bobtail squid) a été largement étudiée. Bien que cette relation soit non obligatoire, l'organe lumineux de *E. scolopes* fournit un environnement sûr et riche en nutriments pour *V. fischeri*. De son côté, le calamar peut utiliser la lumière produite par les bactéries pour éviter la prédation pendant la nuit (Davidson et al., 2004; Nyholm & McFall-Ngai, 2004). Cette relation repose sur plusieurs étapes complexes telles que la formation d'un biofilm bactérien sur le mucus sécrété par les cellules épithéliales formant la surface de l'organe lumineux d'*E. scolopes*. La formation de biofilm est régulée notamment par la concentration en sels et en nutriments dans l'environnement de *V. fischeri* (Marsden et al., 2017). Puis, les cellules bactériennes migrent à travers les conduits qui mènent aux cryptes de l'organe lumineux (Nyholm et al., 2002). Pour atténuer le stress oxydatif auquel elles sont exposées dans ces cryptes, les bactéries *V. fischeri* sont capables d'atténuer la production d'oxyde nitrique (NO) (Davidson et al., 2004). Elles peuvent aussi induire une morphogénèse des cellules épithéliales qui limitera les futures colonisations (McFall-Ngai et al., 2010). Ces étapes de colonisation de l'organe lumineux ont lieu le soir, puis le matin, presque toutes les cellules bactériennes sont expulsées. Ce cycle de

colonisation-expulsion se produit ainsi chaque jour. D'autres vibrios peuvent être associés à un hôte dans une relation pathogène. L'espèce de vibrio pathogène la plus étudiée est *Vibrio cholerae*, l'agent responsable du choléra, une maladie diarrhéique potentiellement mortelle, endémique dans de nombreux pays africains et asiatiques, et qui s'est également manifestée sous forme d'épidémies et de pandémies depuis 1817 (Didelot et al., 2015; Harris et al., 2012). Plus de 200 sérogroupes (c'est-à-dire des souches regroupées en fonctions des caractéristiques de leurs antigènes de surface ou de leurs protéines) sont connus, mais seuls les sérogroupes O1 et O139 seraient à l'origine d'épidémies de choléra (Baker-Austin et al., 2018). Depuis 1817, sept épidémies se sont propagées depuis l'Asie à l'ensemble du monde. Les souches épidémiques ont émergé à partir de souches environnementales ayant acquis des îlots génomiques par transfert horizontal leur conférant leur pathogénicité (Davis, 2003). Elles ont successivement acquis un premier îlot de virulence codant la protéine TCP (Toxin coregulated pilus), un facteur de colonisation, puis un phage (CTX $\phi$ ) portant un gène codant pour la toxine cholérique (CTX) (Figure 5). La sous-unité A de la toxine cholérique, après internalisation dans les cellules intestinales provoque un maintien de l'activité de l'enzyme adénylate cyclase qui convertit l'ATP intracellulaire en AMPc (AMP cyclique). La forte teneur en AMPc intracellulaire en résultant entraîne la sécrétion d'ions et d'eau à partir de cellules intestinales (Collier & Mekalanos, 1980; Gill & Meren, 1978; Mekalanos, 1983). Enfin, l'acquisition d'un dernier îlot de pathogénicité leur apporte des gènes codant des protéines impliquées dans le transport et le catabolisme de l'acide sialique, donnant à ces lignées un avantage compétitif contre les autres bactéries (Almagro-Moreno & Taylor, 2013).

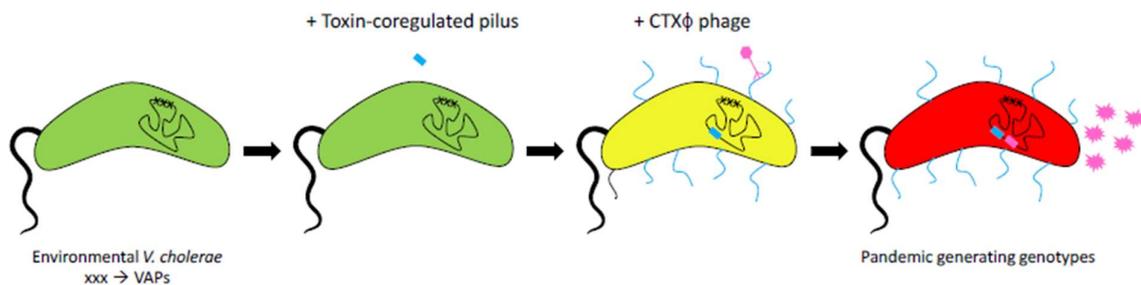


Figure 5 : Représentation schématique de l'émergence et de l'évolution du *V. cholerae* pandémique. Des souches environnementales de *V. cholerae* ont acquis le pilus corégulé par la toxine et la toxine cholérique via HGT. Ces événements HGT conduisent à l'émergence du groupe pandémique clonal (James, 2018)

Au cours du 20<sup>e</sup> siècle, le variant "El Tor" est apparu et a provoqué la 7<sup>e</sup> pandémie, qui a commencé en 1961. Les souches pandémiques El Tor, dont une sous-variante avec un polysaccharide de surface O139, correspondent également à une lignée monophylétique, L2, qui est étroitement liée à d'autres lignées du choléra pandémique, mais se regroupe dans une branche phylogénétique distincte (Didelot et al., 2015). La septième pandémie continue d'être

une menace majeure pour la santé publique de 175 pays d'Asie, d'Afrique et d'Amériques (Baker-Austin et al., 2018).

Compte-tenu de la diversité d'habitats que les vibrios peuvent occuper, elles doivent être capables de s'adapter à des changements ou des stress comme une limitation en nutriments, des températures fluctuantes, de la prédation par les protozoaires, des infections virales, des variations de salinité, et donc d'adapter leurs réponses à ces stress environnementaux. L'un des mécanismes de régulation permettant l'adaptation aux stress est la détection de quorum ou « quorum sensing ». Il s'agit de la régulation de l'expression de gènes en réponse à des fluctuations des densités de population. Plusieurs mécanismes sont régulés ainsi, comme la virulence mais aussi la formation de biofilms, la motilité, impliqués dans la réponse aux stress environnementaux (Miller & Bassler, 2001). Chez *V. vulnificus* et *V. angustum*, deux espèces marines, le quorum sensing permet de détecter une limitation en ressources nutritionnelles (McDougald et al., 2003).

### 3.2. Facteurs environnementaux favorisant l'émergence d'agents pathogènes en aquaculture

Les zones côtières représentent des espaces de plus en plus densément peuplées, mais également favorables au développement d'activités récréatives (tourisme, activités nautiques), ou à l'installation d'infrastructures industrielles. C'est aussi en zones côtières que l'aquaculture est majoritairement pratiquée (FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010). Cependant, la population croissante et le développement économique augmentent les menaces sur les écosystèmes de ces zones, en particulier parce que les activités anthropiques modifient les apports en nutriments et favorisent l'augmentation des concentrations en polluants dans les eaux (Ansari et al., 2003; Tornero & Hanke, 2016). Les estuaires sont particulièrement impactés puisqu'ils recueillent également les contaminants transportés depuis les bassins versants jusque dans les fleuves et enfin, aux embouchures (Kennish, 2002). Ces espaces sont donc soumis à de nombreuses pressions anthropiques, et sont influencés par une vaste gamme de facteurs biotiques et abiotiques. Par exemple, l'arrivée d'eaux riches en contaminants et en nutriments par les fleuves ou directement depuis la côte (eaux pluviales, eaux usées) peut affecter la gestion de l'aquaculture.

L'émergence et la réémergence des maladies infectieuses est liée à des perturbations des relations entre les hôtes, les agents pathogènes et l'environnement (Engering et al., 2013). De nombreux facteurs biotiques et abiotiques peuvent perturber ces relations. Dans le paragraphe suivant, plusieurs facteurs agissant dans les écosystèmes côtiers seront explorés.

### 3.2.1. Facteurs abiotiques

Les pressions anthropiques, comme les contaminations chimiques, de même que les conséquences des changements globaux, comme l'acidification, l'augmentation de température, les variations de salinité, de teneur en oxygène des eaux côtières sont autant de facteurs pouvant favoriser l'émergence et la diffusion d'organismes pathogènes.

Parmi les contaminants chimiques, les antibiotiques sont largement utilisés en élevage, en aquaculture et dans les traitements d'infections humaines, et se sont répandus sur l'ensemble de la planète (Davies & Davies, 2010), induisant la sélection de souches bactériennes résistantes à ces produits. L'aquaculture apparaît donc fortement liée à cette problématique de résistance aux antibiotiques : elle peut à la fois favoriser l'apparition de bactéries résistantes, puisqu'elle pourrait être le siège d'échanges génétiques entre les bactéries de sa flore, mais elle peut également en pâtir et subir les conséquences de bactéries pathogènes ayant acquis des gènes de résistance, parfois accompagnés de gènes de virulence. Par exemple, en salmoniculture, *Piscirickettsia salmonis* est une bactérie responsable de mortalités majeures en Norvège et au Chili contre laquelle les traitements antibiotiques sont devenus inefficaces (Cabello, 2006; Rozas & Enríquez, 2014).

Un autre exemple de pollution affectant l'aquaculture est le microplastique. L'usage de matières plastiques s'est généralisé dans la plupart des domaines, générant une pollution visible mais également une pollution par les microparticules de plastiques (Lavers & Bond, 2017). En plus des nombreux effets directs sur la santé des écosystèmes induits par cette pollution (Loiseau & Sorci, 2022), les particules microplastiques sont colonisées par une flore microbienne pouvant être différente de celle de l'environnement dans lequel elle se trouve (Foulon et al., 2016; Zettler et al., 2013). Ces particules peuvent donc jouer un rôle dans la propagation d'organismes pathogènes (Loiseau & Sorci, 2022).

Les environnements côtiers sont également très impactés par la pollution aux métaux lourds, ces composés étant relativement stables et ayant donc tendance à s'accumuler (H. Li et al., 2017). Selon l'Agence Européenne pour l'Environnement (EEA), 75 à 96% des mers européennes sont contaminées par des niveaux élevés de métaux lourds (European Environment Agency., 2019). Par exemple, le cuivre, utilisé dans de nombreux procédés industriels mais également en agriculture comme pesticide (Kiaune & Singhasemanon, 2011; Tamm et al., 2022), peut être lessivé et contaminer les eaux côtières (Kiaune & Singhasemanon, 2011). Il est également utilisé dans les peintures anti-salissure, dont bon nombre de coques de bateaux sont recouvertes (Claisse & Alzieu, 1993; Kiaune & Singhasemanon, 2011) et contamine directement l'eau de mer.

Bien que le cuivre soit un métal essentiel, les sources anthropiques de cuivre représentent une menace, notamment pour la faune marine littorale qui peut le bioaccumuler jusqu'à des niveaux toxiques (Figure 6).

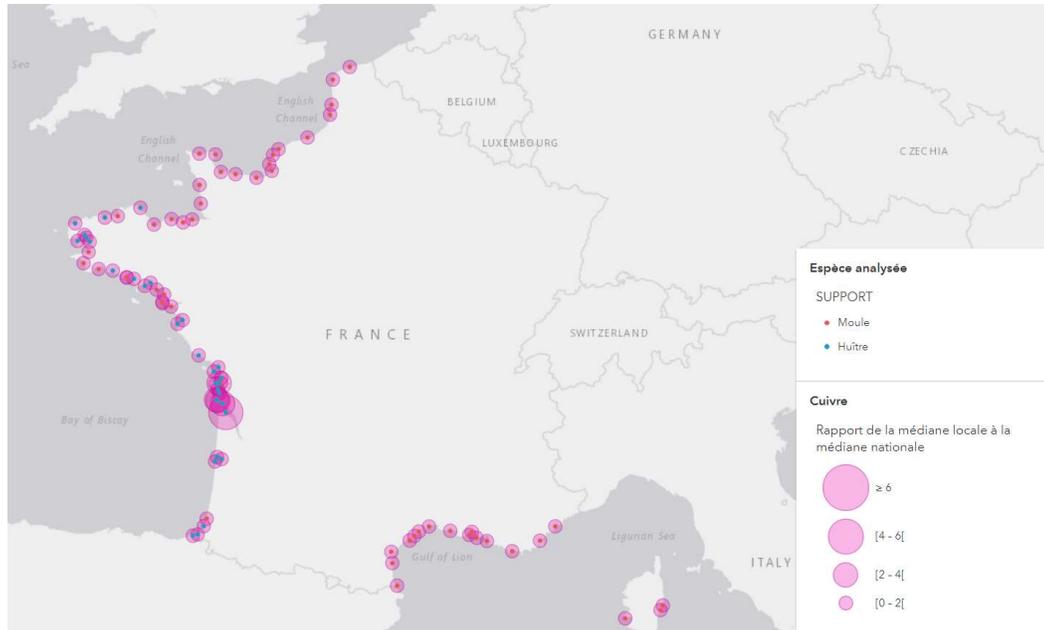


Figure 6 : Comparaison de la médiane locale 2003-2007 à la médiane nationale des concentrations en cuivre dans la chair des moules et des huîtres. Plus un point est gros plus les teneurs sont élevées par rapport à la valeur de la médiane nationale. Pour les moules, la médiane nationale est de 6,3 mg/kg. Pour les huîtres, elle est de 206 mg/kg (Données IFREMER : <https://www.ifremer.fr/envliit/Outils-de-synthese/Les-contaminants-chimiques-dans-les-huîtres-et-les-moules-du-littoral-français>, consulté le 16/07/22).

De plus, la contamination en cuivre de l'environnement peut favoriser l'émergence d'agents pathogènes. Son implication dans l'émergence de bactéries pathogènes de cultures terrestres est largement documentée. Par exemple, *Xanthomonas citri* pv. *citri*, un agent pathogène majeur des agrumes, est porteur d'une résistance au cuivre codée par un plasmide en réponse à la pression de sélection induite par le cuivre (Richard et al., 2017). Mais la résistance au cuivre a également été observée au sein de l'espèce bactérienne marine *V. tasmaniensis*, qui contient des souches pathogènes d'huîtres. L'une d'entre elle, LGP32, utilise un système d'efflux du cuivre pour survivre dans les hémocytes (cellules immunitaires) des huîtres, des environnements riches en cuivre. La sélection de ces traits de résistance pourrait provenir de l'interactions de certains vibrios avec des niches environnementales riches en cuivre, y compris les invertébrés marins, qui favorisent l'émergence de vibrios pathogènes résistants à la destruction intraphagosomale chez les espèces animales (Vanhove et al., 2016).

Parmi les facteurs abiotiques, on peut mentionner également certains paramètres physico-chimiques de l'environnement littoral, susceptibles d'être perturbés par les changements climatiques globaux : température, pH, oxygène dissous et salinité (Figure 7). Tous ces facteurs modifient l'équilibre hôte-pathogène-environnement (Burge et al., 2014).

Les changements climatiques entraînent une augmentation de la température de la surface de la mer (SST) de manière plus rapide dans les régions littorales que dans les océans mondiaux (Le Roux et al., 2015). Or, cette augmentation de la SST est un facteur favorisant la présence et la viabilité des bactéries, comme celles du genre *Vibrio* dans l'environnement aquatique (Baker-Austin et al., 2013). En effet, une augmentation des taux de croissance de plusieurs espèces de vibrios est associée à une augmentation de la température, comme chez *V. parahaemolyticus* (Kim et al., 2012; Miles et al., 1997), chez *V. vulnificus* (Kim et al., 2012), chez *V. anguillarum* entre 20 et 33°C (Guérin-Faubleé et al., 1995). Une augmentation de température peut aussi perturber la composition de la communauté microbienne associée aux organismes marins. Par exemple, chez les coraux de l'espèce *Pocillopora damicornis* d'Australie, une augmentation de température de 2 à 3°C provoque l'enrichissement de la communauté bactérienne associée en vibrios, et plus particulièrement dans l'espèce *V. coralliilyticus*, qui est pathogène pour les coraux (Tout et al., 2015). La température peut également influencer l'expression de gènes de virulence, comme chez *V. harveyi* (Montánchez et al., 2019) et chez *V. parahaemolyticus* (Gotoh et al., 2010; Mahoney et al., 2010), entraînant une plus forte pathogénicité des bactéries. De plus, les augmentations thermiques extrêmes causent du stress et compromettent le système immunitaire de la plupart des espèces aquatiques, les rendant plus vulnérables aux infections (Dittmar et al., 2014; O'Gorman et al., 2016).

Ensuite, l'augmentation des concentrations de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère augmente les concentrations de CO<sub>2</sub> dans l'océan, provoquant des réactions chimiques qui réduisent le pH de l'océan, un phénomène appelé acidification des océans (Doney et al., 2016). Cette acidification peut modifier la sensibilité des organismes marins aux infections par des agents pathogènes. En particulier, les coraux, qui construisent leur squelette à partir du carbonate de calcium, sont affectés par ce stress, de même que les communautés microbiennes qu'ils hébergent. Chez l'espèce *Acropora eurystoma*, une modification de la communauté bactérienne est observée lors d'essais de diminution du pH en laboratoire, avec un enrichissement en bactéries des familles *Vibrionaceae* et *Alteromonadaceae*, associées à des maladies (Meron et al., 2011). Chez les bivalves aussi, cet effet de l'acidification est observé. Par exemple, chez la moule *Mytilus chilensis*, la diminution du pH en conditions contrôlée est associée à une sensibilité plus importante à l'infection par *V. anguillarum*, liée à une immunomodulation (N. Castillo et al., 2017).

Les modèles climatiques prédisent une baisse globale de la concentration d'oxygène dissous océanique et une expansion conséquente de l'OMZ (oxygen-minimum zone : les couches à faible teneur en oxygène de profondeur intermédiaire) dans des conditions de réchauffement climatique (Matear & Hirst, 2003), les baisses les plus importantes se produisant dans les régions extratropicales (Stramma et al., 2008). Or, l'hypoxie (la disponibilité en oxygène dissous est réduite) et l'anoxie (absence d'oxygène dissous) peuvent fortement affecter la physiologie des organismes marins tels que les bivalves. Par exemple, chez *Chamelea gallina*, un bivalve comestible, le stress anoxique entraîne une altération de plusieurs fonctions immunitaires médiées par les hémocytes, telles que la phagocytose (ou internalisation, par exemple, de micro-organismes) et l'activité lysozyme (Matozzo et al., 2005). Des mortalités massives de bivalves ont été constatées dans plusieurs zones d'élevage ou de pêche pouvant entraîner des diminutions importantes des stocks (Diaz & Rosenberg, 1995).

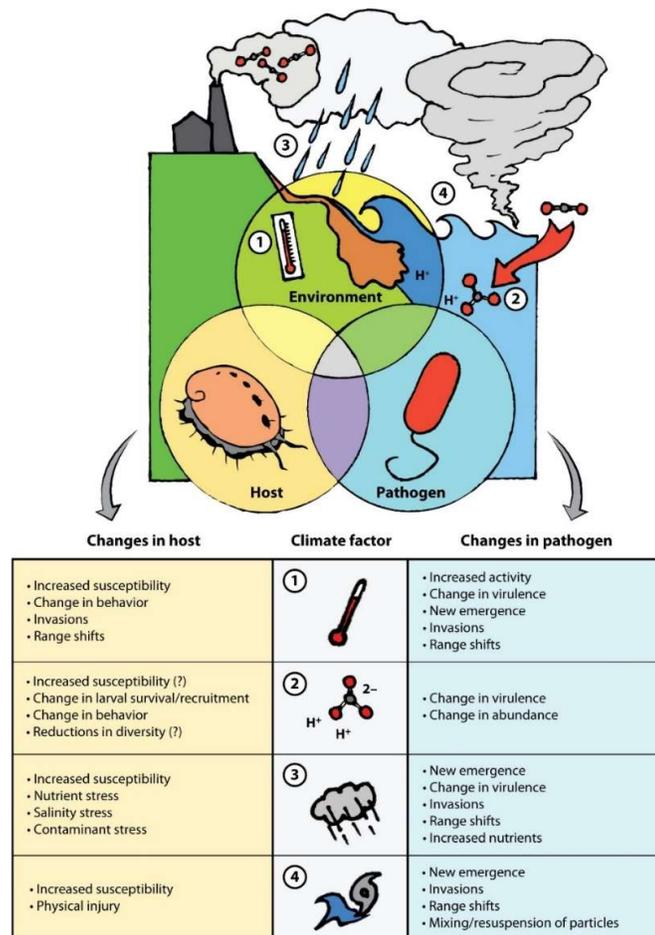


Figure 7 : Impacts du changement climatique sur les relations hôte-pathogène-environnement marin. Le réchauffement climatique entraîne des modifications physiques de l'océan, notamment des changements de température, des augmentations des concentrations de CO<sub>2</sub> / des diminutions du pH, des modifications des précipitations (entraînant des modifications de la salinité) et une exposition aux tempêtes et aux cyclones. Tous ces facteurs modifient l'équilibre hôte-pathogène-environnement (Burge et al., 2014).

En lien avec les changements globaux, l'augmentation projetée de la fréquence des phénomènes météorologiques extrêmes et l'augmentation associée des précipitations (Bender et al., 2010) pourrait réduire la qualité des eaux côtières et océaniques en raison des apports terrestres provenant des événements de ruissellement et de remise en suspension. L'augmentation du ruissellement terrestre entraîne, en plus d'une augmentation de l'apport en contaminants, une réduction transitoire de la salinité. Les changements de conditions environnementales liées aux fortes précipitations et au ruissellement important sont connus pour favoriser l'infection des coraux *Montipora capitata* par des bactéries du genre *Vibrio*. La diminution de la salinité joue un rôle puisqu'il a été observé que l'hyposalinité permet à des souches pathogènes de *V. coralliilyticus* d'infecter les coraux à de plus faibles doses et réduit le temps avant le début de l'infection (Shore-Maggio et al., 2018).

Ainsi un ensemble de facteurs abiotiques influence l'émergence et l'occurrence de bactéries pathogènes en milieu marin, et doit être considéré pour mieux appréhender les maladies engendrées.

### 3.2.2. Facteurs biotiques

Parmi les facteurs biotiques capables de perturber les relations entre les hôtes, les agents pathogènes et l'environnement en milieu aquatique, les prédateurs des espèces bactériennes occupent une place importante.

Il faut avant tout mentionner les virus bactériophages (aussi appelés phages) pour leur rôle de prédation et donc de contrôle des populations bactériennes, un rôle qu'ils partagent avec certains protozoaires (Brüssow, 2007), c'est-à-dire des eucaryotes ciliés ou flagellés hétérotrophes (Pernthaler, 2005). Il a été estimé que les phages et les protozoaires lysent chacun environ 20% de la biomasse bactérienne chaque jour (Brüssow, 2007; Fuhrman & Noble, 1995). Les bactéries ainsi soumises à la prédation par les phages et par les protistes et ont donc dû mettre en place des systèmes de défense contre ces deux prédateurs.

Il peut arriver que des systèmes anti-prédation, impliqués dans la défense contre les protistes eucaryotes, soient associés à la virulence des bactéries envers des hôtes multicellulaires. Les protistes se nourrissent de bactéries par phagocytose, un mécanisme très ancien et retrouvé tout au long de l'arbre du vivant, comme chez les macrophages humains ou chez les hémocytes d'invertébrés, pour lesquels il est associé à la défense immunitaire plutôt qu'à la nutrition

cellulaire. Ainsi, la résistance des bactéries à la prédation par les protistes peut permettre d'échapper aux défenses immunitaires des hôtes multicellulaires. Ce mécanisme a été décrit dans l'interaction entre *V. tasmaniensis*, les amibes et les cellules immunitaires des huîtres *Crassostrea gigas*. En effet, une souche *V. tasmaniensis* (LGP32) résiste à la phagocytose des hémocytes d'huîtres grâce à certains facteurs de virulence (la métalloprotase Vsm et la pompe d'efflux du cuivre CopA) qui permettent sa survie à l'intérieur des hémocytes (Rubio et al., 2019; Vanhove et al., 2016). Ces mêmes facteurs sont impliqués dans la résistance de cette souche au broutage (grazing) par l'amibe *Vanella* sp. AP1411 (Robino et al., 2019).

Inversement, il a été observé que les bactéries pouvaient acquérir une résistance à la prédation par les phages, mais que cela était associé à une réduction de leur virulence. Par exemple, Castillo et ses collaborateurs ont observé que des souches de *Flavobacterium psychrophilum*, une bactérie pathogène pour des poissons, étaient devenues résistantes à l'infection par des phages grâce à l'apparition de mutations dans des gènes codant des protéines liées aux propriétés de la surface cellulaire, à la motilité et à la biosynthèse des lipopolysaccharides et de la paroi cellulaire. Néanmoins, ces mutations conféraient un phénotype moins virulent envers les poissons à ces souches (D. Castillo et al., 2015). La réduction de virulence des bactéries associée à la résistance aux phages s'explique par le fait que les bactériophages utilisent des structures présentes à la surface de la cellule bactérienne comme récepteur. Ces structures sont aussi des facteurs de virulence. Ainsi, des mutations rendent à la fois ces structures inopérantes comme récepteurs pour les phages mais aussi comme facteurs de virulence (León & Bastías, 2015). Un compromis similaire entre résistance à la prédation amibienne et virulence chez l'huître a été identifié chez des souches de l'espèce *V. splendidus* (Oyanedel et al., 2020). En effet, Oyanedel et ses collaborateurs ont observé que la structure de l'antigène-O (partie externe des lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif) de souches de *V. splendidus* étaient le produit d'un compromis entre la résistance à la prédation amibienne et la résistance aux défenses immunitaires de l'huître.

Au-delà de leur rôle en tant que prédateurs, les phages sont bien connus pour fournir du matériel génétique aux bactéries, et notamment des gènes de virulence, comme chez *V. cholerae*, dont la virulence repose en grande partie sur le matériel génétique du phage CTX (partie 3.1). Plus généralement, les phages sont un moteur de diversité génétique dans les populations bactériennes grâce aux transferts horizontaux par transversion (Harrison & Brockhurst, 2017) (Encadré 1).

Enfin, au sein de ces communautés, les populations bactériennes rivalisent pour l'espace et les ressources (Hibbing et al., 2010). Une capacité de compétition élevée peut être associée à la

virulence, comme chez la bactérie pathogène de poisson *Flavobacterium columnare*, qui connaît une virulence élevée à des échelles de temps courtes, de même qu'une capacité accrue de compétition (Sundberg et al., 2016). Chez les bactéries à Gram négatif, la compétition pour l'occupation de niches repose, par exemple, sur le système de sécrétion de type 6 (T6SS) qui leur permet de délivrer des protéines effectrices toxiques dans les cellules bactériennes ou hôte adjacentes (Salomon et al., 2015). Par exemple, il a été observé que le T6SS de *V. cholerae* lui apporte des capacités de compétitions plus élevées contre les bactéries *E. coli* présentes dans l'intestin de souris, ce qui lui permet de s'installer dans cet environnement. Il en résulte une réponse immunitaire inflammatoire plus forte, provoquant des symptômes plus violents (Zhao et al., 2018).

### 3.2.3. En conchyliculture

En France et en Europe, la conchyliculture (culture de coquillages) repose essentiellement sur l'exploitation de l'huître creuse (ostréiculture), de la moule (mytiliculture) puis des coques (cérastoculture) et des palourdes (vénériculture).

L'ostréiculture est pratiquée sur l'ensemble des littoraux français : Normandie (19,5% de la production), Bretagne (30%), Charente Maritime (24%), Arcachon (8,5%) et la Méditerranée (8,5%) (Robert et al., 2013). Elle repose presque exclusivement sur l'élevage de l'espèce *Crassostrea gigas*, qui fait partie des mollusques bivalves, plus précisément de la sous-classe des ptériomorphes qui contient également les moules bleues (*Mytilus sp.*) et les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*). Les huîtres *C. gigas* occupent 93% du marché ostréicole mondial et 98% du marché français. La production annuelle française est estimée à 130 000 tonnes (comité national de la conchyliculture, [coquillages.com/les-statistiques](http://coquillages.com/les-statistiques)). Selon la zone de production, la technique d'élevage, le type de larves utilisées, la culture d'une huître s'étale sur 2 à 4 ans. La plupart des larves proviennent du captage naturel (essentiellement en Charente-Maritime et dans le Bassin d'Arcachon) grâce à des collecteurs permettant leur fixation (Figure 9). La larve connaît d'abord une phase planctonique (Figure 8). Elle dispose alors d'un velum (ou voile) qui permet son déplacement au grés des courants marins, ainsi que sa nutrition par captation du phytoplancton en suspension dans la colonne d'eau (Figure 8) (Fabioux, 2004). Elle est alors appelée larve véligère. Puis, pendant quelques jours, chez la larve dite pédivéligère, un pied se développe, qui va aider à sa fixation sur un support. Après la fixation, une métamorphose a lieu au cours de laquelle le pied et le velum régressent alors que les branchies et les palpes labiaux se développent et prennent le relais pour la nutrition. Il s'agit d'un animal suspensivore, qui va donc capter sa nourriture en suspension dans l'eau grâce à ces organes.

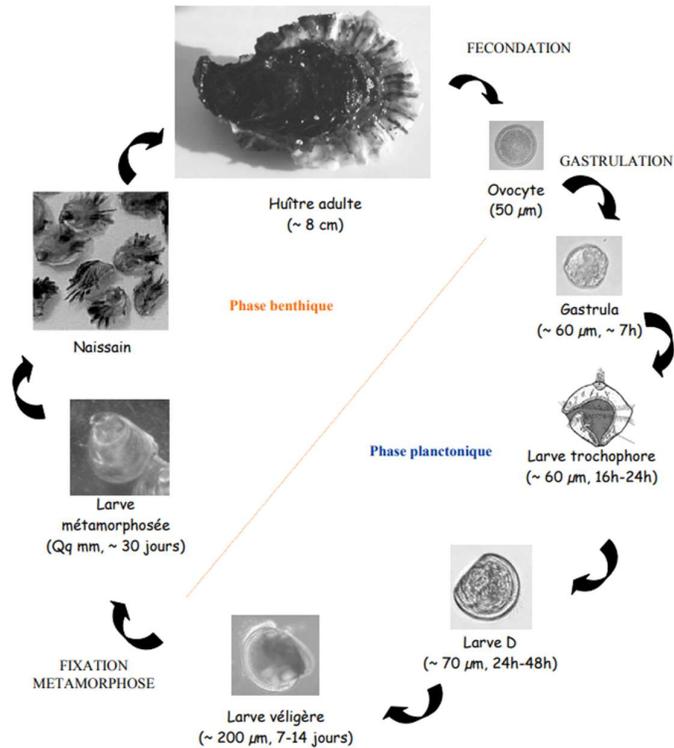


Figure 8 : Cycle de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Fabioux, 2004)

Quelques mois après la fixation de la larve, qui est alors appelé naissain, ceux-ci sont détachés par vibration du collecteur. Cette opération dite de détroquage permet la suite de l'élevage en poches (Figure 9) ou sur cordes selon la région (Legué & Prou, 2012).



Figure 9 : A gauche, collecteurs en plastique utilisés pour le captage des larves d'huîtres. A droite, sur l'estran, poches d'huîtres alignées sur des tables recouvertes à marée haute. Extraits de (Legué & Prou, 2012), photographie de Jean Prou.

L'histoire de l'ostréiculture est marquée par plusieurs épidémies, depuis les débuts de cette activité au XIX<sup>e</sup> siècle, alors qu'elle reposait complètement sur l'espèce indigène, l'huître plate *Ostrea edulis*. En effet, l'huître plate a été impactée par des parasites tels que *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae*, qui, avec la surpêche, ont entraîné un déclin des populations et des

extinctions locales (Pernet et al., 2016). En France, *O. edulis* a été remplacée par l'huître portugaise *Crassostrea angulata* en 1925, mais cette espèce a été décimée par une maladie causée par un iridovirus dans les années 70 (Comps & Duthoit, 1979). Puis l'huître creuse *Crassostrea gigas*, originaire du Japon, a été introduite dans plusieurs pays européens au cours des années 1960 et 1970 et elle s'est bien établie le long de la côte nord-ouest de l'Europe où elle est souvent considérée comme invasive (Lodge, 1993; Troost, 2010). Mais actuellement, *C. gigas* est impactée par deux principales maladies. Une maladie d'origine polymicrobienne, appelée POMS (Pacific oyster mortality syndrome) affecte préférentiellement le naissain et une maladie d'origine bactérienne, liée à la bactérie *V. aestuarianus* affecte plutôt les adultes. Ces maladies seront décrites respectivement dans le paragraphe 3.3.2 et dans la partie 4.

L'ostréiculture accumule plusieurs conditions favorables à l'émergence de maladies infectieuses. Elle est pratiquée dans des espaces riches en micro-organismes et en tant qu'organisme filtreur, les huîtres sont en contact avec des micro-organismes potentiellement pathogènes (Schmitt et al., 2012). Ensuite, elle est généralement pratiquée de manière intensive, avec des densités de population bien plus importantes que dans les populations sauvages, fournissant à un agent pathogène une grande quantité d'hôtes potentiels à infecter, et favorisant la transmission entre individus et donc la survenue d'épidémies à grande échelle (Pernet et al., 2012; C. Rodgers et al., 2019). Comme chez de nombreuses espèces d'élevage (Tisdell, 2003), la domestication a mené à une perte de diversité génétique chez les huîtres d'élevage (Appleyard & Ward, 2006; Meistertzheim et al., 2013), ce qui peut réduire sa plasticité phénotypique en réponse à l'émergence d'une nouvelle maladie. Enfin, le transport d'animaux vivants entre régions, voire entre pays, est une pratique courante. Par exemple, les huîtres d'Arcachon et de Charente-Maritime sont emmenées en camion vers les eaux bretonnes et normandes où elles vont engraisser, puis retournent dans le bassin d'Arcachon, ou en Charente-Maritime (Legué & Prou, 2012). Or les animaux transportés ne sont pas nécessairement exempts de micro-organismes pathogènes. De plus, la traçabilité de ces échanges n'est que très peu mise en œuvre (Pernet et al., 2016). Les nombreux échanges d'animaux vivants entre fermes aquacoles peuvent faciliter la propagation et l'expansion géographique d'un agent pathogène (C. J. Rodgers et al., 2011). A tous ces facteurs de dispersion d'agents pathogènes en ostréiculture, le stress subi par les animaux, dû aux manipulations dont ils font l'objet, peut être ajouté. En effet, il a été prouvé expérimentalement que la mortalité d'huîtres soumises à un stress mécanique pendant 15 minutes après avoir été injectées avec une faible dose (100 bactéries / animal) d'une souche de *V. splendidus* isolé d'huîtres juvéniles affectées par les mortalités estivales était plus importante que celle d'huîtres seulement injectées avec la bactérie (Lacoste, Jalabert, Malham, Cueff, & Poulet, 2001). D'autres facteurs comme la ploïdie ont pu être avancés comme influençant la sensibilité des huîtres aux pathogènes. Les huîtres triploïdes sont apparues plus sensibles à

certaines agents pathogènes (Azéma et al., 2016; De Decker et al., 2011) bien qu'elles n'allouent pas de ressources à la reproduction, le statut reproductif étant pourtant reconnu comme augmentant la sensibilité des organismes (Huvet et al., 2010).

En France, l'exploitation des coques *Cerastoderma edule* est pratiquée à moins grande échelle que l'ostréiculture, essentiellement en Loire-Atlantique et en baie de Somme. La Loire-Atlantique est une région d'élevage, avec un approvisionnement en juvéniles à partir des récoltes effectuées par dragage dans la baie de la Vilaine, puis semis de ces juvéniles, et récolte après 2 ans de croissance. Elle produit annuellement 1200 à 2000 tonnes (Haure et al., 2004). La baie de Somme est un site important de pêche à pied au niveau des gisements naturels avec une production annuelle moyenne de 3000 tonnes (Bellamy et al., 2009). *C. edule* est un mollusque bivalve, faisant partie de la sous-classe des Hétérodontes, et de la famille des Veneroidae, dans laquelle on trouve également la palourde (genre *Ruditapes*). L'aire de répartition de la coque est étendue des littoraux de la mer du Nord jusqu'aux côtes du Sénégal. Elle est aussi présente en Méditerranée, en mer Noire et en mer Caspienne (Figure 10) (Bellamy et al., 2009). Dans certaines régions, comme la baie de Somme en France ou Ria de Aveiro au Portugal, la coque représente une source d'emplois pour les pêcheurs locaux et donc une source de revenus non négligeable (Lesueur, 2014; Maia et al., 2021).



Figure 10 : Aire de répartition de la coque *C. edule*.  
Données GBIF (Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org/> consulté le 1<sup>er</sup> août 2022).

*C. edule* est principalement pêchée dans les vasières et les eaux peu profondes par des pêcheurs à pied équipés d'outils de pêche simples tels que des râteaux ou des dragues à main. Elle vit enfouie juste sous la surface dans des fonds de sable propre, de sable boueux, de boue ou de gravier boueux et on la trouve couramment dans les plaines intertidales et les zones subtidales peu profondes des estuaires, des lagunes côtières et des baies côtières abritées (Gam et al.,

2010; Kater et al., 2006). Chez les coques, la libération des gamètes a lieu entre mai et août (Malham et al., 2012). Elle peut avoir lieu, soit une seule fois, soit de manière polycyclique sans période de repos. Tout comme chez l'huître creuse, la fécondation est externe et les larves sont pélagiques et équipées d'un velum puis se sédentarisent mais sans fixation sur un substrat. Elles subissent alors une métamorphose vers l'état de juvénile, puis d'adulte.

Contrairement à l'ostréiculture, la cérastoculture, notamment en baie de Somme, n'est associée ni à des densités de populations élevées ni à des transferts d'animaux vivants. Cependant, les coques sont soumises à des épisodes de mortalité liés à plusieurs facteurs comme l'anoxie ou la température. L'anoxie eut affecter directement les animaux ou favoriser la prolifération de bactéries anaérobies, potentiellement pathogènes pour les bivalves (Coffin et al., 2021). De plus, les coques vivent dans un milieu riche en microorganismes, le sédiment et leur alimentation en tant que filtreur suspensivore les met en contact avec de nombreux micro-organismes. Elles sont affectées par plusieurs parasites comme le trématode *Gymnophallus choledochus* et le protozoaire *Marteilia cochillia* (Longshaw & Malham, 2013). Elle sont également impactées par une néoplasie transmissible (Carballal et al., 2015; Ujvari et al., 2017). De plus, depuis 2012, des mortalités liées à la bactérie *V. aestuarianus* ont été observées chez ce bivalve dans le nord de la France (François et al., 2013).

### 3.3. Exemples d'émergences de vibrios pathogènes en aquaculture

Les maladies liées aux bactéries du genre *Vibrio* affectent la culture d'animaux marins de manière répétée, causant des diminutions de production et des pertes économiques importantes (Travers et al., 2015). Les bactéries appartenant au clade Splendidus, Harveyi ou aux espèces *V. aestuarianus*, *V. nigripulchritudo*, *V. tubiashii*, *V. coralliilyticus* et *V. tapetis* sont fréquemment signalées en association avec des événements de mortalité de bivalves en écloserie ou dans les parcs conchylicoles (Travers et al., 2015). Les processus menant à l'émergence de souches pathogènes dans ces groupes ont pu être déchiffrés dans seulement quelques cas, dont *V. nigripulchritudo* et dans le clade Splendidus.

#### 3.3.1. *V. nigripulchritudo*, bactérie pathogène primaire de la crevette en Nouvelle-Calédonie

En Nouvelle-Calédonie, la culture de la crevette repose sur l'espèce *Penaeus stylirostris*, qui est affectée par une vibriose hivernale appelée Syndrome 93, depuis 1993, associée à l'espèce *V. penaeicida* (Costa et al., 1998). Un autre *Vibrio*, *V. nigripulchritudo* est associée à une vibriose estivale depuis 1997, appelée syndrome estival (Goarant et al., 2006). Il a été observé que les souches de *V. nigripulchritudo* se répartissent dans trois clades distincts (A, B et M), chacun de

ces clades regroupant des souches plus ou moins virulentes (Goarant et al., 2006; Goudenège et al., 2013) (Figure 11).

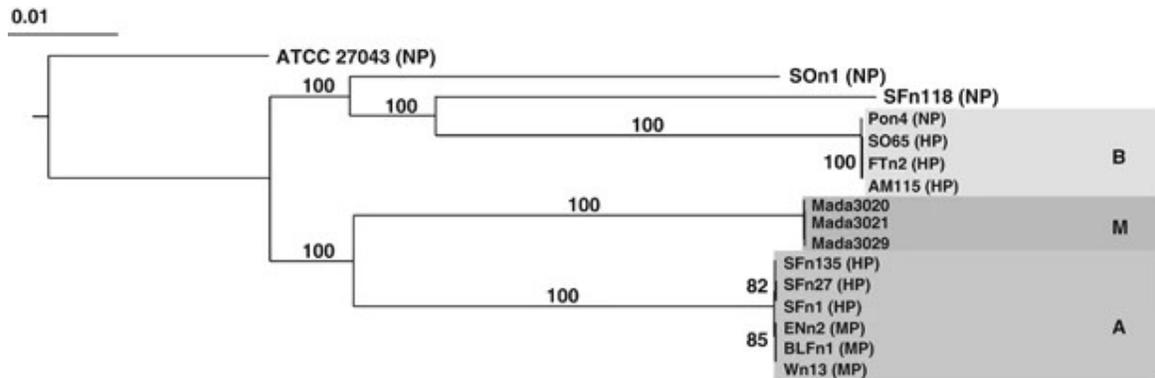


Figure 11 : Analyse phylogénétique de 16 souches de *V. nigrapulchritudo* (ATCC 27043T comme groupe externe). Le pathotype de chaque souche, lorsqu'elle est testée, est indiqué entre parenthèses (Goudenège et al., 2013). HP : hautement pathogène, MP : moyennement pathogène, NP : non pathogène.

Dans chaque clade, la virulence est corrélée à la présence de 1 ou 2 plasmides. Les souches les plus virulentes du clade A contiennent deux plasmides (pASFN1, 250 kb et pBSFN1, 11 kb), la présence des deux plasmides étant nécessaire à un haut niveau de virulence (Le Roux et al., 2011). Les souches les plus virulentes du clade B portent un plasmide (200 kb), qui est absent des souches non virulentes. Un des modules de gènes présent sur ces plasmides, le module HP4 (Figure 12) contient un gène codant une toxine excrétée par la bactérie avec ses produits extracellulaires (ECP), la nigrtoxine, qui contribue à la toxicité des souches les plus virulentes (Goudenège et al., 2013).

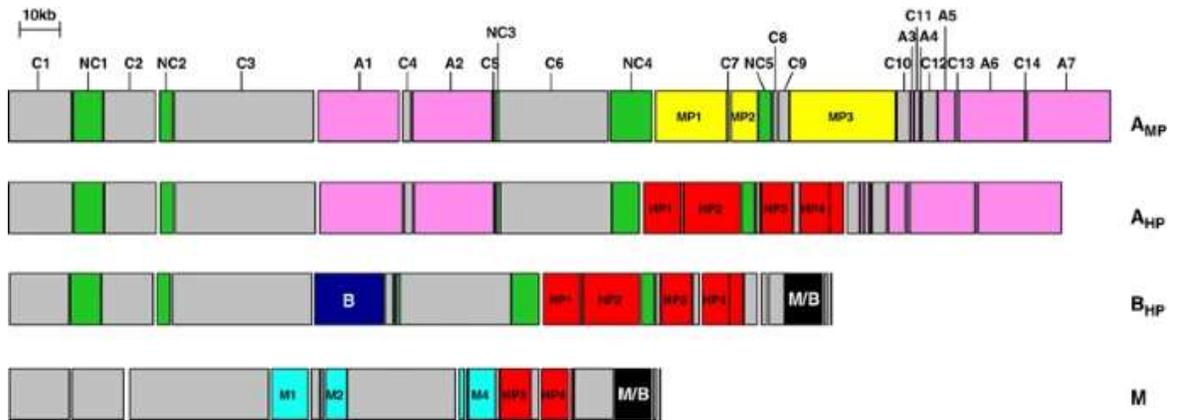


Figure 12 : Diversité plasmidique parmi les différents pathotypes de *V. nigrapulchritudo* (Goudenège et al., 2013).

Ainsi, l'émergence de souches pathogènes chez *V. nigrapulchritudo* semble liée à l'acquisition horizontale de plasmides de virulence.

### 3.3.2. *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae*, bactéries pathogènes opportunistes de l'huître

Depuis 1993, le naissain d'huîtres (larves avant la fixation) est affecté par un syndrome de mortalité estivale, le POMS (Pacific oyster mortality syndrome). L'un des agents responsables de ce syndrome a été identifié en 1994, il s'agit d'un virus de type Herpès appelé OsHV-1 (Ostreid Herpes Virus 1) (Renault et al., 1994). Depuis 2008, et l'apparition d'un nouveau variant, OsHV-1  $\mu$ var, les mortalités liées au POMS se sont accélérées (Martenot et al., 2011; Segarra et al., 2010). Cependant, ce virus n'agit pas seul (Petton et al., 2015). Son action se traduit principalement par une altération de la physiologie des hémocytes des huîtres, rendant ces derniers inefficaces à contrôler le microbiote de l'huître. Cette situation d'immunodépression permet à des bactéries opportunistes de coloniser l'hémolymphe des huîtres, provoquant une dysbiose (altération du microbiote), puis une bactériémie (l'ensemble des tissus est envahi par les bactéries) (Figure 13).

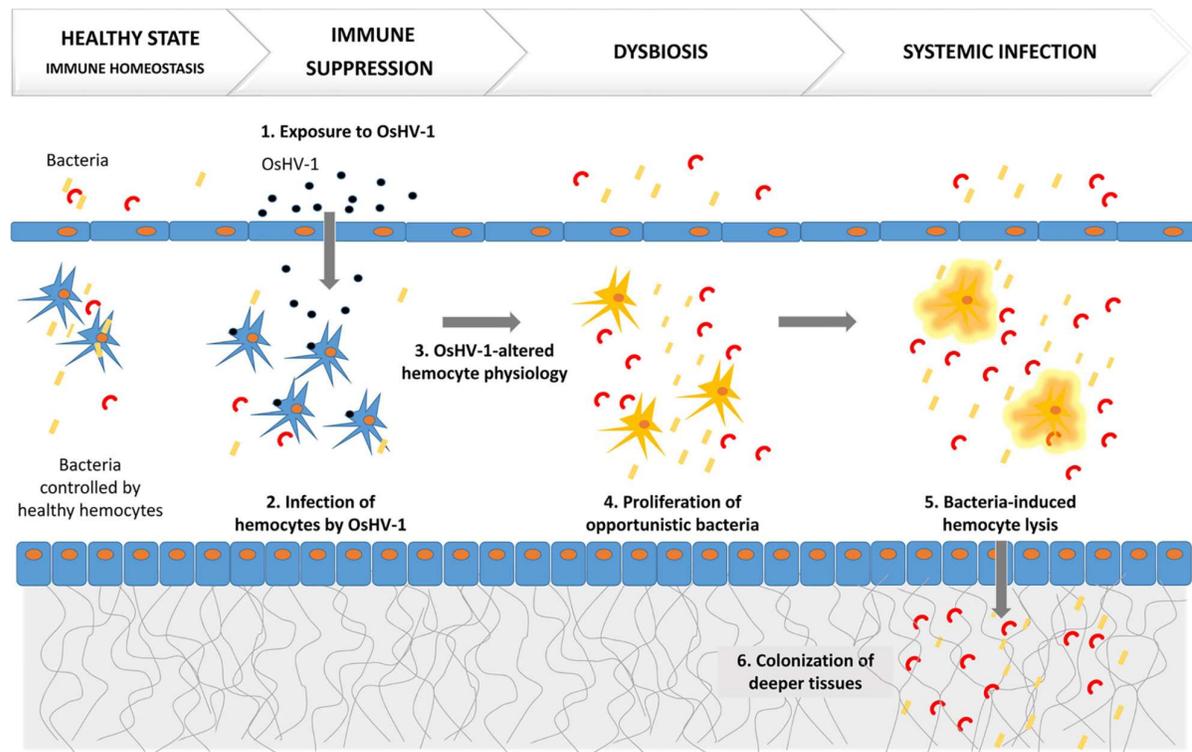


Figure 13 : Les étapes de la pathogenèse du syndrome de mortalité estivale des huîtres du Pacifique (POMS), une maladie polymicrobienne induite par une primo-infection par OsHV-1, qui altère la physiologie des hémocytes. Ceci est suivi d'une bactériémie secondaire qui entraîne la mort des huîtres (Petton et al., 2015).

Parmi les genres bactériens associés au POMS, on compte des vibrios appartenant au clade Splendidus et plus précisément aux espèces *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis* (Bruto et al.,

2018). Dans le clade Splendidus, la virulence envers les huîtres apparaît comme un trait ancestral, qui repose sur deux loci. Le cluster de gènes R5.7/R5.8, qui avait déjà été identifié chez *V. crassostreae* LGP7 (Lemire et al., 2015) est présent dans tout le clade Splendidus. Il semble avoir été acquis de manière ancestrale et par la suite principalement hérité verticalement (Bruto et al., 2018). Le cluster de gènes *rtxABCDEH* code une toxine (MARTX encodée par le gène *rtxA*), une acyltransferase (*rtxC*), une protéine non identifiée (*rtxH*), et un système de sécrétion de type 1 (T1SS) (*rtxBDE*). Les toxines RTX sont des protéines « effectrices » qui sont sécrétées par les bactéries grâce au T1SS, et qui leur permettent de manipuler leur environnement hôte (Gavin & Satchell, 2015). Elles peuvent, par exemple, modifier des processus biologiques tels que la signalisation ou la structure du cytosquelette (Satchell, 2015). Ce cluster de gènes a été perdu par certaines branches de la phylogénie du clade Splendidus, ce qui se traduit par une virulence plus faible envers les huîtres (Bruto et al., 2018).

Chez *V. crassostreae*, la pathogénicité apparaît dépendante de la présence d'un plasmide de virulence mobilisable, pGV1512, qui code des facteurs de virulence, dont des systèmes de sécrétion de type 4 et de type 6 et des gènes impliqués dans l'export du cuivre. L'acquisition de ce plasmide de virulence a transformé une partie de cette population, originellement non pathogène, mais qui possédait néanmoins la capacité de survivre dans l'hémolymphe des huîtres, en agent pathogène opportuniste de l'huître (Bruto et al., 2017).

#### 4. L'espèce bactérienne *Vibrio aestuarianus*, pathogène de bivalve

En France, au début des années 2000, les huîtres sont affectées par des épisodes de mortalité estivale dont quelques-uns, affectant le naissain, ont pu être attribués au virus OsHV-1 et aux *Vibrios* opportunistes (Lipart & Renault, 2002). Pour les autres épisodes de mortalité, l'implication de bactéries du genre *Vibrio*, agissant sans le virus, était suspectée (Lacoste, Jalabert, Malham, Cueff, Gélébart, et al., 2001; Waechter et al., 2002). Finalement, l'isolement des bactéries majoritaires dans l'hémolymphe des huîtres moribondes, puis l'analyse phylogénétique, basée sur la séquence du gène *gyrB*, ont permis d'attribuer certains isolats à l'espèce *V. aestuarianus* (Garnier et al., 2007) (Figure 14).

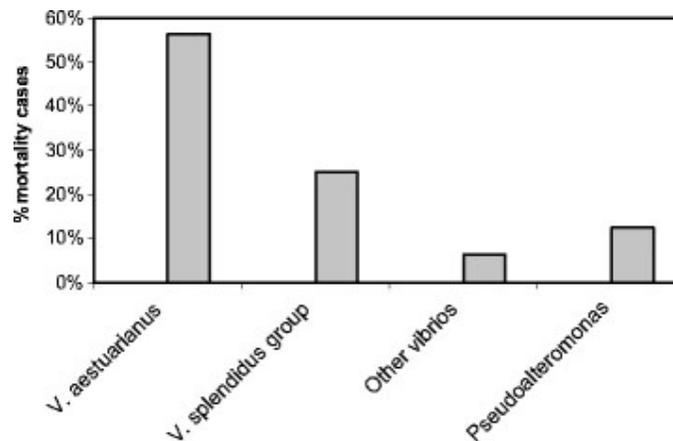


Figure 14 : Fréquence de détection des différentes espèces bactériennes isolées dans l'hémolymphe des huîtres (Garnier et al., 2007). *V. aestuarianus* était l'espèce la plus fréquemment isolée (56%), suivi du groupe *V. splendidus* à 25%, *Pseudoalteromonas* sp. à 12%, et d'autres souches de *Vibrio* (*V. natriegens* et *V. parahaemolyticus*) à 6%

*V. aestuarianus* a été initialement isolée et décrite par Tison et Seidler en 1983, dans l'Oregon, à partir d'échantillons d'eau de mer, d'huîtres, de palourdes et de crabes (Tison & Seidler, 1983). Jusqu'à la réalisation de l'étude de Garnier et ses collaborateurs en 2007 (Garnier et al., 2007), et la réalisation de tests de toxicité par infections expérimentales (Garnier et al., 2008), les bactéries de cette espèce n'étaient pas considérées comme pathogènes. Contrairement aux *Vibrios* pathogènes, qui sont décrits comme opportunistes (Brown et al., 2012), cette bactérie apparaît comme un agent pathogène primaire, capable d'infecter son hôte quelles que soient ses défenses immunitaires. Néanmoins, la sensibilité des huîtres à *V. aestuarianus* varie avec leur âge. En effet, alors que la sensibilité des huîtres au virus OsHV-1 diminue au cours de leur vie, Azéma et ses collaborateurs (Azéma et al., 2017) ont observé que la sensibilité à *V. aestuarianus* augmente (Figure 15).

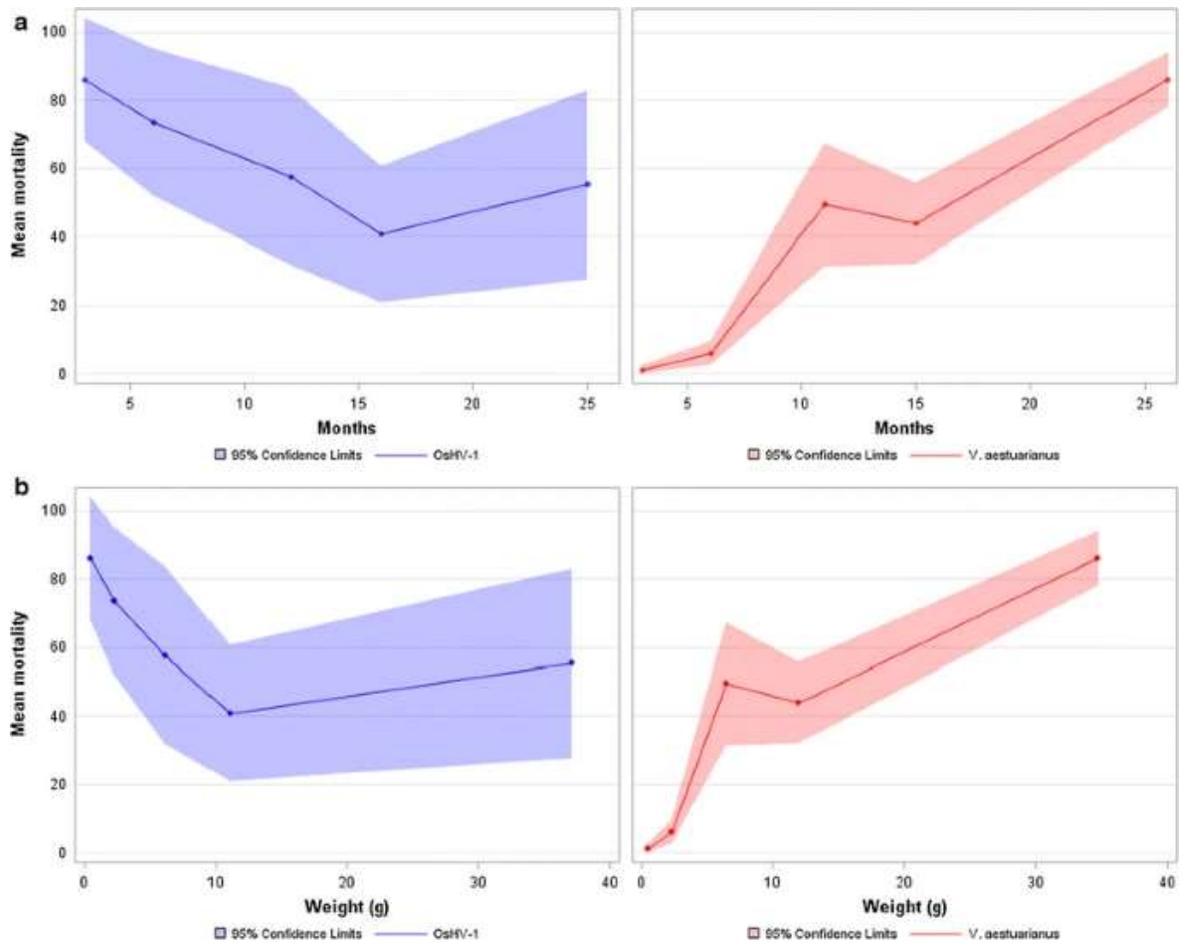


Figure 15 : Pourcentage de mortalité chez des huîtres infectées par OshV-1 (en bleu) et par *V. aestuarianus* (en rouge) dans des conditions de laboratoire, à plusieurs stades de vie. 2 points au stade naissain, 2 points au stade juvénile et 1 point au stade adulte. Les bandes représentent des limites de confiance de 95 %. a : Évolution des sensibilités en fonction de l'âge des animaux, b : évolution des sensibilités en fonction du poids moyen des animaux (Azéma et al., 2017).

Comme les génomes des autres espèces de *Vibrio*, le génome de *V. aestuarianus* est composé de deux chromosomes. Le plus grand contient autour de 3 millions de paires de bases et le plus petit, 1,5 millions (Goudenège et al., 2015). L'espèce *V. aestuarianus* est regroupée avec deux espèces contenant des pathogènes des poissons, *V. ordalii* et *V. anguillarum*, dans le clade Anguillarum (Sawabe et al., 2007). La cellule est en forme de bâtonnet droit ou incurvé. Elle est mobile grâce à la présence d'un flagelle polaire. Sa température optimale de croissance se situe autour de 25°C en milieu Zobell (peptone 4 g L<sup>-1</sup>, extrait de levure 1 g L<sup>-1</sup>, tampon Tris-HCl 0,5 g L<sup>-1</sup>, gélose 15 g L<sup>-1</sup> dans 1 L d'eau de mer artificielle, pH 7,8) même si elle est capable de pousser de 5°C à 37°C.

Les épisodes de mortalité d'huîtres liés à *Vibrio aestuarianus* se sont accélérés depuis 2012, ce qui a laissé supposer l'émergence d'une nouvelle lignée génétiquement différente et plus virulente. Or les analyses des génomes et les infections expérimentales réalisées à partir de nombreuses souches isolées avant et pendant les épisodes de mortalité n'ont pas révélé de

corrélation entre les doses létales, le génotype et la date à laquelle elles ont été isolées (Goudenège et al., 2015).

En 2009, Saulnier et ses collaborateurs ont développé une PCR avec des amorces spécifiques de *V. aestuarianus*, permettant de tester la présence de la bactérie pendant les épisodes de mortalités d'huîtres, et la réalisation de suivis en environnement naturel (Saulnier et al., 2009).

#### 4.1. Diversité au sein de l'espèce *V. aestuarianus*

En 2008, Garnier et ses collaborateurs ont pu différencier les souches isolées en France pendant des mortalités d'huîtres, de la souche type isolée par Tison et Seidler en Oregon sur la base de critères phénotypiques et génétiques (Garnier et al., 2008). Par exemple, les souches françaises, contrairement à la souche type, se sont révélées incapables de pousser sur milieu TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), un milieu sélectif pour les *Vibrio spp.* De plus, elles se différencient par certaines capacités métaboliques, comme l'absence d'utilisation de plusieurs molécules. Ensuite, l'hybridation ADN:ADN entre une souche isolée pendant des mortalités d'huîtres (01/032, isolée en 2001, à partir d'huîtres issues de l'écloserie expérimentale Ifremer à Argenton) et la souche type d'une part, et les autres souches isolées pendant des mortalités d'huîtres, d'autre part, a montré des niveaux d'hybridation différents : respectivement 61% et entre 81 et 100%. Enfin, la virulence de la souche type pouvait être considérée comme négligeable alors que la plupart des souches isolées pendant des mortalités d'huîtres étaient moyennement à fortement virulentes lors de tests par injection. C'est ainsi que les souches françaises ont été attribuées à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* alors que la souche type appartient à la sous-espèce *V. aestuarianus aestuarianus* (Garnier et al., 2008).

Mais, si une certaine diversité génétique existe au sein de l'espèce *V. aestuarianus*, celle-ci s'est révélée limitée, à l'intérieur de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, à l'existence de deux lignées virulentes, A et B (Figure 16), ces deux lignées étant très proches (Identité moyenne des nucléotides (ANI) >98,4%). Au sein de chaque lignée, la diversité génétique est très faible (ANI >99%) (Goudenège et al., 2015).

0.01

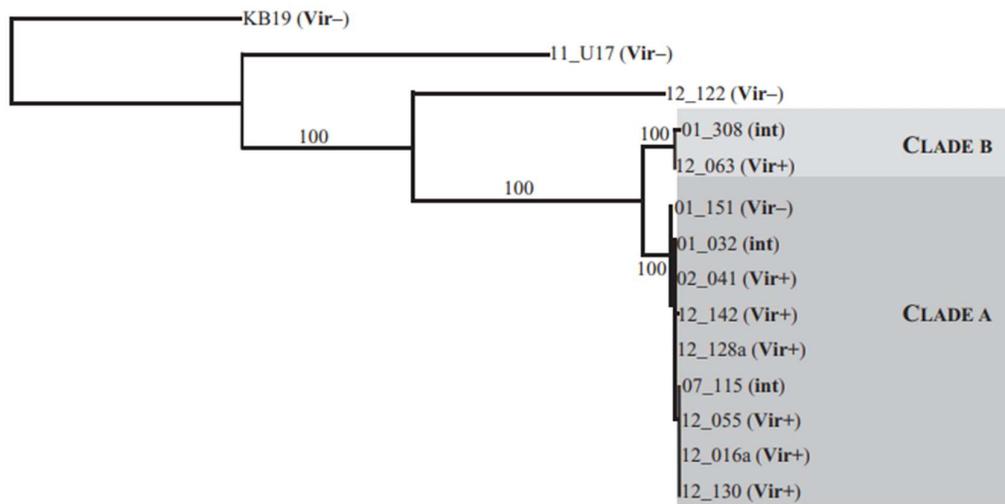


Figure 16 : Analyse phylogénétique basée sur l'alignement concaténé des séquences nucléotidiques de 2866 gènes communs à 14 souches de *V. aestuarianus*.

Les souches constituant les clades A et B ont été isolées pendant des épisodes de mortalités d'huîtres alors que les autres souches ont été isolées sur des sites exempts de mortalités d'huîtres (Goudenège et al., 2015).

Néanmoins, l'estimation de la diversité dans l'espèce *V. aestuarianus* repose principalement sur des isolats collectés lors d'événements de mortalité d'huîtres en France. Les quelques souches non virulentes étudiées (isolées du zooplancton en Italie, des coques en France et des huîtres saines en Espagne) se sont révélées plus diversifiées (Goudenège et al., 2015) suggérant que la diversité des isolats environnementaux est supérieure à celle des souches capables de provoquer la maladie des huîtres (Barbosa Solomieu et al., 2015).

#### 4.2. Préférences écologiques de *V. aestuarianus*

Les préférences écologiques de *V. aestuarianus* ont été investiguées afin de mieux comprendre son cycle. Ces études ont porté sur des souches pathogènes pour les huîtres, appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Les préférences écologiques des souches n'appartenant pas à cette sous-espèce sont restées jusqu'ici peu étudiées.

Tout d'abord, les souches étudiées ont montré une faible persistance dans l'eau de mer, quelle que soit la température et la salinité (Garnier et al., 2008; Vezzulli et al., 2015). Ceci est en accord avec les études écologiques qui n'ont détecté que sporadiquement sa présence dans l'eau de mer, sans aucune corrélation avec la température et la salinité (Vezzulli et al., 2015). Cependant, les conditions permissives au développement de la maladie des huîtres causée par *V. aestuarianus* apparaissent en été (Barbosa Solomieu et al., 2015) suggérant un lien avec la température (Vezzulli et al., 2015).

Lors du suivi d'un épisode de mortalité dans une claire ostréicole (bassin d'affinage), plusieurs compartiments ont été échantillonnés : huîtres, sédiments et différentes tailles de particules en suspension dans la colonne d'eau. Ce suivi s'est poursuivi pendant 15 semaines après le début des mortalités. Pendant l'épisode de mortalités, *V. aestuarianus* est apparue plutôt associée aux huîtres. En effet, elle n'a été détectée qu'en très faibles concentrations dans les autres « compartiments » de cet environnement (Parizadeh et al., 2018) (Figure 17). De manière intéressante, elle est restée présente dans les huîtres en concentration faible alors que l'épisode de mortalité était terminé. Ce résultat a permis d'identifier les huîtres comme le réservoir principal des souches pathogènes de *V. aestuarianus*, plutôt que le sédiment comme cela avait été suggéré (Azandégbé et al., 2010).

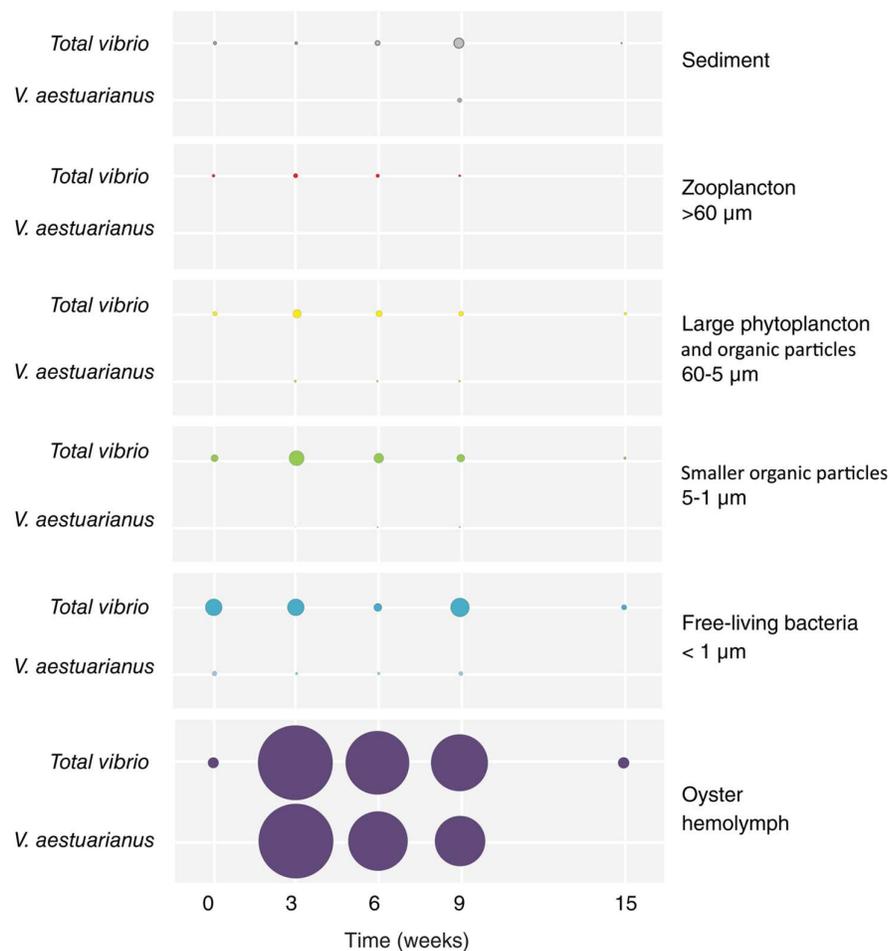


Figure 17 : Quantification de *V. aestuarianus* et de l'ADN *Vibrio* total par qPCR (axe y) dans les sédiments (gris), fractions d'eau de mer (rouge, zooplancton ; jaune, gros phytoplancton et particules organiques ; vert, particules organiques plus petites ; bleu, cellules bactériennes libres) et l'hémolymphe de l'huître (violet, moyenne sur 30 individus).

Les quantifications sont exprimées en unités de génome par g dans le sédiment, par L dans l'eau de mer et par mL dans l'hémolymphe d'huître (Parizadeh et al., 2018).

### 4.3. Interactions entre *V. aestuarianus* et les huîtres

*V. aestuarianus* est connu comme bactérie pathogène pour les huîtres depuis 2001 (Garnier et al., 2007) et pour les coques depuis 2012 (François et al., 2013). Cependant, la pathogénèse chez les coques, de même que l'interaction entre la bactérie et les cellules immunitaires des coques n'ont, actuellement, fait l'objet d'aucune étude, contrairement à la pathogénèse chez les huîtres et les interactions avec les hémocytes des huîtres.

Parmi les avancées importantes aidant à la compréhension de l'interaction entre *V. aestuarianus* et les huîtres, la mise au point d'un modèle d'infection écologiquement réaliste a été déterminante. Parizadeh et ses collaborateurs avaient observé que *V. aestuarianus* était transmise d'une huître donneuse à une receveuse principalement comme bactérie libre dans l'eau de mer (Parizadeh et al., 2018). Couramment, lors d'infections expérimentales, les bactéries sont injectées dans le muscle des animaux, ne reproduisant pas le mode d'infection des animaux par *V. aestuarianus*. Une première tentative de contamination directe d'eau de mer par des bactéries cultivées n'a pas permis d'infecter de manière reproductible des huîtres placées dans cette eau de mer contaminée (Parizadeh et al., 2018). C'est pourquoi Parizadeh et ses collaborateurs ont injecté des bactéries dans des huîtres donneuses qui ont excrété la bactérie dans l'eau de mer au cours de la maladie. Puis des huîtres receveuses ont été placées dans cette eau de mer contaminée et ont développé la maladie dans 94% des expérimentations, suggérant que la virulence de *V. aestuarianus* augmente *in vivo*, comme celle de *V. cholerae* (Alam et al., 2005; Butler et al., 2006; Merrell et al., 2002).

Grâce à la mise au point de ce modèle d'infection, Parizadeh et ses collaborateurs (Parizadeh et al., 2018) ont observé que les souches pathogènes de *V. aestuarianus* sont capables dans un premier temps de coloniser l'hémolymphe des huîtres, puis de s'y multiplier. En effet, lors d'une expérimentation menée en mésocosme (en conditions de température contrôlées), la charge bactérienne dans plusieurs tissus des animaux vivants et moribonds a été quantifiée par qPCR pendant le développement de la maladie. Cette expérimentation a également montré qu'une souche virulente est capable de persister et de proliférer dans l'hémolymphe, puis de se répandre dans tous les tissus. Au contraire, une souche non virulente est apparue capable de pénétrer dans l'environnement interne de l'huître mais s'est révélée incapable de s'y multiplier.

L'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes est donc apparue déterminante dans le développement de la maladie. Labreuche et ses collaborateurs ont observé que *V. aestuarianus* interagissait avec les hémocytes d'huîtres de manière extracellulaire et inhibait les capacités de phagocytose de ces derniers (Labreuche et al., 2010; Labreuche, Lambert, et al., 2006a;

Labreuche, Soudant, et al., 2006). Les ECP (extracellular products) synthétisés par la souche de *V. aestuarianus* testée (01/032) avaient des effets sur les hémocytes d'huîtres : diminution de la phagocytose, diminution des capacités d'adhésion (perte des pseudopodes, arrondissement cellulaire), augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Labreuche, Soudant, et al., 2006). L'hypothèse était donc que 01/032 échappait à la phagocytose et en plus, induisait la production de ROS par les hémocytes, provoquant leur propre cytotoxicité.

Il a ensuite été proposé que ces effets immunosuppresseurs des ECP reposaient sur une activité protéase, d'autant plus que la production de protéases extracellulaires était impliquée dans la pathogenèse de plusieurs vibrionaceae (Hasegawa et al., 2009; Nottage & Birkbeck, 1987; Sussman et al., 2009). L'activité de type métalloprotéase de ces ECP a été mise en évidence et repose sur la protéine Vam (*V. aestuarianus* metalloprotease) (Labreuche et al., 2010). Afin de vérifier son implication dans la virulence de *V. aestuarianus*, le gène *vam* a été transféré à une souche de *V. splendidus*, connue comme étant non pathogène pour les huîtres. L'expression du gène transféré a conféré un phénotype toxique à cette souche *in vivo* (Labreuche et al., 2010).

Cependant, le gène codant la métalloprotéase est également présent chez des souches non virulentes. Pour aller plus loin, Goudenège, Travers et ses collaborateurs ont effectué des comparaisons de génomes de souches génétiquement très proches, présentant des phénotypes de virulence contrastés (Goudenège et al., 2015). Cette étude a permis de détecter un décalage du cadre lecture (frameshift) dans le génome d'une souche de virulence intermédiaire (07/115). Cette mutation était située sur le gène *varS* qui code pour un récepteur à activité tyrosine kinase, faisant partie d'un système de régulation à deux composants (*varA/varS*). Les systèmes de signalisation à deux composants permettent aux bactéries de capter des signaux extérieurs, transmettre l'information dans la cellule et convertir cette information en une modification appropriée de l'expression de gènes (Tsou et al., 2011). Ce type de système à deux composants est très conservé chez les gammaprotéobactéries. Un système à deux composants équivalent a été découvert chez *E. coli* (*BarA/UvrY*), chez qui il est impliqué dans de nombreuses fonctions, telles que la formation de biofilm, la motilité, dans le métabolisme, la résistance au stress, la virulence, le quorum sensing (Mitra et al., 2013; Palaniyandi et al., 2012; Zere et al., 2015). Les analyses génétiques ont confirmé que ce gène était nécessaire pour que *V. aestuarianus* infecte les huîtres, mais également pour l'expression du gène *vam*. Néanmoins, les déterminants environnementaux de la régulation de *vam* par *varA/varS* restent à identifier, de même que les autres gènes potentiellement régulés par ce système à deux composants, ainsi que la cible protéique de la métalloprotéase Vam.



## Problématiques et plan de thèse

L'espèce bactérienne *V. aestuarianus* a été décrite comme une bactérie associée aux environnements estuariens (Tison & Seidler, 1983) pouvant être isolée d'espèces de bivalves ou de crabes, mais sans provoquer de maladies. Mais au début des années 2000, son implication dans des mortalités d'huîtres *C. gigas* a pu être constatée (Garnier et al., 2007). Jusqu'alors, la diversité de *V. aestuarianus* n'avait fait l'objet que d'études limitées par l'échantillonnage qui reposait essentiellement sur des souches isolées pendant des épisodes de mortalité d'huîtres. Ainsi, les souches responsables de ces mortalités ont été regroupées dans la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* (Garnier et al., 2008). Puis en 2012, des mortalités de coques *C. edule* associées à *V. aestuarianus* ont été rapportées (François et al., 2013). Cependant, les processus ayant mené à l'émergence de ces lignées pathogènes de bivalves sont restés inconnus. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les processus gouvernant l'émergence et l'évolution de ces lignées en associant des données génétiques et écologiques et en adoptant des approches de génétique des populations, de génomique comparative et de phylogénétique.

La première étape, objet du premier chapitre, était de mieux comprendre la structuration génétique de l'espèce *V. aestuarianus*. Il avait déjà été établi que les souches isolées d'huîtres moribondes et les souches non cliniques appartenaient à deux sous-espèces différentes, respectivement *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus aestuarianus*. Une nouvelle étude, publiée dans le journal international de systématique et de microbiologie évolutive (IJSEM) (co premier auteur), a permis d'évaluer la proximité entre les souches isolées de coques et les deux sous-espèces précédemment identifiées, sur la base d'analyses génétiques mais aussi sur le plan phénotypique, en comparant notamment les capacités métaboliques, et les spectres MALDI-TOF. Cette étude a établi que les souches isolées de coques étaient suffisamment éloignées des sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus aestuarianus*, pour être affiliées à une troisième sous-espèce, *V. aestuarianus cardii*. Une question qui émergea alors était de savoir si les deux sous-espèces pathogènes étaient capables de provoquer des mortalités chez d'autres bivalves que ceux auxquels elles étaient associées. Afin de mieux caractériser la spécificité d'hôte au sein de l'espèce *V. aestuarianus*, nous ajoutons des données complémentaires sur le spectre d'hôte de deux souches, 02/041 et 12/122 3T3. La première appartient à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* et est virulente pour les huîtres. La deuxième appartient à la sous-espèce nouvellement décrite *V. aestuarianus cardii*, et est virulente pour les coques. La capacité de ces deux souches à infecter et coloniser des individus appartenant à cinq espèces de bivalves (huître creuse *C. gigas*, huître plate *O. edulis*, moule bleue *Mytilus sp.*, palourde *Ruditapes philipinarum* et coque *C. edule*) ont été évaluées grâce à une expérimentation de cohabitation entre des

animaux donneurs infectés et des animaux receveurs appartenant à ces cinq espèces de bivalves. Enfin des expériences de contamination par injection de souches *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii* dans des huîtres creuses et dans des coques ont été réalisées afin d'évaluer la toxicité de ces souches vis-à-vis de ces deux espèces de bivalves.

Dans le deuxième chapitre, nous tentons de comprendre l'histoire évolutive de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, qui est associée aux mortalités d'huîtres. Dans un article soumis dans le journal mBio (premier auteur), nous utilisons des approches de génétique des populations et de génomique comparative, pour mettre en évidence l'expansion clonale à l'échelle européenne de deux lignées pathogènes, A et B, déjà identifiées. L'histoire évolutive de ces deux lignées se caractérise par la rareté des échanges génétiques avec d'autres populations, laissant supposer que sa gamme d'habitats est restreinte à son hôte connu, c'est-à-dire l'huître. Elle est capable d'y persister en faibles concentrations en dehors des périodes de permissivité pour le développement de la maladie. Il s'agit donc probablement d'un pathogène spécialiste. L'accumulation de séquences d'insertions dans son génome, pourrait en être un marqueur. De plus, nous identifions un élément génétique mobile (MGE : mobile genetic element), intégré dans le génome des souches de cette sous-espèce, contenant des gènes conférant une meilleure capacité de résistance au cuivre. L'acquisition ancestrale de cet MGE pourrait être une des étapes clé précédant l'émergence de cette sous-espèce pathogène. Notre deuxième objectif était de mieux définir l'habitat de *V. aestuarianus francensis*. Des données complémentaires, acquises lors de campagnes de prélèvements en zones ostréicoles, sont donc présentées dans ce chapitre. Ces prélèvements ont été réalisés dans le bassin de Thau, où les huîtres sont impactées par des mortalités liées à *V. aestuarianus* depuis au moins 2008 (1<sup>ère</sup> détection dans le cadre de la surveillance zoosanitaire française, réseau Repamo, Ifremer). Nous observons que *V. aestuarianus francensis* est présente dans les tissus des huîtres adultes tout au long de l'année, mais que la bactérie n'est pas retrouvée dans les autres compartiments de l'environnement échantillonnés, ce qui appuie notre hypothèse de spécialisation de cette sous-espèce.

Le troisième chapitre porte sur la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, qui est associée aux mortalités de coques. Dans un article en préparation, nous présentons les résultats de plusieurs campagnes d'échantillonnage réalisées dans la baie de Somme, une zone de gisements naturels de coques, impactée par des mortalités liées à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* depuis 2012. Ces campagnes ont permis de mieux caractériser l'habitat de cette sous-espèce et d'identifier des paramètres environnementaux influençant le développement de la maladie. Pour cela, des prélèvements mensuels de coques naissains et adultes, ainsi que d'autres compartiments de leur environnement ont été réalisés, de manière à isoler la flore bactérienne

associée et à chercher *V. aestuarianus*. Ces campagnes ont également permis de compléter notre collection de génomes de souches de cette sous-espèce et de réaliser des analyses de génétique de populations, et d'identifier des facteurs potentiels d'émergence de lignées pathogènes pour les coques.

Un chapitre supplémentaire porte sur l'identification des déterminants moléculaires de l'interaction entre la bactérie *V. aestuarianus* et l'huître creuse *C. gigas*. Notre objectif était d'étudier le rôle de l'interaction entre les hémocytes d'huîtres et *V. aestuarianus* dans la virulence des souches. Nous avons donc étudié la réponse des hémocytes et la réponse bactérienne lors de contacts *in vitro* et *in vivo* entre les hémocytes d'huîtres et des souches de *V. aestuarianus* présentant différents niveaux de virulence à l'égard des huîtres. La souche 12/016 est hautement virulente envers les huîtres, le mutant 12/016 $\Delta$ varS présente une virulence atténuée et la souche 12/122 3T3 n'est pas virulente envers les huîtres. Ces contacts nous ont permis d'observer que le gène varS n'influçait ni la capacité de colonisation des huîtres de *V. aestuarianus francensis*, ni la réponse des hémocytes à *V. aestuarianus francensis*. Nous avons également observé que la souche 12/122 3T3 était capable de coloniser les huîtres et que sa présence entraînait une diminution de la réponse pro-inflammatoire des hémocytes.

Enfin, dans le dernier chapitre de cette thèse, les résultats obtenus seront synthétisés, discutés et mis en relation avec différentes perspectives de recherche.



## Chapitre 1 : Les différentes lignées pathogènes se répartissent dans des sous-espèces avec un tropisme d'hôte spécifique

La bactérie *Vibrio aestuarianus* a été isolée pour la première fois dans les années 1980 aux Etats-Unis à partir d'eau de mer et de plusieurs coquillages dont des huîtres et des palourdes, ainsi que des crabes. Tous ces animaux ne présentaient aucun signe de maladie (Tison & Seidler, 1983). Puis cette espèce a été isolée en France, pour la première fois en 2001 lors d'événements de mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* (Garnier et al., 2007). Sur la base de différences de caractères phénotypiques et génétiques, les souches françaises et la souche américaine ont été attribuées à des sous-espèces différentes. La souche américaine appartient à la sous-espèce *V. aestuarianus aestuarianus* alors que les souches françaises appartiennent à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* (Garnier et al., 2008). Depuis 2012, des souches de *V. aestuarianus* sont également associées à des épisodes de mortalités de coques (*Cerastoderma edule*) adultes en France, le long de la côte de la Manche.

L'article 1, publié dans le journal international de systématique et de microbiologie évolutive (IJSEM), permet de compléter les données génétiques et phénotypiques sur *V. aestuarianus* grâce à l'isolement, et au séquençage du génome de plusieurs souches obtenues pendant des épisodes de mortalités de coques. Il confirme que plusieurs sous-espèces peuvent être décrites: les sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus aestuarianus*, décrite par Garnier et ses collaborateurs (Garnier et al., 2008) et la sous-espèce nouvellement décrite, *V. aestuarianus cardii*. La sous-espèce *V. aestuarianus francensis* (1) contient des souches capables de coloniser les huîtres. Le test de virulence par injection effectué avec la souche 02/041 sur des coques suggère qu'elles ne sont pas toxiques pour les coques. La sous-espèce *V. aestuarianus aestuarianus* (2) contient quant à elle des souches non cliniques, qui ne sont pas associées à un habitat particulier en milieu estuarien. Les tests de virulence réalisés avec la souche type (03/008T), qui appartient à cette sous-espèce, par Garnier et al. (2008) et dans le cadre de cette étude, respectivement sur des huîtres et sur des coques, suggèrent qu'elle n'est pas toxique pour ces animaux. Enfin, la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* (3) est capable d'affecter les coques.

Ces sous-espèces semblent donc présenter différents tropismes d'hôtes, qui sont explorés grâce à différentes méthodes d'infection et présentés dans des données complémentaires à cet article.



## Article 1 : *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii*, pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* and *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis*

Par Garcia, C. \*, **Mesnil, A.** \*, Tourbiez, D., Moussa, M., Dubreuil, C., Gonçalvez de Sa, A., Chollet, B., Godfrin, Y., Dégremont, L., Serpin, D., Travers, M-A. (2021). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. doi : 10.1099/ijsem.0.004654

\* : Co-premiers auteurs

### Résumé de l'article 1

Des caractéristiques phénotypiques de ces souches de coques ont été explorées. Une souche de coques (12/122 3T3) présente un profil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) différent de celui d'une souche *V. aestuarianus francensis* (02/041) et de la souche-type *V. aestuarianus* (03/008T), Contrairement aux souches d'huîtres, les souches de coques sont capables d'utiliser le D-mannitol, l'arginine et se distinguent également par la fermentation de l'amidon, du D-ribose et du glycogène. Les souches de coques ont néanmoins plusieurs caractéristiques en commun avec les souches d'huîtres, comme l'absence de croissance sur milieu TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose), un milieu sélectif pour les Vibrios ; et la même sensibilité à plusieurs antibiotiques testés (fluméquine 30 µg, kanamycine 30 µg, tétracycline 30 µg, sulfaméthoxazole/triméthoprim 19:1 25 µg, streptomycine 25 µg, sulfamides 300 µg, érythromycine 30 µg, pénicilline 6 µg, Triméthoprim 5 µg, Chloramphénicol 30 µg, ampicilline 10 µg, gentamicine 30 µg). Les tests de virulence effectués avec neuf souches de coques et une souche *V. aestuarianus francensis* (02/041) sur des coques d'élevage ont montré des niveaux variables pour les souches de coques, et une virulence négligeable pour la souche *V. aestuarianus francensis*.

Des caractéristiques génétiques ont également été explorées, *via* le séquençage du gène *ldh* (lactate deshydrogenase) et le séquençage de génomes complets. Les génomes des souches de coques ont des tailles similaires à ceux des souches d'huîtres et de la souche type, et elles ne diffèrent pas non plus par le pourcentage de G+C (entre 42 et 43% quelle que soit la souche). Une matrice de distance basée sur le calcul de l'identité moyenne des nucléotides (Average nucleotide identity, ANI) avec les génomes entiers a montré que toutes les souches appartenaient à la même espèce (ANI>95%) mais pouvaient être classées en trois sous-espèces différentes.



## *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov., pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. and *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov.

Céline Garcia<sup>1,\*</sup>, Aurélie Mesnil<sup>1,2†</sup>, Delphine Tourbiez<sup>1</sup>, Mirna Moussa<sup>1</sup>, Christine Dubreuil<sup>1</sup>, Amélie Gonçalves de Sa<sup>1</sup>, Bruno Chollet<sup>1</sup>, Yoann Godfrin<sup>1</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Delphine Serpin<sup>1</sup> and Marie-Agnès Travers<sup>1,2</sup>

### Abstract

Cockle mortality events have been reported in northern France since 2012. In the present study, we describe and investigate the implication of a potential bacterial causative agent in cockle mortality. Bacteria isolated from five different cockle mortality events were characterized and studied. Using phenotypic analysis combined with DNA–DNA hybridization (DDH) and whole genome sequencing, the isolates were shown to belong to *Vibrio aestuarianus*, a species regularly detected in France during oyster mortality events. Comparison of the strains from cockles with strains from French oysters and the type strain showed that the strains from cockles were genetically different to those from oysters and also different to the *V. aestuarianus* type strain. Moreover, the cockle and oyster strains were classified into two different, but close, groups both separated from the type strain by: (1) analyses of the *ldh* gene sequences; (2) DDH assays between 12/122 3T3<sup>T</sup> (LMG 31436<sup>T</sup>=DSM 109723<sup>T</sup>), a representative cockle strain, 02/041<sup>T</sup> (CIP 109791<sup>T</sup>=LMG 24517<sup>T</sup>) representative oyster strain and *V. aestuarianus* type strain LMG 7909<sup>T</sup>; (3) average nucleotide identity values calculated on the genomes; and (4) phenotypic traits. Finally, results of MALDI-TOF analyses also revealed specific peaks discriminating the three representative strains. The toxicity of representative strains of these cockle isolates was demonstrated by experimental infection of hatchery-produced cockles. The data therefore allow us to propose two novel subspecies of *Vibrio aestuarianus*: *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. for the cockle strains and *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. for the Pacific oyster strains, in addition to an emended description of the species *Vibrio aestuarianus*.

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, 17390 La Tremblade, France; <sup>2</sup>IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier, France.

**\*Correspondence:** Céline Garcia, celine.garcia@ifremer.fr

**Keywords:** bacterial pathogen; Bivalvia; cockle; mortality; shellfish; *Vibrio aestuarianus*.

**Abbreviations:** ANI, average nucleotide identity; DDH, DNA–DNA hybridization; FAME, fatty acid methyl ester; SASW, sterilized artificial seawater; TCBS, thiosulfate citrate bile salts sucrose agar.

The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the whole genome sequences of *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. 12/122 3T3<sup>T</sup> (=LMG 31436<sup>T</sup>=DSM 109723<sup>T</sup>), 15/061 4T2 (=LMG 31438=DSM 109725), 15/064 3T2 (=LMG31439=DSM 109719) and 15/075 3T2 (=LMG 31440=DSM 109720) are JAAKZK000000000, JAAKZL000000000, JAAKZM000000000 and JAAKZN000000000, respectively, under BioProject accession number PRJNA607444. Accession numbers for the 16S, *gyrB* and *ldh* sequences of the same strains are MK307684, MK307691, MK307694, MK307697; MK315009, MK315016, MK315019, MK315022; and MK315026, MK315033, MK315036, MK315039, respectively. Lastly, for these three genes in strains LMG 31437 (=DSM 109724), 12/122 1T3, 12/122 2T3, 12/122 4T3, 12/122 5T3, 15/061 1T1, 15/061 2T2, 15/061 3T1, 15/061 3T2, 15/061 4T4, 15/061 5T2, 15/064 4T2, 15/075 1T2 of *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov., the accession numbers are MK307681–307683, MK307685–307690, MK307692, MK307693, MK307695, MK307696; MK315006–315008, MK315010–315015, MK315017, MK315018, MK315019, MK315020, MK315021; and MK315023–315025, MK315027–315032, MK315034, MK315035, MK315037, MK315038, respectively.

For *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., accession numbers for strains 01/308, 01/151, 01/032, 02/041<sup>T</sup> and 07/115 are JABANK000000000, JABANJ000000000, JABANI000000000, JAAZTV000000000 and JABANH000000000, respectively, under BioProject accession number PRJNA623953.

Finally, for *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. LMG 7909<sup>T</sup>, the whole genome accession number is JAAZTU000000000.

†These authors contributed equally to this work

Five supplementary tables and three supplementary figures are available with the online version of this article.

004654 © 2021 The Authors

 This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License.

## INTRODUCTION

The edible cockle *Cerastoderma edule* is one of the most common bivalve species and is widely distributed along the European coasts. It is commercially important in the UK, Netherlands, Spain and France. For many years, mortalities of cockles and dramatic declines in their populations have been reported [1]. Predation, diseases, climatic events, pollution, poor recruitment and over-fishing have all been suggested as driving factors [2]. Cockles are host to a wide variety of viruses, bacteria, fungi and protists. Many of these micro-organisms are normally innocuous but can become problematic if prevailing environmental conditions are poor. Some parasites have been isolated during mass mortality events (review [1]): Protistan *Marteilia cochillia* in Spain [3], gregarines *Nematopsis scheideri* and *Nematopsis incognito* in Portugal [4, 5], *Amoeba* [6], *Haplosporidia* [7], and a wide range of *Digenea* (trematodes) [8, 9]. Cockles also host emerging parasites, such as *Perkinsus chesapeaki*, newly described in Europe [10]. They can also suffer from a transmissible disease known as disseminated neoplasia [11, 12]. Some studies have suggested that different factors, such as genetic alterations, viruses, retrotransposons and contaminants [12], can act in concert [13]. However, bacteria have rarely been isolated associated with mortalities, apart from mycoplasma-like organisms in Spain [14].

*Vibrio* are the most abundant cultivable bacteria found in the marine environment. Free, associated with plankton or with marine animals, bacteria belonging to this genus are classified in clades [15–18] clustering more than 100 different species [19]. Some of these species have virulent strains implicated in fish and shellfish diseases either alone, in bacterial consortia [20–22] or in concert with other pathogens [23]. For bivalves, the main pathotypes belong to the *Splendidus* clade (*Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio crassostreae*, *Vibrio splendidus*) or the species *Vibrio tapetis*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio bivalvicida*, *Vibrio europaeus* or *Vibrio aestuarianus* [19, 24].

*Vibrio aestuarianus* was first isolated in the 1980s in the USA from seawater and several shellfish including oysters, clams and crabs presenting no signs of disease [25]. This species was isolated for the first time in France in 2001, during mortality events of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Garnier et al. [26] compared the French strains with the American one and found that the French strains had some different biochemical and pathogenic characters. These authors concluded that the French strains could constitute a new subspecies within *V. aestuarianus* and proposed to name the American strain *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* and the French strains *V. aestuarianus* subsp. *francensis*, although these two subspecies were never officially validated.

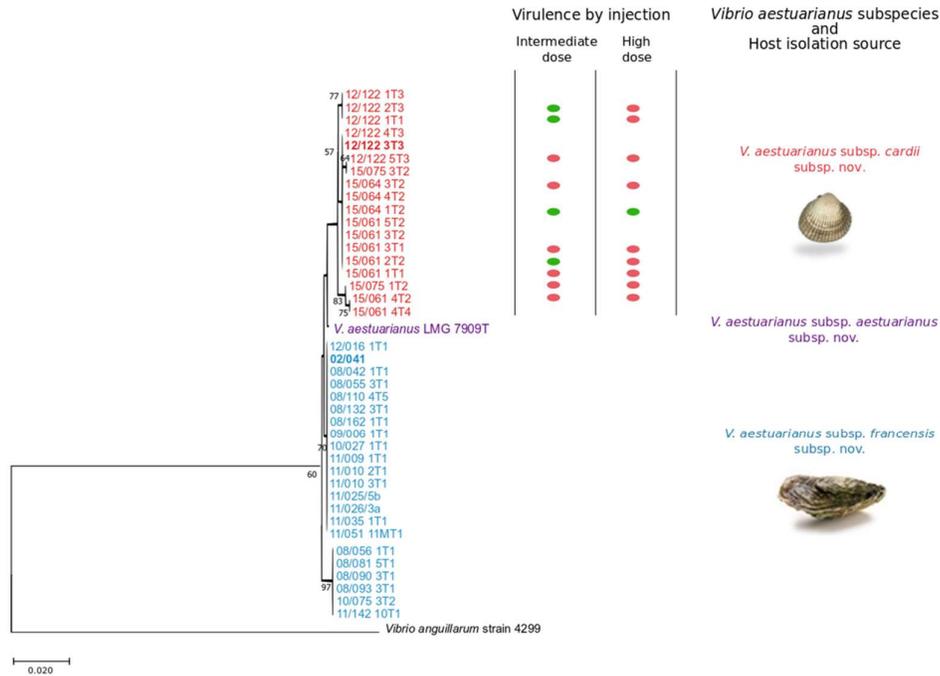
The present study describes the isolation and classification of bacteria from cockle mortality events that occurred in France in 2012 and 2015. Strains were described and sequenced that allowed us to reproduce and describe this new cockle disease. These strains were compared with the French 'oyster' strains [26] and with the type strain of *V. aestuarianus* (LMG 7909<sup>T</sup>) [25], and led us to propose two novel subspecies of *V. aestuarianus*.

## ISOLATION AND ECOLOGY

In 2012, mass mortality events of *Cerastoderma edule* were reported in two wild beds on the English Channel coast: Baie des Veys and Baie de Somme, the latter of which is the largest cockle bed in France. In 2015, another mortality event occurred in both these locations as well as in Binic, also on the English Channel coast (Fig. S1, available with the online version of this article). Fishers reported these mortality events to the competent authority and national network for surveillance and monitoring of mollusc health, REPAMO (REseau de Pathologie des MOLLusques), in charge of recording mortality cases and analysing representative samples associated with them. In 2012 and 2015, 15–30 adult cockles were collected from the different wild beds. Each collected individual was examined for macroscopic characteristics and processed using either histological or bacteriological analysis in addition to molecular analyses (Table S1). The mortality rate in 2012 was estimated at 80–89% according to site. For each site, the mortality rate was lower in 2015 than in 2012 ranging from 33 to 49% (Table S1). In all cases, cockle mortality was uniform, massive and sudden, concerning mainly adults. No other species were affected by these mortality events except in Baie des Veys where a number of stocks of *Crassostrea gigas* spat and juveniles also suffered mortalities. The cockle mortality occurred during summer and lasted from 1 to 2 months, according to fishermen. No specific environmental events were reported during the summers of 2012 or 2015, except a high level of macroalgae at Binic. The sampled individuals were mainly moribund, lying on the bottom and characterized by very slow valve closing valves and limited intrapalleal fluid. No specific macroscopic signs such as pustules, conchyolin deposits or necrosis and degradation of the hinge could be observed.

For the detection and quantification of bacterial pathogens, pieces of gill, muscle and mantle of five moribund cockles per sample were individually crushed in 150 µl sterile seawater, diluted 100-fold and 10000-fold and spread onto marine agar (Conda) incubated for 48–72 h at 20 °C. Colonies were enumerated and those bacterial colonies found in abundance were isolated and tested by duplex real time PCR for the detection of *V. aestuarianus* and bacteria of the *Splendidus* clade [27]. Pure cultures of these bacterial strains were conserved frozen at –80 °C in Zobell broth with 15% glycerol. These bacteriological analyses revealed that all analysed samples yielded numerous bacterial colonies. The species *V. aestuarianus* was detected in all samples after 48 h at 20 °C (Table S2). Bacteria of the *Splendidus* clade were also isolated in some samples but these bacteria were not the dominant strains in the Petri dishes. Moreover, *V. aestuarianus* DNA was detected by molecular analyses [28] in all samples, at a generally high detection frequency. DNA of OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus type 1) known to contribute to mortality events in *Crassostrea gigas* [23, 29], was not detected in any of the samples (Table S2).

Fifteen to twenty individuals per sample were also processed for histological analyses. After 48 h in Davidson's fixative,



**Fig. 1.** Phylogenetic position of *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. and *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. strains and virulence of *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. Molecular phylogenetic analysis by a maximum-likelihood method based on the Kimura two-parameter model conducted in MEGA X. The analysis involved 42 nucleotide sequences with a total of 570 positions. Proposed type strains are indicated in bold. Virulence was tested by intramuscular injection of hatchery-produced cockles, using two bacterial doses (high, OD 600 nm=0.4; intermediate, OD 600 nm=0.04). Strains causing more than 70% mortality are indicated by a red oval.

tissues were maintained in 70% ethanol until histological preparation by dehydration and embedding in paraffin following standard procedures. Sections of 2–3 µm thickness were stained with haematoxylin and eosin. Histological analyses revealed the presence of other organisms at low infection intensity (a few parasites per individual), despite a high prevalence in some cases such as gregarine spores or rickettsia-like organisms (Table S2).

### 16S rRNA GENE PHYLOGENY

A total of 59 bacterial strains were isolated during periods when the REPAMO surveillance network reported high levels of cockle mortalities. After isolation, the predominant bacteria appeared small (1–2 mm), translucent, regular and white to cream-coloured on marine agar after 48 h at 20 °C (Fig. S2). For genotyping, DNA was extracted by boiling in distilled water [30] and the *ldh* (lactate dehydrogenase) gene was amplified and sequenced according to methods previously described [20], as were the 16S rRNA and *gyrB* genes [17] (Table S4). Sequences were aligned and phylogenetic trees built using MEGA X [31]. The trees were drawn using the

neighbour-joining method with the Kimura two-parameter model [32] and the maximum-parsimony method [33]. A total of 17 isolates (isolated in 2012 and 2015 from cockle mortality events) were identified as belonging to *V. aestuarianus* by qPCR (Table S3) and gene sequencing (16S rRNA and *gyrB*; Table S4). They showed a high degree of similarity to the 16S rRNA gene reference sequences of *V. aestuarianus* (99% to the type strain LMG 7909<sup>T</sup>). Phylogenetic analyses based on the *ldh* gene sequence of these strains led to their affiliation to the species *V. aestuarianus*, in a group close to but apart from the oyster strains and type strain. Moreover, oyster strains formed an individual branch clearly separated from the type strain of *V. aestuarianus* (Fig. 1) [26].

This classification was confirmed by DNA–DNA hybridization (DDH) performed by the BCCM/LMG laboratory at Ghent University (Belgium). After genomic DNA extraction according to a modified Wilson protocol [34], hybridizations were performed in microplates at 40 °C [35] and DNA relatedness values (%) based on means of a minimum of six hybridizations. DDH of two strains isolated from diseased cockles in 2012 and 2015 and one strain isolated

**Table 1.** DDH values (%) measured by comparing *Vibrio aestuarianus* strains from cockles and oysters with *V. aestuarianus* LMG 7909<sup>T</sup> and other close species

Strains: 1, *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. 12/122 3T3<sup>T</sup>; 2, *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. 15/061 4T2; 3, *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. 02/041<sup>T</sup>; 4, *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. LMG 7909<sup>T</sup>; 5, *Vibrio furnisii* LMG 7910<sup>T</sup>; 6, *Vibrio ordalii* LMG 13544<sup>T</sup>; 7, *Vibrio salilacus* JCM 19265<sup>T</sup>.

Strain	1	2	3	4	5	6	7
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> subsp. nov. 12/122 3T3 <sup>T</sup>	100						
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> subsp. nov. 15/061 4T2	84 (7)	100					
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>francensis</i> subsp. nov. 02/041 <sup>T</sup>	80 (18)	80 (11)	100				
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> subsp. nov. LMG 7909 <sup>T</sup>	70 (2)	71 (5)	79 (22)	100			
<i>V. furnisii</i> LMG 7910 <sup>T</sup>	14 (3)	18 (4)	16 (5)	17 (20)	100		
<i>V. ordalii</i> LMG 13544 <sup>T</sup>	14 (12)	16 (5)	16 (5)	9 (16)	8 (19)	100	
<i>V. salilacus</i> JCM 19265 <sup>T</sup>	15 (4)	16 (4)	12 (2)	ND	ND	ND	100

from diseased oysters were performed with *V. aestuarianus*, *V. ordalii* and *V. salilacus* reference strains. With more than 70% hybridization to the *V. aestuarianus* type strain, we confirmed the affiliation of the cockle and oyster strains to the species *V. aestuarianus*. Indeed, hybridizations were 70, 71 and 79% with the *V. aestuarianus* type strain for strains 12/122 3T3<sup>T</sup>, 15/061 4T2 and 02/041<sup>T</sup>, respectively, and were 80 and 80% with the *V. aestuarianus* oyster strain for cockle strains 12/122 3T3<sup>T</sup> and 15/061 4T2, respectively (Table 1). Garnier *et al.* generally found similar results for hybridizations between the *V. aestuarianus* type strain and different oyster strains: their hybridizations were between 54 and 87% [26].

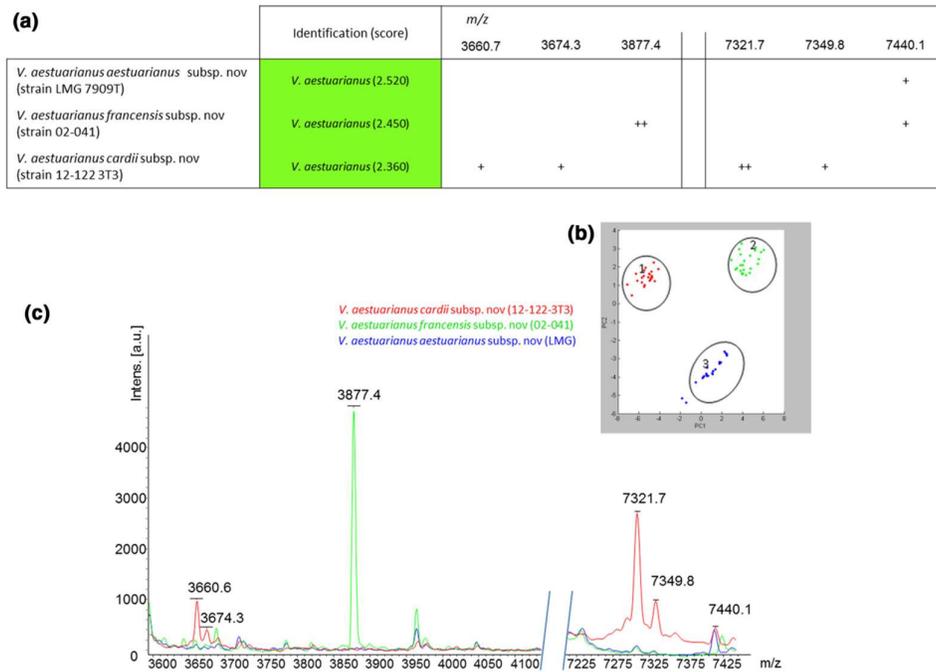
The three representative strains for the three subspecies were further studied by whole-cell MALDI-TOF MS profiling. MALDI-TOF mass spectrum measurements and processing were carried out as described by Mougín *et al.* [36]. The analyses were performed using Flex Analysis (version 3.4) and ClinProTool (version 3.0) software (Bruker Daltonics). Fig. 2 shows the comparison of the MALDI-TOF spectra. First, all three strains were identified with Bruker database as *V. aestuarianus* with correct scores. Moreover, significant differences observed between spectra (12 per strain) with prominent mass ions at 3877.4 and 7321.7, characteristic for the *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. type strain and the *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. type strain, respectively. The dendrogram based on whole-cell MALDI-TOF mass spectra as well as principal component analysis demonstrated a clear separation of the three strains. Comparison in other isolates is now needed to confirm the peak combination allowing discrimination [37].

### Genome features

The existence of three distinct and coherent groups was also supported by results from the comparison of the complete genomes of four cockle isolates, the genome of the *V. aestuarianus* type strain and the five genomes already available for different *V. aestuarianus* oyster strains. Briefly, whole genomes of cockle isolates were sequenced by Biofidal

(Vaulx-en-Velin, France) after DNA isolation using NucleoSpin microbial DNA (Macherey-Nagel). DNA libraries were made from 1 ng genomic DNA using Nextera XT DNA kit (Illumina). Paired-end isolate sequencing (2×300) was performed on a MiSeq system (Illumina). Genomes were assembled *de novo* using SPAdes (version 3.11.0 [38]), with read error corrections and 20× coverage cut-off. Assembly quality was checked using QUAST [39]. Assemblies were added in MAGE [40], excluding contigs with lengths below 1000 bp. Oyster and cockle *V. aestuarianus* strain draft genomes presented typical features for the species. They ranged between 4.02 and 4.51 Mb, with a relatively close number of CDSs, genes coding for transfer RNA (between 91 and 102 for cockle isolates and between 84 and 85 for oyster isolates) and G+C contents (42.68–42.89 mol% for the cockle isolates and 42.52–42.83 mol% for the oyster isolates) (Table 2). 16S sequences and whole genome comparisons were performed by calculating average nucleotide identity (ANI) between strains (JSpeciesWS [41]). A distance matrix was calculated by inverting ANI results based on whole genomes. Similarity percentages calculated between 16S sequences extracted from whole genomes ranged from 99.09–100% (data not shown). All values were above the 98.7% cut-off generally accepted for differentiating two species [42]. Moreover, ANI values calculated with whole genomes indicated an intra-clade similarity of 99.21–99.99% (mean value of 99.69%) for the *V. aestuarianus* oyster strains and an intra-clade similarity ranging from 97.88 to 99.99% (mean value of 98.47%) for the cockle isolates. The inter-clade similarity ranged from 96.83 to 97.8% depending on the isolates (Table S5) and confirmed that all strains belong to the same species (ANI >95%) but can be classified into three different subspecies.

Comparison of predicted CDSs revealed a core genome, shared by all three strains, with 2858 CDSs and specific genomes containing 611–797 specific CDSs (Fig. S3). As oyster and cockle isolates are mollusc pathogens, the predicted virulome was compared in the three representative strains. Globally, the three strains contain homologous



**Fig. 2.** MALDI TOF analyses. Spectra of three representative strains were assigned and compared by principal component analysis: LMG7909<sup>T</sup> for *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov 02/041<sup>T</sup> for *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. and 12/122 3T3<sup>T</sup> for *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. (a) Bacterial strain identification by MALDI-TOF analysis using the Bruker database. Presence/absence of discriminatory peaks revealed by PCA is also indicated. (b) Twelve spectra were compared by PCA clustering with the MBT compass. (c) MALDI-TOF spectra overview. Major discriminatory peaks are indicated.

CDSs encoding putative virulence effectors, virulence regulators, secretion systems (SST1, SST2, SST4 and SST6) and pili/flagella/chemotaxis-related proteins. But, some predicted virulence factors are missing in the different strains as haemolysin co-regulated protein in LMG7909<sup>T</sup>, zonular occludens toxin zot and T1SS-2 in 12/122 3T3<sup>T</sup> and a complete T6SS locus in 02/041<sup>T</sup>. However, their implication in pathogenesis must definitively be demonstrated.

## PHYSIOLOGY AND CHEMOTAXONOMY

The phenotypes of selected isolates were characterized in different ways. Bacterial growth was observed on marine agar, thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) medium (AES Chemunex) and CHROMagar *Vibrio* medium (CHRO-Magar) (Fig.S2). The capacity of bacteria to grow in Zobell broth with 0–10% NaCl at 20 °C or with 2% NaCl at 4, 10, 37 and 40 °C was determined (Table 3).

Antibiograms were carried out using disc-diffusion assays on Mueller–Hinton agar (Oxoid) with commercial impregnated discs (Oxoid): flumequine 30 µg (UB30), kanamycin 30 µg (K30), tetracycline 30 µg (TE30), sulfamethoxazole/trimethoprim 19:1 25 µg (SXT25), streptomycin 25 µg

(S25), sulfonamides 300 µg (S3), erythromycin 30 µg (E30), penicillin 10 UI (6 µg) (P10), Trimethoprim 5 µg (W5), Chloramphenicol 30 µg (C30), ampicillin 10 µg (AMP10), gentamicin 30 µg (CN30) or the vibriostatic agent, pteridine 150 and 10 µg (O129/150 and O129/10). Inhibition was observed after 24–48 h at 22 °C.

API 20E, API 20NE and API 50CH kits (bioMérieux) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Fresh colonies, obtained from culture bacteria on tryptone soya agar (Difco) adjusted to 2% NaCl, were suspended in SASW to obtain about OD<sub>600</sub>=0.1. After inoculation, the strips were incubated for 48 h at 20 °C and results were determined according to the manufacturer's instructions. Finally, FAME (fatty acid methyl ester) determination was performed by the BCCM/LMG laboratory at Ghent University using a standard commercial identification system (MIDI) and gas chromatography.

The 17 cockle strains and two oyster strains were able to grow in Zobell liquid medium at different temperatures from 4 to 37 °C, with a limited growth rate at the extremes. However, no growth was observed at 40 °C, with or without 6% salt. Only the *V. aestuarianus* type strain was able to

**Table 2.** Genome characteristics for *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov., *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov and *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. type strain (LMG 7909<sup>T</sup>)

Strain	Source	Genome size (bp)	No. of CDS	No. of tRNA	G+C content (%)	N <sub>50</sub> (bp)	L <sub>50</sub>	CheckM Completeness	CheckM contamin.	Accession no.	No. of reads
12/122 3T3 <sup>T</sup>	<i>Cerastoderma edule</i>	4350835	4449	97	42.73	50782	25	100%	0.91%	JAAKZN000000000	694942
15/061 1T1	<i>Cerastoderma edule</i>	4099086	4205	102	42.89	43962	29	100%	0.91%	JAAKZK000000000	843350
15/064 3T2	<i>Cerastoderma edule</i>	4024371	4101	91	42.79	44282	29	99.93%	0.83%	JAAKZM000000000	703751
15/075 3T2	<i>Cerastoderma edule</i>	4394098	4614	98	42.68	55001	26	99.90%	1.10%	JAAKZL000000000	1091426
LMG 7909 <sup>T</sup>	Type strain	4229739	4020	103	42.67	96002	16	100%	0.09%	JAAZTU000000000	897933
01/032	<i>Crassostrea gigas</i>	4204160	4188	84	42.83	–	–	99.72	0.12%	JABANI000000000	–
01/151	<i>Crassostrea gigas</i>	4368412	4350	84	42.73	–	–	100%	0.12%	JABANJ000000000	–
01/308	<i>Crassostrea gigas</i>	4510343	4534	85	42.52	–	–	100%	0.16%	JABANK000000000	–
02/041 <sup>T</sup>	<i>Crassostrea gigas</i>	4196441	4063	84	42.83%	–	–	99.72%	0.12%	JAAZTV000000000	–
07/115	<i>Crassostrea gigas</i>	4245988	4243	84	42.79	–	–	99.72%	0.12%	JABANH000000000	–

grow in the presence of 6% salt. All the strains, like the type strain, were shown to be sensitive to the tested antibiotics (Table 3). Cockle and oyster strains appeared under blue light on CHROMagar medium and, unlike the type strain, had a limited growth capacity on TCBS medium, where a few yellow colonies appeared (Fig. S2). The observations of the oyster strains and the type strain were similar to those made by Garnier *et al.* [26]. Additional biochemical characterization analyses were performed to test this proposition, using API20E and 50CH strips (Table 4) and FAME analyses (Table 5). The strains isolated from cockles and oysters, like the *V. aestuarianus* type strain, could form acids from

D-glucose, sucrose, trehalose, N-acetyl-D-glucosamine and had β-galactosidase activity and indole production. Cockle strains could be distinguished from oyster strains by their utilization of D-mannitol and arginine and fermentation of starch, D-ribose and glycogen. They could be distinguished from the type strain by the non-fermentation of potassium gluconate. The oyster strains could not use D-mannitol and arginine. However, as fermentation and utilization of substrates appeared variable among the cockle and oyster strains, no character clearly separated the three groups of strains.

**Table 3.** Key phenotypic characteristics (antibiotic sensitivity and growth capacity) of *Vibrio aestuarianus* strains isolated from cockles and oysters compared with the *V. aestuarianus* type strain

Strains: 1, 17 strains from cockles; 2, *V. aestuarianus* LMG 7909<sup>T</sup>; 3, oyster strain 02/041<sup>T</sup>; 4, oyster strain 02/093; 5, Results of Garnier *et al.* for 11 oyster strains [26]. Flumequine 30 µg (UB30), kanamycin 30 µg (K30), tetracycline 30 µg (TE30), sulfamethoxazole/trimethoprim 19:1 25 µg (SXT25), streptomycin 25 µg (S25), sulfonamides 300 µg (S3), erythromycin 30 µg (E30), penicillin 10 UI (6 µg) (P10), trimethoprim 5 µg (W5), chloramphenicol 30 µg (C30), ampicillin 10 µg (AMP10), gentamicin 30 µg (CN30) or the vibriostatic agent, pteridine 150 µg and 10 µg (O129/150 and O129/10). +, Positive; –, negative; ND, no data.

Characteristic	1	2	3	4	5
AMP10, C30, E30, K30, TE30	+	+	+	+	+
P10, UB30, SXT25, S25, S3, W5, CN30, O129/150, O129/10	+	+	+	+	ND
Growth at 4 and 20 °C	+	+	+	+	+
Growth at 35 and 37 °C	+	+	+	+	–
Growth at 40 °C or in absence of salt	–	–	–	–	–
Growth in 6% NaCl	–	+	–	–	–
Growth on TCBS	–	+	–	–	–

**Table 4.** Key differential phenotypic characteristics (API) of *Vibrio aestuarianus* strains isolated from cockles and oysters from the *Vibrio aestuarianus* type strain

Strains: 1, 17 strains from cockles; 2, *V. aestuarianus* LMG 7909<sup>T</sup>; 3, oyster strain 02/041<sup>T</sup>; 4, oyster strain 02/093; 5, results of Garnier et al. for 11 oyster strains [26]. +, Positive for >90% of the strains; (+), positive for 75–89%; –, negative for <10%; (–), negative for 25–11%; v, variable for 26–74%.

Characteristic	1	2	3	4	5
Fermentation of:					
D-Glucose	+	+	–	–	(+)
N-Acetyl-D-glucosamine	(+)	+	+	+	(+)
Sucrose and trehalose	+	+	+	+	+
Potassium gluconate	–	+	+	–	v
D-Galactose	+	+	–	–	+
Maltose	(+)	+	–	+	v
Cellobiose	(+)	+	–	–	v
D-Fructose and D-mannose	+	+	+	–	+
Starch, D-ribose and glycogen	(+)	+	–	–	v
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	(–)
β-Galactosidase	+	+	+	+	+
Tryptophan deaminase	–	–	–	–	v
Gelatinase	v	+	–	+	v
Indole production	+	+	–	+	+
Utilization of D-mannitol	v	–	–	–	–
Utilization of citrate	(–)	–	–	–	v
LDC, ODC, VP, H2S, URE, INO, SOR, RHA, MEL, ARA, GLY, ERY, DXYL, LXLY, ADO, MDX, SBE, DUL, MDM, MDG, AMY, ARB, ESC, SAL, LAC, INU, MLZ, RAF, XLT, GEN, TUR, LYX, TAG, DFUC, LFUC, DARL, LARL, 2KG, 5KG	–	–	–	–	–

Other characters that can also differentiate the strains include their fatty acids (Table 5). *V. aestuarianus* strains can be distinguished from *V. ordalii* and *V. furnisii* by their lower level of 3 hydroxy-dodecanoic acid and higher level of iso-C<sub>16:0</sub>. Between the *V. aestuarianus* strains, differences were observed for C<sub>12:0</sub> 3-OH, iso-C<sub>14:0</sub> and C<sub>14:0</sub><sup>o</sup>, for which the cockle strains appeared intermediate and the oyster strains had a high level compared with the type strain. However, the most remarkable difference concerned C<sub>18:1</sub> ω7c, which was present at a higher level in the type strain compared with the oyster (low level) or cockle strains (intermediate level). In contrast, the oyster and cockle strains showed a high level of the C<sub>16:0</sub> compared to the type strain.

Finally, the pathogenicity of nine cockle isolates (12/122 1T1, 12/122 2T3, 12/122 3T3<sup>T</sup>, 12/122 4T3, 15/061 1T1, 15/061 4T2, 15/064 3T2, 15/075 1T2, 15/075 3T2) on reared cockles was investigated by experimental injections, which also included oyster strain 02/041<sup>T</sup>, pathogenic for oysters, and *V. splendidus*-related 15/064 1T2, isolated from cockles (Fig. 1). Cockles were induced to spawn in September 2015 at the Ifremer hatchery in La Tremblade and larvae were grown

according to standard protocols used for *C. gigas*, except that seawater temperature was maintained at 20°C for cockle larvae [43]. Settlement took place from 11 to 16 days post fertilization. All progenies were maintained under controlled environmental conditions in our facilities using unheated UV treated (40 mJ cm<sup>-2</sup>) seawater in a flow-through system. All animals were fed *ad libitum*. Following an initial screening of 30 of these animals (no detection of *Vibrio aestuarianus* on 159 screened colonies, no detection of *V. aestuarianus* or herpesvirus OsHV-1 DNA and no detection of any other pathogens by histology) and in the absence of mortality over the rearing period, we chose to use this biological material for the controlled infections. Experiments were conducted in May and June 2016 when cockles weighed 4.39 g (s.d. 0.80) and measured 23.28 mm (s.d. 1.52).

Bacteria isolated from diseased cockles as well as controls (*V. splendidus*-related from cockles 15/064 1T2 and *V. aestuarianus* oyster strain 02/041<sup>T</sup>) were grown at 20°C for 20 h in marine broth with constant shaking at 40 r.p.m. (Rotator SB3, Stuart). After an SASW wash, bacterial concentrations were evaluated spectrophotometrically at an optical density (OD)

**Table 5.** Fatty acid compositions (as percentage of the total fatty acids present) in *Vibrio aestuarianus* strains from cockles and oysters, *V. aestuarianus* type strain and related species

Strains: 1, *V. aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. 12/122 3T3<sup>T</sup>; 2, *V. aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. 02/041<sup>T</sup>; 3, *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov. LMG 7909<sup>T</sup>; 4, *V. furnisii* LMG 7910<sup>T</sup>; 5, *V. ordalii* LMG 13544<sup>T</sup>. TR, Trace; –, not detected. Values are percentages of total fatty acids.

Fatty acid	1	2	3	4	5
C <sub>12:0</sub>	4.4 (0.4)	4	3.2	6.7	–
C <sub>12:0</sub> 3-OH	2.1 (0.4)	3.4	1.3	6.1	4.5
iso-C <sub>14:0</sub>	1.2 (0.1)	2.1	TR	–	–
C <sub>14:0</sub>	4.8 (1.7)	8.7	4	4.5	5.9
iso-C <sub>16:0</sub>	4.1 (1.4)	5.4	5.6	TR	–
C <sub>16:0</sub>	18.6 (1.5)	16.3	13.4	12	19.2
C <sub>18:1</sub> ω7c	14.5 (2.7)	11.3	22.6	17.1	23.4
Summed feature 2	2.9 (1.6)	2.3	1.1	6.7	1.5
Summed feature 3	41.6 (1.8)	34.6	41.8	37.5	39.8

of 600 nm, adjusted to 0.4 and 0.04 and checked by plating. Cockles were anesthetized for 2 to 4 h in a magnesium chloride solution (MgCl<sub>2</sub>; Fluka) at a final concentration of 50 g l<sup>-1</sup> (1/4: v/v seawater/freshwater) under aeration. Subsequently, 50 μl bacterial suspension (10<sup>7</sup> c.f.u. to 10<sup>6</sup> per cockle) was injected into the adductor muscle. A group of cockles were injected with SASW to serve as negative controls. After injection, the cockles were transferred to tanks (triplicates of 10 cockles in 2l) filled with UV-treated, 1 μm-filtered seawater and maintained under static conditions at 20 °C with aeration. Mortality was monitored twice a day and any newly dead cockles were removed from the tanks over a 7 day period. Animals were considered to be dead when the valves did not close following stimulation.

After 24 h, cumulative mortalities ranged from 0–83% for cockles injected with *V. aestuarianus* cockle strains. Mortalities continued over 7 days, with a peak during the first 2 days. For all moribund cockles, the predominant bacterial isolates were obtained from muscle and haemolymph (205 strains screened from 116 animals, all belonging to *V. aestuarianus* species using the *dnal*-qPCR diagnosis assay). We also noticed the high levels of bacteria belonging to the *Splendidus* clade in 31 individuals. No mortality was noted in the control or in cockles injected with *V. splendidus*-related 15/064 1T2 or *V. aestuarianus* oyster strain 02/041<sup>T</sup>.

Garnier et al. [26] also tested the pathogenicity of 11 *V. aestuarianus* oyster strains and the *V. aestuarianus* type strain by injection of 10<sup>8</sup> bacteria per oyster. They observed mortality ranging between 2 and 55% depending on the oyster strain, whereas a low mortality (10%) was observed with the *V. aestuarianus* type strain. The same observation was made by Goudenège et al. [20], who classified oyster strains as either highly virulent for oysters (i.e. inducing > 50% mortalities

at 10<sup>2</sup> c.f.u. animal<sup>-1</sup>) or non-virulent (i.e. inducing < 50% mortalities at 10<sup>7</sup> c.f.u. animal<sup>-1</sup>).

In summary, *V. aestuarianus* isolates obtained from oysters or cockles present phenotypic and genetic traits distinct from the *V. aestuarianus* type strain and these differences support the separation of these oyster and cockle strains into two novel subspecies of *V. aestuarianus* distinct from *V. aestuarianus* LMG 7909<sup>T</sup> and other *V. aestuarianus* strains. Therefore, we propose that *V. aestuarianus* should be divided into three subspecies, for which the names *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* subsp. nov., *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov. and *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov. are proposed, with strains LMG 7909<sup>T</sup>, 02/041<sup>T</sup> and 12/122 3T3<sup>T</sup> as the type strains, respectively.

## EMENDED DESCRIPTION OF *VIBRIO AESTUARIANUS*

The characteristics modified or added to those reported in original descriptions by Tison and Seidler [25] are as follows:

*Vibrio aestuarianus* is a Gram-negative, oxidase-positive, motile bacterium. Colony morphology is variable according to the subspecies. Growth occurs on marine agar from 4 to 30 °C with an optimum between 20 and 25 °C and strains do not grow at 40 °C or in the absence of NaCl. Most strains utilize *N*-acetyl-D-glucosamine, β-galactosidase and produce indole. Strains ferment sucrose, D-mannose, D-fructose, D-glucose, D-galactose and trehalose. Strains are susceptible to ampicillin, erythromycin, chloramphenicol, kanamycin and tetracycline. The major fatty acids are C<sub>12:0</sub> (2.2–4.4%), C<sub>12:0</sub> 3-OH (1.3–3.4%), C<sub>14:0</sub> (4–8.7%), iso-C<sub>16:0</sub> (4.1–5.6%), C<sub>16:0</sub> (13.4–20.06%) and C<sub>18:1</sub> ω7c (11.3–22.6%).

The genome size is 3.9–4.5 Mb (GenBank genome accession number JAAZTU000000000) and the genomic DNA G+C content is 42.5–42.9 mol%.

The type strain is ATCC 35048<sup>T</sup> (=DSM 19606<sup>T</sup>=CAIM 592<sup>T</sup>=CCUG 28583<sup>T</sup>=CECT 625<sup>T</sup>=CIP 102971<sup>T</sup>=LMG 7909<sup>T</sup>=NBRC 15629<sup>T</sup>=NCMB 2236<sup>T</sup>). The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the genome of the type strain is JAAZTU000000000.

## DESCRIPTION OF *VIBRIO AESTUARIANUS* SUBSP. *AESTUARIANUS* SUBSP. NOV.

*Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* Tison and Seidler 1983 (a.es.tu.ri.a'nus. N.L. masc. adj. *aestuarianus*, pertaining to an estuary).

The description is essentially the same as that given above for the species *Vibrio aestuarianus*, with the following additions.

Colonies are opaque, 2–3 mm in diameter on marine agar after 24 h at 20 °C. It grows on TCBS, with 6% salt and at 37 °C. It has gelatinase and arginine dihydrolase activity and utilizes starch, D-ribose, maltose, cellobiose, glycogen and potassium gluconate. Among the three subspecies, it presents the highest

level of C<sub>18:1</sub>ω7c and the lowest level of C<sub>12:0</sub> 3-OH and iso-C<sub>14:0</sub> fatty acids. The type strain does not induce mortality of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The genome size is predicted around 4.2 Mb and genomic DNA G+C content is 42.6 mol% (GenBank genome accession number JAAZTU000000000).

The type strain is ATCC 35048<sup>T</sup> (=DSM 19606<sup>T</sup>=CAIM 592<sup>T</sup>=CCUG 28583<sup>T</sup>=CECT 625<sup>T</sup>=CIP 102971<sup>T</sup>=LMG 7909<sup>T</sup>=NBRC 15629<sup>T</sup>=NCMB 2236<sup>T</sup>).

## DESCRIPTION OF *VIBRIO AESTUARIANUS* SUBSP. *FRANCENSIS* SUBSP. NOV.

*Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* Garnier et al. 2008 (fran. cen'sis. N.L. masc. adj. *francensis*: of, or belonging to, France).

It displays typical characteristics for the species *V. aestuarianus*. Colonies are white and slightly opaque on marine agar and are less than 1 mm in diameter after 24 h at 20 °C. No strain can grow in the absence of NaCl or in the presence of 6% NaCl (except for strain 02/041<sup>T</sup>) or on TCBS. Growth occurs from 4–30 °C. Most strains have no arginine dihydrolyase and cannot use D-mannitol. Some strains use citrate. It presents the highest level of C<sub>16:0</sub> and C<sub>14:0</sub> and the lowest level of C<sub>18:1</sub>ω7c compared to the two other subspecies.

The majority of strains, including the type strain 02/041<sup>T</sup>, are pathogenic to the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, but the type strain is not pathogenic to edible cockles, *Cerastoderma edule*. The genome size is estimated around 4.18–4.53 Mb with the draft genomes, and genomic DNA G+C content is about 42.52–42.83 mol%.

The type strain is 02/041<sup>T</sup> (LMG 24517<sup>T</sup>=CIP 109791<sup>T</sup>), which was isolated from a diseased oyster maintained in the Argenton experimental hatchery (Ifremer, France). The GenBank genome accession number is JAAZTV000000000.

## DESCRIPTION OF *VIBRIO AESTUARIANUS* SUBSP. *CARDII* SUBSP. NOV.

*Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* (car'di.i. N.L. fam. *cardii* referring to *Cardium* – latin: cockle).

It displays typical characteristics for the species *V. aestuarianus*. Colonies are around 1 mm in diameter after 24 h at 20 °C. No strain can grow in the absence of NaCl and growth was poor on TCBS. Growth occurs from 4 to 30 °C, difficult at 37 °C and not at 40 °C. Strains can use D-mannitol and do not ferment potassium gluconate. Concerning its fatty acid composition, it presents a high level of C<sub>16:0</sub> and an intermediate level of other fatty acids. Some strains, including the type strain 12/122 3T3<sup>T</sup>, are pathogenic to the edible cockle *Cerastoderma edule* but the type strain is not pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas*.

The type strain is 12/122 3T3<sup>T</sup> (LMG 31436<sup>T</sup>=DSM 109723<sup>T</sup>), which was isolated from a diseased cockle sampled from a wild bed (Baie de Somme) in France. The GenBank genome accession number is JAAKZK000000000.

## Funding information

This work was supported by Ifremer; by DGAL (Direction Générale de l'Alimentation) through the REPAMO network and the National Reference Laboratory for Mollusc Diseases, Ifremer, La Tremblade; by DPMA (Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture) through MIRAGE project funding and by the European Commission through the European Union Reference Laboratory for Mollusc Diseases, Ifremer, La Tremblade. This work was also partly supported by the EU-funded project VIVALDI (Preventing and Mitigating Farmed Bivalve Diseases) H2020 program, no. 678 589.

## Acknowledgements

We wish to thank the coastal correspondents of the REPAMO network (particularly those at Boulogne sur Mer, Port en Bessin and Dinard) for their contribution of collecting and providing samples and related information. We also thank the hatchery and nursery teams of the Laboratory of Genetics and Pathology at Ifremer La Tremblade and Ifremer Bouin for their assistance with cockle production. We are also grateful to M. Thuillier and M. Le Piouffle from the laboratory LABOCEA, Mme Cauvin and Mme Benoît from the laboratory, LABEO-Manche and M. Treilles from the laboratory QUALYSE for their assistance with MALDI-TOF analyses.

## Author contributions

D.T., C.D., A.G.S., B.C., Y.G., D.S., C.G., A.M. and M.A.T. performed the experiments. L.D. produced and conserved the animals. M.A.T. and C.G. supervised the project. D.T., C.D., A.M., C.G. and M.A.T. analysed the data. M.A.T., A.M. and C.G. wrote the manuscript that was revised and approved by all the authors.

## Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- Longshaw M, Malham SK. A review of the infectious agents, parasites, pathogens and commensals of European cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*). *J Mar Biol Assoc U K* 2013;93:227–247.
- Ducrotoy JP, Rybarczyk H, Souprayan J, Bachelet G, Beukema JJ. A comparison of the population dynamics of the cockle (*Cerastoderma edule*, L.) in north-western Europe. *Proceedings of the Estuarine and Coastal Sciences Association Symposium*, 1989; 1989. pp. 173–184.
- Carrasco N, Hine PM, Durfort M, Andree KB, Malchus N et al. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 2013;412–413:223–230.
- Azevedo C, Cachola R. Fine structure of the Apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve mollusks. *Dis Aquat Organ* 1992;14:69–73.
- Ordas MC, Figueras A. Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (*Cerastoderma edule*) in Carril (Galicia, NW Spain). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 2005;25:124–130.
- Azevedo C. Some observations on an amoeba, destructive agent of the gills of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ* 1997;30:223–225.
- Azevedo C, Conchas RF, Montes J. Description of *Haplosporidium edule* n. sp. (phylum Haplosporidia), a parasite of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) with complex spore ornamentation. *Eur J Protistol* 2003;39:161–167.
- de Montaudouin X, Thieltges DW, Gam M, Krakau M, Pina S et al. Digenean trematode species in the cockle *Cerastoderma edule*: identification key and distribution along the north-eastern Atlantic shoreline. *J Mar Biol Assoc U K* 2009;89:543–556.
- Magalhães L, Correia S, de Montaudouin X, Freitas R. Spatio-Temporal variation of trematode parasites community in *Cerastoderma edule* cockles from RIA de Aveiro (Portugal). *Environ Res* 2018;164:114–123.
- Carrasco N, Rojas M, Aceituno P, Andree KB, Lacuesta B et al. *Perkinsus chesapeakei* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *J Invertebr Pathol* 2014;117:56–60.

11. Metzger MJ, Villalba A, Carballal MJ, Iglesias D, Sherry J et al. Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature* 2016;534:705–709.
12. Díaz S, Iglesias D, Villalba A, Carballal MJ. Long-Term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors and lethality. *J Fish Dis* 2016;39:1027–1042.
13. Barber BJ. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquat. Living Resour.* 2004;17:449–466.
14. Azevedo C. Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Organ* 1993;16:55–59.
15. Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* 2007;189:7932–7936.
16. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Feng G, Amin AR, Gao F, Amin AKM et al. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front Microbiol* 2013;4:414.
17. Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5107–5115.
18. Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:403–431.
19. Romalde JL, Dieguez AL, Lasa A, Balboa S. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol* 2014;4:413.
20. Goudenège D, Travers MA, Lemire A, Petton B, Haffner P et al. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ Microbiol* 2015;17:4189–4199.
21. Lemire A, Goudenège D, Versigny T, Petton B, Calteau A et al. Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters. *Isme J* 2015;9:1523–1531.
22. Lasa A, di Cesare A, Tassistro G, Borello A, Gualdi S et al. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environ Microbiol* 2019;21:4548–4562.
23. de Lorgeril J, Lucasson A, Petton B, Toulza E, Montagnani C et al. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* 2018;9:4215.
24. Travers M-A, Boettcher Miller K, Roque A, Friedman CS. Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* 2015;131:11–31.
25. Tison DL, Seidler RJ. *Vibrio aestuarianus*: a new species from estuarine waters and shellfish. *Int J Syst Bacteriol* 1983;33:699–702.
26. Garnier M, Labreuche Y, Nicolas J-L. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol* 2008;31:358–365.
27. Sautnier D, De Decker S, Tourbiez D, Travers MA. Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus*-related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. *J Microbiol Methods* 2017;140:67–69.
28. Sautnier D, De Decker S, Haffner P. 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* 2009;77:191–197.
29. Garcia C, Thébaud A, Dégremont L, Arzul I, Miossec L et al. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet Res* 2011;42:73.
30. Sautnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M et al. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microb Ecol* 2010;59:787–798.
31. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. megaX: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547–1549.
32. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–425.
33. Eck RV. *Dayhoff Mo: Atlas of Protein Sequence and Structure*. Maryland: Silver Springs; 1966.
34. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM BR, Kingston RE, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (editors). *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing and Wiley Interscience; 1987.
35. Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Evol Microbiol* 1989;39:224–229.
36. Mougín J, Flahaut C, Roquigny R, Bonnin-Jusserand M, Grard T et al. Rapid identification of *Vibrio* Species of the harveyi clade using MALDI-TOF MS profiling with main spectral profile database implemented with an in-house database: luvibase. *Front Microbiol* 2020;11:2494.
37. Rahmani A, Vercauteren M, Vranckx K, Boyen F, Bidault A et al. Maldi-Tof MS as a promising tool to assess potential virulence of *Vibrio tapetis* isolates. *Aquaculture* 2021;530:735729.
38. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–477.
39. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 2013;29:1072–1075.
40. Vallenet D, Calteau A, Dubois M, Amours P, Bazin A et al. Microscope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Res* 2020;48:579–589.
41. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J, Glöckner FO. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 2016;32:pii: btv681.
42. Kim M, Oh H-S, Park S-C, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;64:346–351.
43. Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A et al. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 2005;249:213–229.

## Données supplémentaires

Les figures et tableaux supplémentaires sont présentés en annexe 1 de ce manuscrit.

## Données supplémentaires à l'article 1 : Spectre d'hôte des sous-espèces *V. aestuarianus cardii* et *V. aestuarianus francensis*

### Introduction

Dans l'article 1, nous avons montré que plusieurs agents pathogènes ont émergé au sein de l'espèce *V. aestuarianus*. Ces agents pathogènes appartiennent à deux sous-espèces différentes: la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* contient de bactéries pathogènes pour les huîtres et la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* contient des bactéries pathogènes pour les coques. Afin de mieux comprendre le cycle et la biologie de ces deux sous-espèces, nous avons voulu déterminer leur spectre d'hôte.

Assez couramment, les tests de pathogénicité des bactéries à l'égard de bivalves sont effectués par injection (dans le muscle adducteur ou dans le péricarde). Bien que permettant des infections synchrones, cette méthode permet d'estimer la toxicité des bactéries (*i.e.* capacité à tuer une fois dans l'animal) plutôt que la pathogénicité réelle (*i.e.* capacité à infecter un animal et à le tuer). L'étape de colonisation initiale et plus précisément d'infection (*i.e.* pénétration dans les tissus) est une étape clé dans de nombreuses maladies, et en particulier celle induite par *V. aestuarianus francensis* : elle induit de très fortes mortalités quelle que soit la dose injectée (80-100%) sur différents lots d'animaux, mais n'induit que 6% de mortalités quand elle est transmise par l'eau (Azéma et al., 2015). Ces résultats démontrent l'importance de la première étape d'infection dans la pathogénicité de *V. aestuarianus francensis* chez l'huître (Figure 18).

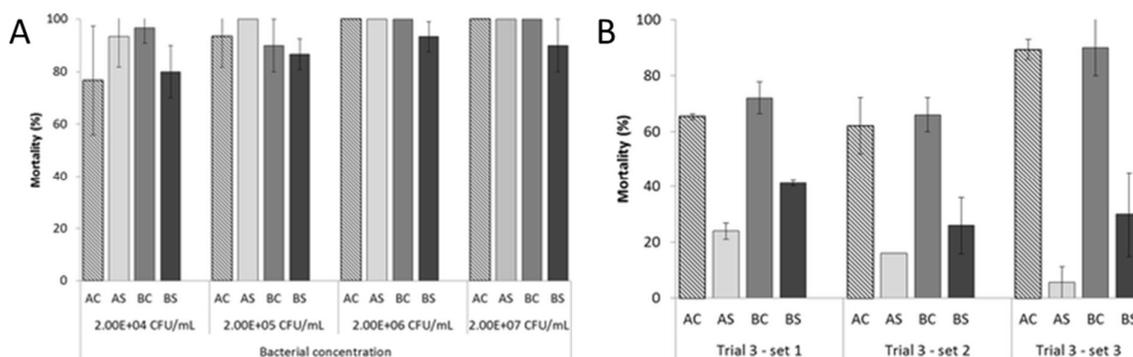


Figure 18 : Mortalités moyennes d'huîtres juvéniles infectées par (A) injection intramusculaire de *V. aestuarianus* et (B) cohabitation avec des huîtres infectées par *V. aestuarianus*. Les huîtres testées appartenaient à deux lignées A et B. Il s'agissait d'individus contrôles (AC et BC) et d'individus sélectionnés pour leur résistance au virus OshV-1. En injection, plusieurs concentrations bactériennes ont été testées entre 2.104 et 2.107 UFC/mL d'hémolymphe.

Parizadeh et al. ont observé que *V. aestuarianus* était transmise en milieu naturel d'un individu à l'autre en tant que bactérie libre en suspension dans l'eau (Parizadeh et al., 2018). Afin d'adopter un mode d'infection plus réaliste, dans notre étude, nous avons choisi de placer des animaux donneurs infectés par injection en cohabitation avec des animaux receveurs (=protocole de cohabitation), s'assurant ainsi la reproduction de l'ensemble des étapes de la maladie. La mortalité de ces animaux receveurs a été suivie et leurs tissus ont été échantillonnés. Ce mode d'infection a été utilisé pour déterminer la capacité de colonisation et la virulence de *V. aestuarianus* envers cinq espèces de bivalves qui présentent un intérêt commercial et que l'on peut trouver à proximité des parcs à huîtres ou des gisements de coques.

Il s'agit d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*), d'huîtres plates (*Ostrea edulis*), de moules (*Mytilus edulis*), de palourdes (*Ruditapes philippinarum*) et de coques (*Cerastoderma edule*), qui ont été produites et conservées en milieu contrôlé, dans les installations sécurisées de l'Ifremer.

Afin de mieux comprendre la dynamique des infections ainsi que les voies d'entrée des pathogènes, plusieurs tissus ont été échantillonnés (manteau, branchie, muscle, glande digestive et hémolymphe). Deux souches de *V. aestuarianus* ont été choisies : la souche 02/041, représentative de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* et la souche 12/122 3T3, représentative de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*. Les infections par cohabitation et les quantifications de *V. aestuarianus* dans les tissus des animaux ont été obtenus dans le cadre des stages réalisés par **Amélie Gonçalves de Sa** ("Caractérisation de la sensibilité de certaines espèces de mollusques marins à des souches bactériennes de *Vibrio aestuarianus*") et **Gabriel Bonnefoy** ("Étude par des approches moléculaires du spectre d'hôte de la bactérie pathogène *Vibrio aestuarianus*"). De plus, dans l'article 1, la toxicité d'isolats d'huîtres à l'égard des coques n'a été testée qu'avec une souche (02/041). Afin de compléter les données de virulence de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* vis-à-vis des coques, des tests par injection dans le muscle de coques à partir de suspensions bactériennes de souches *V. aestuarianus francensis* ont été réalisés. Pour terminer, la toxicité des souches de coques à l'égard des huîtres est restée inexplorée. Nous avons donc réalisé des tests par injection dans le muscle d'huîtres à partir de suspensions bactériennes de souches *V. aestuarianus cardii*.

## Matériel et méthodes

### Souches de *V. aestuarianus*

Lors des tests par cohabitation, deux souches représentatives des sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii* ont été choisies. Il s'agit de la souche 02/041 (*V. aestuarianus francensis*), isolée à Argenton en 2002 lors d'un épisode de mortalité d'huîtres et utilisée comme souche type pour décrire la sous-espèce. Lors des tests de virulence réalisés par Garnier et ses collaborateurs (Garnier et al., 2007, 2008), cette souche a présenté des niveaux de toxicité élevés à l'égard des huîtres. La souche représentative de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* est 12/122 3T3, isolée en 2012, en baie de Somme, lors de mortalités de coques. Cette souche a entraîné des mortalités élevées de coques lors de tests de toxicité par injection, comme présenté dans l'article 1.

Pour la réalisation des tests de virulence par injection, nous avons utilisé les souches présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Souches de *V. aestuarianus* utilisées pour les tests par injection

Souche	Sous-espèce	Pays	Région	Année
12-122-3T3	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Hauts-de-France	2012
15-064-4T2	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Bretagne	2015
15-061-1T1	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Normandie	2015
15-075-3T2	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Hauts-de-France	2015
19-040-1T1	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Hauts-de-France	2019
21-072-1T1	<i>V. aestuarianus cardii</i>	France	Hauts-de-France	2021
02-041	<i>V. aestuarianus francensis</i>	France	Bretagne	2002
07-115	<i>V. aestuarianus francensis</i>	France	Bretagne	2007
04-091-1T1	<i>V. aestuarianus francensis</i>	France	Poitou-Charentes	2004
12-016	<i>V. aestuarianus francensis</i>	France	Poitou-Charentes	2012
01-308	<i>V. aestuarianus francensis</i>	France	Normandie	2001
03-008T	<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	USA	Oregon	1983
16-055-1T1	<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	France		2016
U29	<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	Italie	Veneto	2012
U36	<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	Italie	Veneto	2012
U40	<i>V. aestuarianus aestuarianus</i>	Italie	Veneto	2012

### Animaux

Les animaux utilisés dans les tests par balnéation sont des huîtres creuses (*C. gigas*), des huîtres plates (*Ostrea edulis*), des moules bleues (*Mytilus* sp.), des palourdes (*Ruditapes philippinarum*) et des coques (*Cerastoderma edule*). Ils étaient tous âgés de 1 an et ont été produits dans les installations expérimentales de La Tremblade (production de L. Dégremont).

Avant toute infection, au sein de chaque espèce de bivalves, 30 animaux ont fait l'objet d'analyses bactériologiques et de biologie moléculaire afin de vérifier qu'ils n'étaient pas porteurs de souches

de *V. aestuarianus*, de souches de *V. splendidus* et de virus OsHV-1. Pour les analyses bactériologiques, pour chaque individu, un morceau de branchie, de muscle adducteur et de manteau ont été prélevés, puis broyés au piston pellet dans de l'eau de mer stérile. Les broyats ont été rapidement centrifugés pour éliminer les débris principaux puis les surnageant ont été étalés sur milieu nutritif (Marine Agar) après dilution à  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . Après 48 à 72h d'incubation, l'ensemble des types de colonies obtenus ont été prélevées et suspendues (pointe d'un cure-dent) dans de l'eau de mer stérile pour une extraction de l'ADN total à 98°C pendant 10 minutes. Pour la recherche du virus OsHV-1, pour chaque individu, 20 à 25 mg de branchie, de muscle adducteur et de manteau ont été prélevés, puis lysés à 56°C pendant une nuit en présence de protéinase K (20 mg/ml). L'ADN total a été extrait à l'aide du kit QIAmp DNA kit (Qiagen). La concentration en ADN total extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Fisher). Les détections de *V. aestuarianus*, de *V. splendidus* ont été réalisées grâce aux protocoles de qPCR développés par Saulnier et ses collaborateurs (Saulnier et al., 2009, 2017). La détection du virus OsHV-1 a été réalisée grâce au protocole de qPCR développé par Martenot et ses collaborateurs (Martenot et al., 2011). L'ensemble des réactions d'amplifications ont été réalisées sur des thermocycleurs Mx3000 et Mx3005 (Agilent) en duplicat. Les protocoles des réactions d'amplification sont résumés dans le tableau 2.

Les animaux utilisés pour les tests par injection sont des huîtres et des coques produites en condition contrôlée au sein de la station IFREMER de la Tremblade, âgés de 1 an (production de L. Dégremont).

### **Préparation des suspensions bactériennes**

Les souches bactériennes ont été mises en culture liquide sous agitation constante, à 22°C pendant 24h dans du milieu Zobell. Les cultures ont été lavées par centrifugation (10 min, 1500g) puis resuspendues dans de l'eau de mer artificiel stérilisée, de façon à obtenir un  $DO_{600nm} = 1$ . La concentration et la pureté des suspensions ont été vérifiées en étalant systématiquement des dilutions sur milieu Zobell agar.

### **Protocole d'infection par cohabitation**

50 µL de suspension bactérienne ont été injectés dans le muscle adducteur des animaux donneurs, auparavant anesthésiés. Après l'injection, les animaux donneurs ont été placés dans des aquarium avec des animaux receveurs pendant deux jours. Ainsi trois huîtres donneuses infectées par la souche 02/041 ont été mises en cohabitation avec dix moules dans un premier bac, dix coques dans un deuxième bac, dix palourdes dans un troisième bac, dix huîtres plates dans un quatrième bac et dix huîtres creuses dans un cinquième bac. Le même plan a été utilisé avec des coques donneuses infectées par 12/122 3T3. Chaque cohabitation a été réalisée en

duplicat. A l'issue de cette cohabitation, les animaux receveurs ont été placés dans des béciers individuels pour un suivi des mortalités pendant 14 jours. La quantité de bactéries dans l'eau contaminée a été estimée par qPCR en dosant la quantité d'ADN bactérien dans l'eau de mer à J1 et J2 post-injection.

### **Quantification de *V. aestuarianus* dans les tissus et l'hémolymphe des animaux receveurs**

L'hémolymphe de chaque individu a été prélevée et l'ADN total a été extrait de 100 µL en utilisant le kit Qiagen QiaAmp. Chaque individu receveur a été décoquillé et un morceau de muscle, de branchie, de manteau et de glande digestive ont été prélevés. L'ADN total a été extrait à partir de 20 à 25 mg de tissus en utilisant le kit DNeasy 96 Blood & Tissue (Qiagen). La concentration en ADN total extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Fisher). Les détections de *V. aestuarianus* ont été réalisées grâce aux protocoles de qPCR développés par Saulnier et ses collaborateurs (Saulnier et al., 2009). L'ensemble des réactions d'amplifications ont été réalisées sur des thermocycleurs Mx3000 et Mx3005 (Agilent) en duplicat. Le protocole de la réaction d'amplification est résumé dans le tableau 2.

### **Estimation de la toxicité bactérienne par injection**

50 µL de suspension bactérienne diluée à  $DO_{600nm} = 0,1$  ( $10^7$  UFC) ont été injectés dans le muscle adducteur des animaux, auparavant anesthésiés. Après l'injection, les animaux ont été transférés dans des aquariums (10 animaux par aquarium de 2,5L, aquarium en duplicats pour chaque souche) contenant 2 L d'eau de mer traitée aux UV, et aérée, à 22°C. Le suivi des mortalités a été réalisé pendant 5 jours.

Tableau 2 : Protocoles d'amplification

Agent pathogène	Amorces (5'-3')	Sonde (5'-3')	Mix de PCR	Cycles	Référence
<i>V. aestuarianus</i>	DNAj-F GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA, DNAj-R CAATTTCTTTTGAACAACCAC -> 276 bp	DNAj TGGTAGCGCA GACTTCGGCGAC	5 µL d'ADN extrait (ajusté à 5 ng.µL-1), 10 µL d'Ultra-Fast Master Mix Brillant III (Agilent), 0.060 µL de chaque amorce à 100 µM, 0.040 µL de sonde à 100 µM , et 4.84 µL d'eau milliQ (volume total de 20µL)	3 min de dénaturation à 95°C, suivies de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 10 secondes et à 60°C pendant 20 secondes	(Saulnier et al., 2009)
<i>V. Splendidus</i>	16S SpF2 5'- ATCATGGCTCAGATTGAACG 16S SpR2 5'- CAATGGTTATCCCCCACATC -> 152 bp	16S CCCATTAACGCACC CGAAGGATTG	5 µL d'ADN extrait (ajusté à 5 ng.µL-1), 10 µL d'Ultra-Fast Master Mix Brillant III (Agilent), 0.060 µL de chaque amorce à 100 µM, 0.040 µL de sonde à 100 µM , et 4.84 µL d'eau milliQ (volume total de 20µL)	3 min de dénaturation à 95°C, suivies de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 10 secondes et à 60°C pendant 20 secondes	(Saulnier et al., 2017)
OsHV-1	OsHV1BF GTGCGATCTTTGGATTTAACAA B4 ACTGGGATCCGACTGACAAC -> 103 bp	B TGCCCCTGTCATCTTG AGGTATAGACAATC	5 µL d'ADN extrait (ajusté à 5 ng.µL-1), 10 µL d'Ultra-Fast Master Mix Brillant III (Agilent), 0.080 µL de chaque amorce à 100 µM, 0.040 µL de sonde à 100 µM , et 4.84 µL d'eau milliQ (volume total de 20µL)	3 min de dénaturation à 95°C, suivies de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 15 secondes et à 60°C pendant 20 secondes	(Martenot et al., 2011)

## Résultats et discussion

### **Sensibilité des différentes espèces de bivalve face à *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii* : Mortalités des animaux receveurs**

Dans notre première expérience, la cohabitation avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041 a entraîné des mortalités faibles des huîtres creuses et plates receveuses (respectivement jusqu'à 20% et 10%) à partir du cinquième jour après la fin des cohabitations (Figure 19.A). La dynamique et les niveaux de mortalité observés chez les huîtres creuses étaient inattendus. Une expérimentation similaire avait été réalisée (Parizadeh et al., 2018) avec la souche 12/016, appartenant au même clade que la souche 02/041 (Goudenège et al., 2015) et présentant une toxicité équivalente à celle de 02/041 par injection (Goudenège et al., 2015). Lors de cette expérimentation, la mortalité des huîtres receveuses avait commencé dès trois jours après immersion dans l'eau contaminée, et la mortalité cumulée avait atteint 40% des animaux. Parmi les hypothèses pouvant expliquer ce résultat, nous pouvons envisager que la bactérie n'a pas été suffisamment excrétée par les animaux donneurs. Cette expérimentation a donc été reproduite avec cette souche, mais les animaux fouisseurs (coques et palourdes) sont difficiles à maintenir dans les installations IFREMER. Il n'a donc pas été possible de tester tous les animaux, seulement les huîtres creuses et les huîtres plates, chez qui les mortalités ont commencé respectivement après 7 et 9 jours, pour atteindre des mortalités cumulées de 30 à 75% (Figure 19.B). La cohabitation avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041 n'a entraîné aucune mortalité parmi les moules, les coques et les palourdes receveuses. Malheureusement, compte-tenu des faibles mortalités observées chez les huîtres creuses dans la première expérimentation, nous ne pouvons écarter la possibilité que les conditions expérimentales n'étaient pas propices au développement de la maladie liée à 02/041.

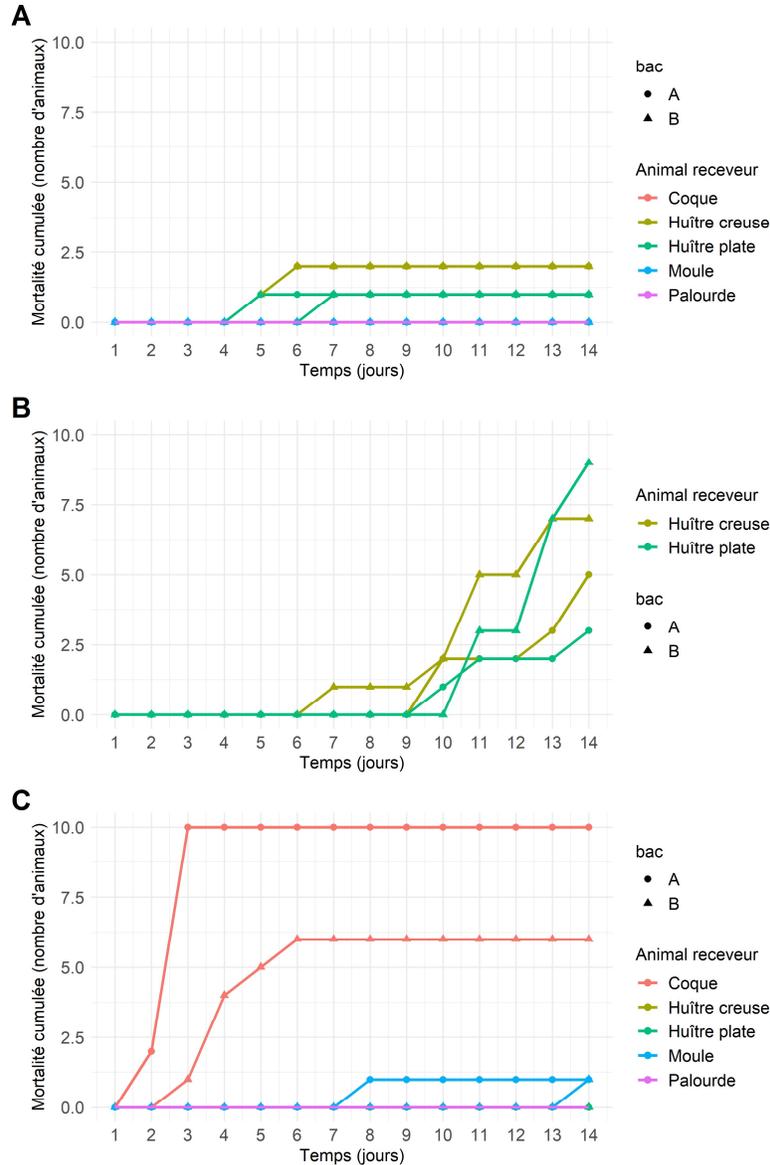


Figure 19 : Evolution du nombre d'individus morts observé dans des lots d'huîtres creuses, d'huîtres plates, de coques, de moules et de palourdes, placées en cohabitation avec des huîtres infectées. **A et B** : par la souche 02/041 (2 expériences indépendantes) et **C** : des coques infectées par la souche 12/122 3T3. Chaque expérimentation a été réalisé en duplicat (bacs A et B).

La cohabitation avec des coques infectées par la souche 12/122 3T3 a entraîné des mortalités rapides (dès de premier jour après la fin des cohabitations) et importantes des coques receveuses, jusqu'à 80% (Figure 19.C). Aucune mortalité n'a été observée parmi les autres espèces de bivalves, à part un unique individu chez les moules, huit jours après la fin des cohabitations, probablement non liée à la bactérie. Compte-tenu de la dynamique et du fort niveau de mortalité observés chez les coques avec cette souche, nous pouvons conclure à l'innocuité de *V. aestuarianus cardii* vis-à-vis des autres animaux ici testés.

## Prévalences et charges bactériennes chez les animaux receveurs, infection par la souche *V. aestuarianus francensis* 02/041

Dans l'objectif d'évaluer la capacité de *V. aestuarianus* à infecter et coloniser différentes espèces de bivalves, sans forcément induire de maladie, la présence d'ADN bactérien a été évaluée dans les animaux vivants prélevés à la fin de l'expérimentation n°1.

La souche *V. aestuarianus francensis* 02/041, n'a pas été retrouvée chez les palourdes et les moules mises en contact avec les huîtres donneuses, suggérant qu'elle ne peut pas infecter ces animaux. Quelques concentrations faibles ont été observées dans les tissus des coques, suggérant que la bactérie peut infecter l'animal, sans coloniser l'ensemble des tissus (Tableau S1). Concernant les huîtres creuses, peu d'animaux receveurs ont été infectés (Figure 20), expliquant les faibles pourcentages de mortalité (Figure 19). Sans surprise, tous les animaux moribonds étaient infectés et colonisés (Figure 20). Pour ces animaux, le prélèvement d'un volume suffisant hémolymphe n'a pas été possible pour quantifier la bactérie par biologie moléculaire. Néanmoins, l'étalement de dilutions d'hémolymphe nous a permis d'y valider la présence de fortes concentrations de *V. aestuarianus*. Quelques animaux vivants étaient infectés, avec des charges bactériennes élevées (Figure 20), laissant supposer qu'une dégradation de leur état physiologique serait apparue quelques jours plus tard. Ainsi, la dynamique des mortalités chez les huîtres creuses est apparue plus lente qu'attendu (Parizadeh et al., 2018), certainement de par une trop faible dose dans l'eau de mer lors de l'infection initiale du lot.

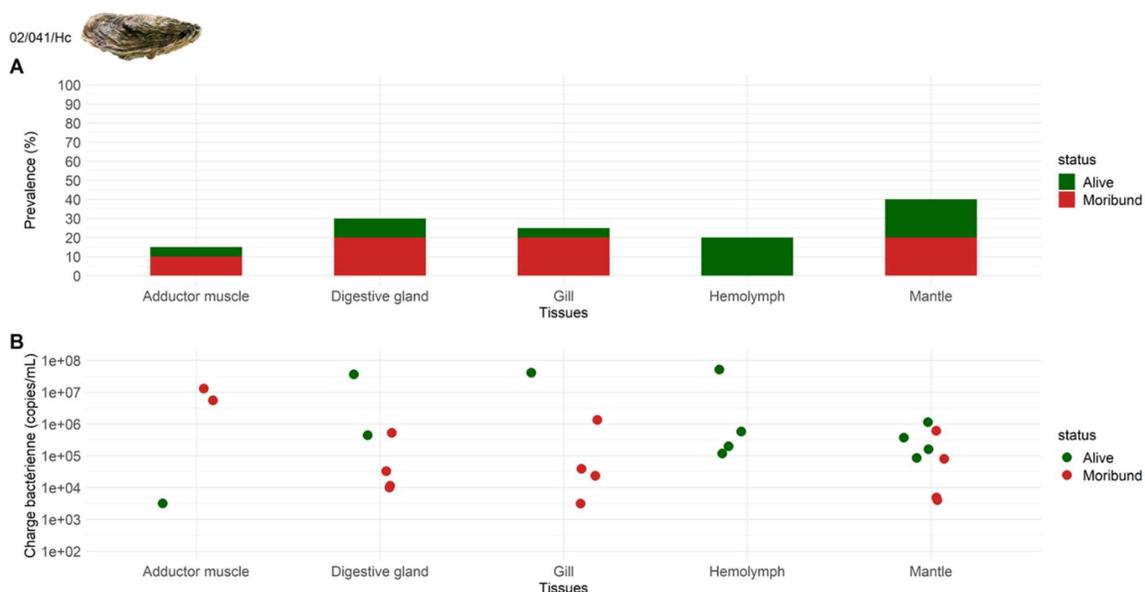


Figure 20 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires d'huîtres creuses receveuses, mise en contact avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041 (Figure 19.A).

Chez les huîtres plates, la prévalence est restée faible et la plupart des animaux infectés étaient moribonds (Figure 21).

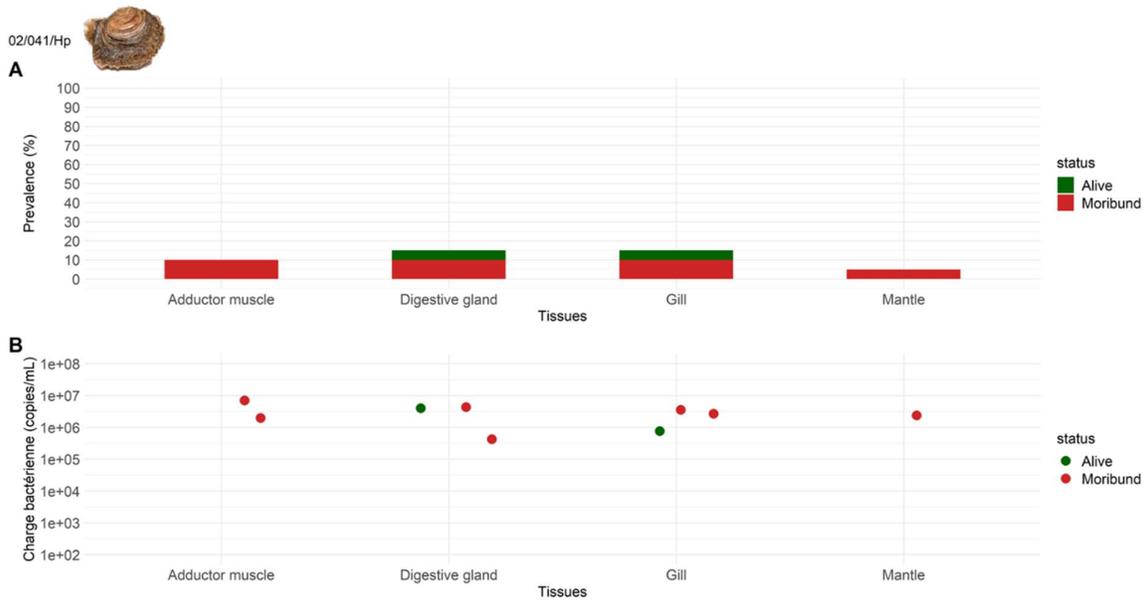


Figure 21 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires d'huîtres plates receveuses, mise en contact avec des huîtres creuses infectées par la souche 02/041 (Figure 19.A).

Les résultats présentés ont ceux obtenus dans les premières expérimentations. Ils seront complétés par les analyses des tissus prélevés lors de la deuxième expérimentation (Figure 19.B) afin de conclure sur la capacité de la souche 02/041 à coloniser les différents tissus des huîtres creuses et plates.

### Prévalences et charges bactériennes chez les animaux receveurs, infection par la souche *V. aestuarianus cardii* 12/122 3T3

Les prévalences bactériennes chez les huîtres plates, les palourdes et les moules mises en contact avec des coques donneuses infectées par 12/122 3T3 étaient nulles, suggérant que cette souche ne peut pas infecter ces animaux. Concernant les coques, compte-tenu des niveaux de mortalité (Figure 19), au moins 80% des animaux ont été infectés. La bactérie s'est multipliée dans tous les tissus (Figure 22), entraînant des mortalités élevées.

Chez les individus moribonds, la quantité de *V. aestuarianus* semble variable selon les individus et les tissus, très certainement à cause de problèmes d'inhibitions de PCR sur les

ADN de bivalves fouisseurs, ce qui ne nous permet pas de conclure sur le tissu cible de cette bactérie.

Il faut noter que les prélèvements d'hémolymphe n'ont pas pu être réalisés en quantité suffisante chez les animaux moribonds (à cause de la dégradation tissulaire rapide chez les coques) pour réaliser des quantifications par biologie moléculaire. Néanmoins, une analyse bactériologique a été effectuée sur tous les individus, ce qui a permis de valider la présence systématique du pathogène chez tous les individus moribonds sous sa forme viable et cultivable.

Quelques animaux vivants étaient infectés par la bactérie, avec des charges assez élevées (figure 4,B), ce qui laisse penser que ces animaux sont tolérants à la bactérie, ou qu'ils ont été prélevés avant de mourir.

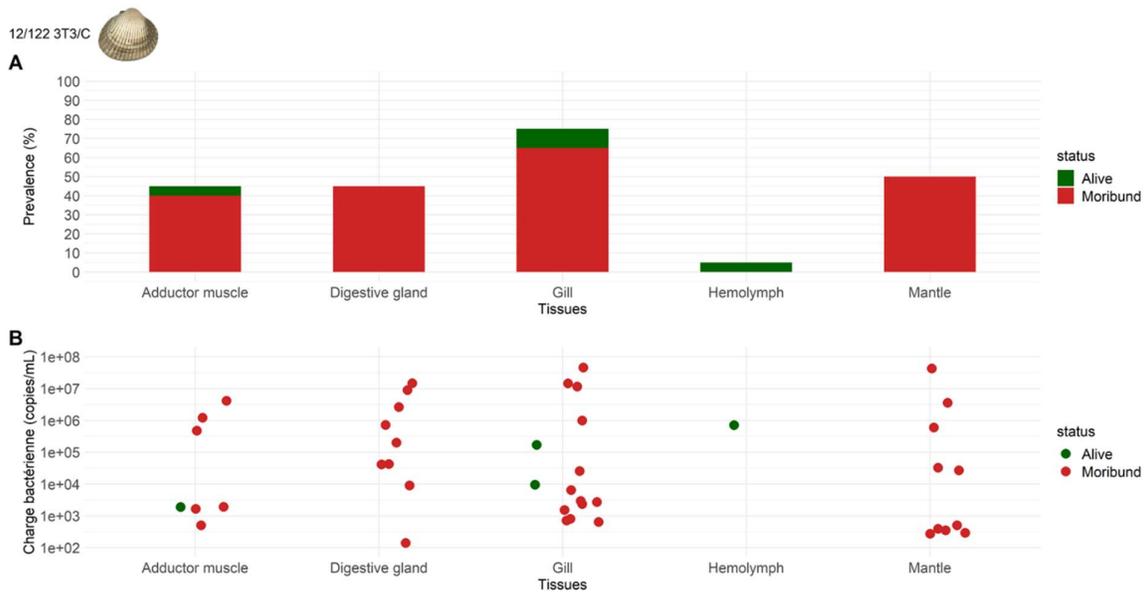


Figure 22 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires de coques receveuses, mise en contact avec des coques infectées par la souche 12/122 3T3.

De manière surprenante, la prévalence était importante chez les huîtres creuses receveuses (Figure 23), bien qu'aucune mortalité n'ait été constatée dans cette condition. Chez la plupart des animaux, la présence de la bactérie se limitait à l'hémolymphe et aux branchies. Mais chez quelques animaux, des concentrations importantes ont été observées dans le muscle adducteur, la glande digestive et le manteau, suggérant que la bactérie est parfois capable de se propager dans l'ensemble des tissus.

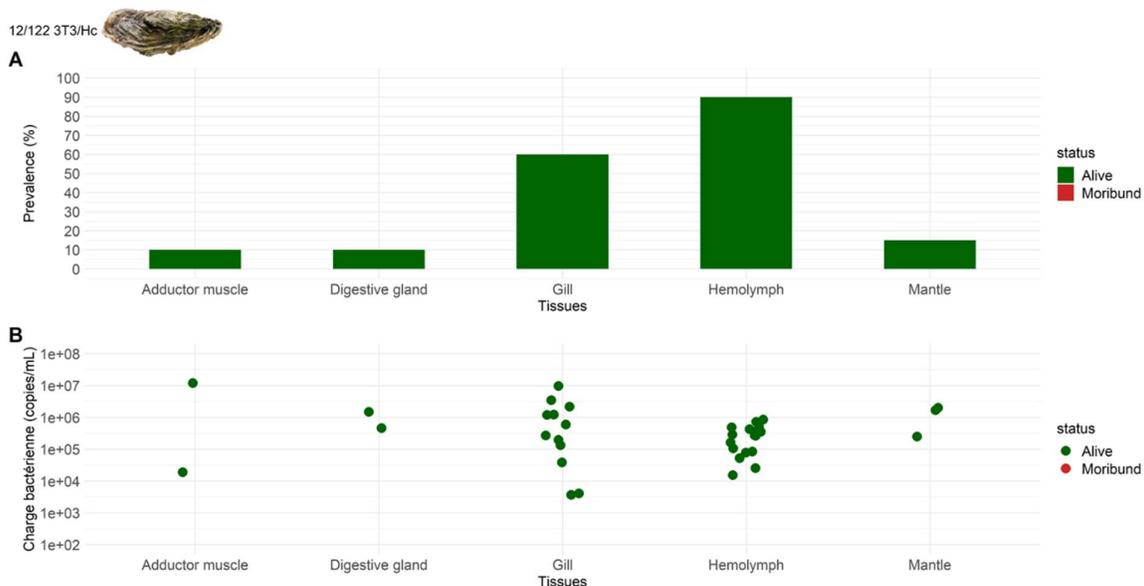


Figure 23 : A : Prévalence et B : charges bactériennes tissulaires de huîtres creuses receveuses, mise en contact avec des coques infectées par la souche 12/122 3T3.

Ces résultats suggèrent que les huîtres creuses pourraient servir de réservoir à la souche 12/122 3T3 ou tout au moins qu'elle serait capable de porter la bactérie au niveau de ses branchies ou dans son hémolymph. Sa stabilité dans le temps devra être évaluée, de même que son existence en milieu naturel sur des sites où les deux espèces de bivalves sont présentes.

### Infections croisées

Afin de compléter les données de toxicité des souches *V. aestuarianus francensis* à l'égard des coques et la toxicité de souches *V. aestuarianus cardii* à l'égard des huîtres, nous avons procédé à des tests de virulence par injection. Lors des tests par cohabitation, la souche 12/122 3T3 a été capable d'infecter les huîtres, sans entraîner de mortalité. Les tests réalisés par injection confirment que les souches de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* n'entraînent qu'une mortalité limitée des huîtres infectés, même lorsqu'elles sont présentes dans leurs tissus. Ce résultat a été obtenu avec 4 souches différentes, dont la souche 12/122 3T3 (Figure 24).

Lors des tests par cohabitation, la souche 02/041 était apparue incapable d'infecter les coques. De plus, les tests par injection montrent que cette souche, ainsi que les autres souches de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* testées, n'entraînent pas de mortalité importante des huîtres creuses.

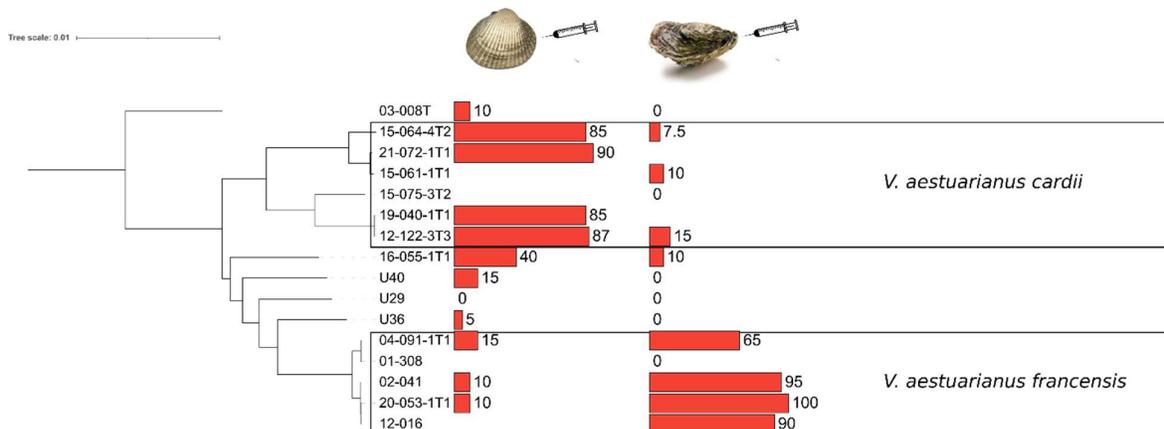


Figure 24 : Relations phylogénétiques entre des souches *V. aestuarianus* et mortalités d’huîtres creuses et de coques injectées avec ces souches.

La virulence des souches de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* semble limitée aux coques alors que celle des souches de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* semble limitée aux huîtres creuses. Toutes les souches n’ont pas été testées sur les deux espèces de bivalves. L’absence de valeur indique l’absence de test.

## Conclusions

Ces résultats montrent une spécificité d’hôte différente pour les deux sous-espèces, les huîtres pour *V. aestuarianus francensis* et les coques pour *V. aestuarianus cardii*.

Il s’agit des premiers résultats montrant que *V. aestuarianus francensis* peut tuer des huîtres plates *O. edulis*. Il est également à noter que des souches de *V. aestuarianus francensis* du clade B ont été isolées à partir d’huîtres plates en 2004, en Charente-Maritime, pendant des mortalités dans une éclosérie (souches 04/091). Cette souche est virulente envers les huîtres creuses. Il apparaît que les souches des clades A et B de *V. aestuarianus francensis* sont pathogènes pour les huîtres creuses et pour les huîtres plates, qui font toutes les deux parties de l’ordre des Ostréidés dans la sous-classe des Ptériomorphes (Figure 25). La souche 02/041 semble donc spécialisée avec un habitat et une gamme d’hôtes sensibles limitée aux bivalves appartenant à ce groupe taxonomique. La souche 12/122 3T3 peut infecter mais aussi coloniser l’hémolymphe de l’huître creuse en plus de coques, qui fait partie de l’ordre des Cardiidés dans la sous-classe des Hétérodontes (Figure 25). Ce résultat est corroboré par l’isolement d’une souche appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, à partir de tissus d’huîtres sur le site de Castlemain Harbour dans le sud-ouest de l’Irlande en 2009 (souche MI-24/09 isolée par Deborah Cheslett (Irish Marine Institute)). Elle est capable de coloniser deux hôtes qui sont plus distants génétiquement, et apparaît donc comme étant plus généraliste, avec une gamme d’habitat plus large que celle de 02/041. Cependant, aucune mortalité n’est observée chez les huîtres infectées quel que soit le mode d’infection utilisé. Ces résultats suggèrent que les huîtres creuses peuvent servir de réservoir à la souche

12/122 3T3, même si la force et les conséquences de cette association restent à déterminer. Compte-tenu des nombreux transferts d'animaux inhérents à l'ostréiculture en Europe (Legué & Prou, 2012; Pernet et al., 2016), cela soulève la question du risque de propagation de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* à grande échelle.

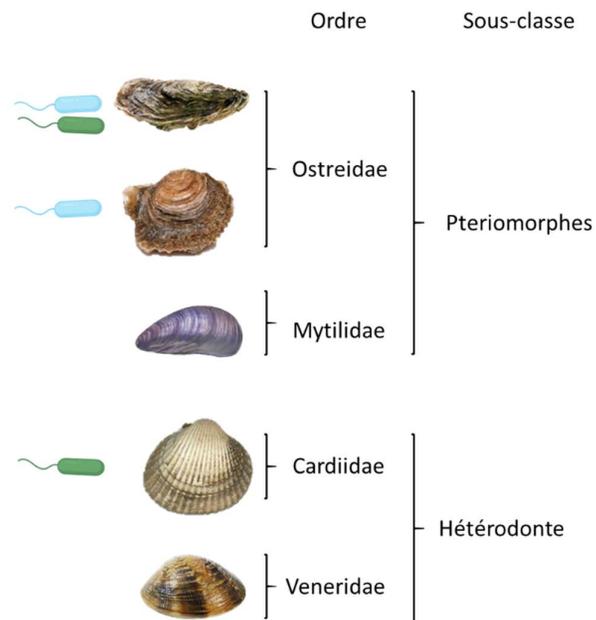


Figure 25 : Synthèse des résultats obtenus et taxonomie des bivalves testés.  
 En bleu : *V. aestuarianus francensis* 02/041 ; en vert : *V. aestuarianus cardii* 12/122 3T3

## Données supplémentaires : Charges bactériennes mesurées dans les tissus des animaux receveurs

Animal receveur	Souche	Tissus	Status	Nombre d'animaux positifs/ nombre d'animaux analysés (charge moyenne en nb copies/25 ng d'ADN)
<i>C. gigas</i>	02/041	Branchie	Vivant	1/16 (4,1.10 <sup>7</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Glande digestive	Vivant	2/16 (1,8.10 <sup>7</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Hémolymphe	Vivant	4/16 (1,3.10 <sup>7</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Manteau	Vivant	4/16 (4,4.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Muscle adducteur	Vivant	1/16 (3,2.10 <sup>3</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Branchie	Moribond	4/4 (3,5.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Glande digestive	Moribond	4/4 (1,5.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Hémolymphe	Moribond	Non analysé
<i>C. gigas</i>	02/041	Manteau	Moribond	4/4 (1,7.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	02/041	Muscle adducteur	Moribond	2/4 (1,8.10 <sup>7</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Branchie	Vivant	1/18 (7,7.10 <sup>5</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Glande digestive	Vivant	1/18 (4,0.10 <sup>6</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>O. edulis</i>	02/041	Manteau	Vivant	0/18
<i>O. edulis</i>	02/041	Muscle adducteur	Vivant	0/18
<i>O. edulis</i>	02/041	Branchie	Moribond	2/2 (3,1.10 <sup>6</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Glande digestive	Moribond	2/2 (2,4.10 <sup>6</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Hémolymphe	Moribond	Non analysé
<i>O. edulis</i>	02/041	Manteau	Moribond	1/2 (2,4.10 <sup>6</sup> )
<i>O. edulis</i>	02/041	Muscle adducteur	Moribond	2/2 (4,4.10 <sup>6</sup> )
<i>C. edule</i>	02/041	Branchie	Vivant	1/20 (6,6.10 <sup>6</sup> )
<i>C. edule</i>	02/041	Glande digestive	Vivant	0/20
<i>C. edule</i>	02/041	Hémolymphe	Vivant	0/20
<i>C. edule</i>	02/041	Manteau	Vivant	3/20 (1,5.10 <sup>7</sup> )
<i>C. edule</i>	02/041	Muscle adducteur	Vivant	1/20 (7,6.10 <sup>5</sup> )
<i>Mytilus sp.</i>	02/041	Branchie	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	02/041	Glande digestive	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	02/041	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>Mytilus sp.</i>	02/041	Manteau	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	02/041	Muscle adducteur	Vivant	0/20
<i>R. philippinarum</i>	02/041	Branchie	Vivant	0/20
<i>R. philippinarum</i>	02/041	Glande digestive	Vivant	0/20
<i>R. philippinarum</i>	02/041	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>R. philippinarum</i>	02/041	Manteau	Vivant	0/20
<i>R. philippinarum</i>	02/041	Muscle adducteur	Vivant	0/20

<i>Animal receveur</i>	Souche	Tissus	Status	Nombre d'animaux positifs/ nombre d'animaux analysés (charge moyenne en nb copies/25 ng d'ADN)
<i>C. gigas</i>	12/122 3T3	Branchie	Vivant	12/20 (1,6.10 <sup>6</sup> )
<i>C. gigas</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Vivant	2/20 (9,8.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Vivant	18/20 (3,0.10 <sup>5</sup> )
<i>C. gigas</i>	12/122 3T3	Manteau	Vivant	3/20 (1,3.10 <sup>6</sup> )
<i>C. gigas</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Vivant	2/20 (6,1.10 <sup>6</sup> )
<i>O. edulis</i>	12/122 3T3	Branchie	Vivant	0/20
<i>O. edulis</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Vivant	0/20
<i>O. edulis</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>O. edulis</i>	12/122 3T3	Manteau	Vivant	0/20
<i>O. edulis</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Vivant	0/20
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Branchie	Vivant	2/4 (9,0.10 <sup>4</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Vivant	0/4
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Vivant	1/4 (7,1.10 <sup>5</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Manteau	Vivant	0/4
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Vivant	1/4 (1,9.10 <sup>3</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Branchie	Moribond	13/16 (5,6.10 <sup>6</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Moribond	9/16 (3,0.10 <sup>6</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Moribond	Non analysé
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Manteau	Moribond	10/16 (4,7.10 <sup>6</sup> )
<i>C. edule</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Moribond	8/16 (7,3.10 <sup>5</sup> )
<i>Mytilus sp.</i>	12/122 3T3	Branchie	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>Mytilus sp.</i>	12/122 3T3	Manteau	Vivant	0/20
<i>Mytilus sp.</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Vivant	0/20
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Branchie	Vivant	0/19
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Vivant	1/19 (2,8.10 <sup>2</sup> )
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Vivant	Non analysé
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Manteau	Vivant	0/19
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Vivant	0/19
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Branchie	Moribond	0/1
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Glande digestive	Moribond	0/1
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Hémolymphe	Moribond	Non analysé
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Manteau	Moribond	0/1
<i>R. philippinarum</i>	12/122 3T3	Muscle adducteur	Moribond	0/1

## Chapitre 2 : Émergence et expansion clonale de lignées pathogènes d'huîtres chez *V. aestuarianus* à l'échelle européenne

Les populations, définies comme des groupes monophylétiques partageant la même niche écologique, sont façonnées par les forces évolutives telles que la recombinaison, les mutations, les pressions de sélection qui s'exercent sur elles. Or, ces forces évolutives sont fortement liées à la niche écologique de ces populations.

Concernant les populations de bactéries pathogènes, cette niche écologique est notamment définie par une (pour les spécialistes) ou plusieurs (pour les généralistes) espèces hôte. Elle est également définie par les conditions environnementales permissives au développement de la maladie.

Dans l'article 2, soumis, nous nous appuyons sur des approches de génétique des populations et de génomique comparative pour mieux comprendre les processus évolutifs à l'origine de l'émergence de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, qui contient les souches pathogènes d'huîtres.

Des données complémentaires à cet article présentent une étude visant à mieux définir la niche écologique de cette sous-espèce, grâce à plusieurs campagnes de suivi de la bactérie en environnement naturel. Ces campagnes ont été réalisées dans une zone ostréicole impactée par les mortalités liées à *V. aestuarianus francensis* : l'étang de Thau.



## Article 2: Emergence and clonal expansion in Europe of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oysters

Par **Mesnil, A.**, Jacquot, M., Garcia, C., Tourbiez, D., Canier, L., Bidois, A., Dégremont, L., Cheslett, D., Geary, M., Vetri, A., Roque, A., Furones, D., Garden, A., Orozova, P., Arzul, I., Sicard, M., Charrière, M., Destoumieux-Garzón, D., Travers, M-A

Article soumis

### Résumé de l'article 2

Dans cet article, nous nous intéressons à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, qui est associée aux mortalités d'huîtres. Nous étudions sa diversité génétique et mettons en évidence l'expansion clonale à l'échelle européenne de deux lignées pathogènes, génétiquement proches l'une de l'autre. Ces deux lignées se caractérisent par la rareté des échanges génétiques avec d'autres populations, laissant supposer que sa gamme d'habitats est restreinte à son hôte connu, c'est-à-dire l'huître. Elle est donc capable d'y persister en faible concentrations en dehors des périodes de permissivité pour le développement de la maladie. Il s'agit donc probablement d'un pathogène spécialiste. L'accumulation de séquences d'insertions dans son génome, en est un marqueur. De plus, nous identifions l'acquisition d'un élément génétique mobile contenant des gènes conférant une meilleure capacité de résistance au cuivre, comme une des étapes clé qui ont permis son émergence.



# Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oysters in Europe.

Aurélie Mesnil<sup>1,2</sup>, Maude Jacquot<sup>1</sup>, Céline Garcia<sup>1</sup>, Delphine Tourbiez<sup>1</sup>, Lydie Canier<sup>1</sup>, Audrey Bidois<sup>2</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Deborah Cheslett<sup>3</sup>, Michelle Geary<sup>3</sup>, Alessia Vetri<sup>4</sup>, Ana Roque<sup>5</sup>, Dolores Furones<sup>5</sup>, Alison Garden<sup>6</sup>, Petya Orozova<sup>7</sup>, Isabelle Arzul<sup>1</sup>, Mathieu Sicard<sup>8</sup>, Guillaume Charrière<sup>2</sup>, Delphine Destoumieux-Garzón<sup>2</sup>, Marie-Agnès Travers<sup>2\*</sup>

1 ASIM, Ifremer, Station de La Tremblade, avenue de Mus du Loup, 17390 La Tremblade, France

2 IHPE, Université de Montpellier, CNRS, IFREMER, Univ Perpignan Via Domitia, Montpellier, France

3 Marine Institute MI, Rinville, Oranmore, Co. Galway, H91 R673, Ireland

4 Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy

5 IRTA La Ràpita. Aquaculture Program. 43540 – San Carles de la Ràpita, Spain.

6 Marine Laboratory, Marine Scotland Science, Aberdeen, UK.

7 National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria.

8 ISEM, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, France.

\* Corresponding author: [marie.agnes.travers@ifremer.fr](mailto:marie.agnes.travers@ifremer.fr)

Competing interests: The authors declare no conflict of interest.

## Abstract

*Crassostrea gigas* oysters represent a significant global food source, with 4.7 million tons harvested per year. In 2001, the bacterium *V. aestuarianus francensis* emerged as a pathogen that causes adult oyster mortality in France and Ireland. Its impact on oyster aquaculture has increased in Europe since its reemergence in 2012. To better understand the evolutionary mechanisms leading to the emergence and persistence over time of this pathogen, we conducted a survey of mollusk diseases through national reference laboratories (NRLs) across

Europe. We analyzed 54 new genomes of *V. aestuarianus* (*Va*) isolated from multiple environmental compartments since 2001, in areas with and without bivalve mortalities. We used a combination of comparative genomics and population genetics approaches to show that *Va francensis* lineages have undergone clonal expansion in Europe, likely after a recent selective bottleneck. Low mutation and recombination rates may have selected particular virulent genotypes. Furthermore, we identified a specific *cus-cop*-containing island conferring copper resistance to *Va francensis* whose acquisition may have favored the emergence of pathogenic lineages adapted to oysters.

## Introduction

Marine populations are under increasing threat of emerging infectious disease (EID) (1), contributing to mass mortality events impacting corals, sea-stars, mollusks and fish (2-4). Aquaculture is practiced in an open and highly connected environment and thus particularly threatened by pathogen propagation (5). Moreover, aquacultural practices frequently result in high population densities and many animal transfers, increasing the risk of pathogen introduction and dispersal (6).

Oysters (*Crassostrea gigas*) are frequently impacted by bacterial pathogens of the genus *Vibrio* (7-9). *Vibrios* are ubiquitously distributed in the oceans and show a wide range of niche specialization, ranging from free-living forms to those attachment to biotic and abiotic surfaces, from symbionts to pathogens, and from estuarine inhabitants to deep-sea piezophiles living under high pressure (10). Among them, *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* (*Va francensis*) has caused recurrent mortality of adult oysters since 2001 (11). Having previously been restricted to France, this disease has now spread across European countries (France, Italy, Ireland, and Spain) (12, 13). This spread of *Va francensis* has resulted in mortality rates of approximately 25% and is a major economic concern as it impacts market-size oysters (14). Previous field studies found that pathogenic strains of *Va francensis* can colonize sentinel oysters, but are rare in samples from the local environment, *i.e.* sediment and water column. These data suggest that oysters are the preferred habitat of this pathogen (15). Moreover, it has been proposed that *Va francensis* can persist in oyster tissues during winter (15). These observations suggest *Va francensis* has adapted to oysters and raise questions about how this host specialization has occurred.

The emergence of pathogenic bacterial lineages can follow the acquisition of new traits which increase the ability to colonize a host (16). Trait acquisition can be achieved by mutation (17), but it occurs more frequently through horizontal transfer (through transformation, conjugation

or transduction) of one or more genes favoring rapid adaptation to new niches and hosts (18). After emergence, the dynamics of pathogenic lineages are dictated by the relative importance of evolutionary forces: mutation, selection, genetic drift and recombination. Populations whose evolution is not or little influenced by recombination evolve clonally (19). One of the factors limiting the rates of horizontal transfer and recombination in a population is ecological isolation (20, 21) which limits opportunity to exchange genetic material with other populations.

Previous studies on *V. aestuarianus* diversity were based on a limited number of genomes, not reflecting overall diversity across diverse isolation contexts (22). This lack of genomic data hinders a complete understanding of the mechanisms governing the emergence and evolutionary dynamics of pathogenic lineages in *Va francensis*.

In the present study, we analyzed 54 genomes of isolates collected since 2001 across Europe. We combined phylogenetic and population genetic approaches to decipher evolutionary processes associated with the origin of the emergence of this oyster pathogen. Our study shows that *Va francensis* strains exhibit numerous features commonly reported in specialized pathogens. In particular, our data suggest the acquisition of genes involved in copper resistance is one mechanism promoting *V. aestuarianus* adaptation to oysters.

## Results

### European spread of *V. aestuarianus* oyster pathogens

To assess the geographic distribution of pathogenic *V. aestuarianus* in Europe, a questionnaire was sent in 2021 to all European laboratories in charge of the diagnosis and surveillance of mollusk diseases (supplementary material). Eight out of the 12 respondent laboratories reported that *V. aestuarianus* was detected during adult oyster mortality events. The earliest detections were reported by France and Ireland in 2001, and the most recent detection was reported by Denmark in 2021 (case used DNA detection only) (fig. 1, A). The number of countries reporting detection has increased since 2011, with 8 European countries currently reporting *V. aestuarianus*. Importantly the date of first detection may be underestimated, since surveillance and testing for the pathogen has varied between countries and was only implemented in the majority of the laboratories following the development of a diagnostic tool in 2009 (23).

## ***V. aestuarianus* diversity is structured according to environmental origin and isolation context.**

In order to assess the overall population structure of *V. aestuarianus* in Europe, we studied genetic diversity at the whole genome level using *V. aestuarianus* isolates from a broad variety of origins. 54 strains were sequenced and genomes were *de novo* assembled. We obtained 15 4.5-Mb complete genomes (with 2 to 4 contigs) and 39 draft genomes (with up to 150 contigs) (table S1). Whole genomes were aligned, and relationships between isolates were studied by building a maximum likelihood phylogeny (fig. 2). Overall, genomes were close to each other in the tree and showed highly similar nucleotide compositions, showing average nucleotide identities (ANIs) higher than 97.1% for all pairwise comparisons (table S2). The tree showed a tightly clustered clade of oyster clinical isolates (*i. e.*, isolates from moribund oysters) ( $n = 25$ ) inside genetically diverse *V. aestuarianus* strains isolated outside of oyster mortalities ( $n = 29$ ), encompassing non-clinical isolates (*i.e.* strains isolated from sites without mortalities) and strains isolated during cockles mortalities. All oyster clinical isolates are encompassed in *Va francensis* subspecies (24) and all *Va francensis* isolates were found in oysters, and showed higher virulence levels when assayed through injection into oyster muscle ( $p$ -value < 0.001). The reconstructed tree also confirmed that this subspecies is composed of two lineages named A ( $n = 17$ ) and B ( $n = 8$ ) (22).

Analysis of molecular variance (AMOVA) performed on the sequence dataset revealed that the isolation context (“oyster mortality” or not) and environmental origin (five host species, zooplankton and water) explained most significantly ( $p < 0.005$ ) genetic variation (table 1). AMOVA also indicated the absence of spatial and temporal delineation of the oyster pathogen lineages. Altogether, our data reveal *V. aestuarianus* lineages linked European expansion of this oyster pathogen.

### **Temporal emergence of oyster pathogen lineages**

Next, we used a Bayesian approach to date the emergence and reconstruct the temporal evolution of oyster pathogens lineages. As a critical prerequisite, we checked whether the *Va francensis* subspecies is a measurably evolving population. A temporal signal was observed with a correlation between genetic distances from a reconstructed common ancestor and strains sampling time, yielding a  $R^2$  of 0.4236 (fig. S1A). The best-fitting evolutionary model for the *Va francensis* population was obtained under a GMRF Bayesian skyline population model with a relaxed clock, leading to a rate of  $7.27 \times 10^{-7}$  substitutions per position per year, or 3.2 mutations per genome per year. The mean time of emergence of the most recent

common ancestor (TMRCA) of the lineage A was estimated to be 1956 (95% highest posterior density (HPD): 1919–1972). At this time, a divergence occurred between strain 01-151, which is non-virulent toward oysters, and other lineage A strains that are mostly pathogenic. The TMRCA of lineage B maps to the late 1970s, albeit with uncertainty (95% HPD: 1898–1993). According to the coalescence-based reconstruction of demographic variation, the *Va francensis* population has slowly decline since its emergence, with accelerated decline since 2000 (fig S1B).

### **Genome stability in *V. aestuarianus francensis* lineages**

Recombination can drive genetic diversity and evolutionary dynamics in bacterial populations. We therefore quantified homologous recombination events using *V. aestuarianus* genome alignments.

**Recombination has little impact on oyster pathogen evolution.** We found that recombination ( $r$ ) has a lower impact on the core genome substitution rate in *Va francensis* lineages than the impact of mutation ( $m$ ), with mean  $r/m = 0.36 \pm 0.22$  and  $0.28 \pm 0.09$  in lineages A and B respectively. The ratios of these lineages are significantly (student test  $p$ -value  $< 0.005$ ) smaller than in non-clinical *V. aestuarianus* isolates (i.e. strains isolated from sites without mortalities) ( $r/m = 0.91 \pm 0.45$ ). 7.8 and 3.3 recombination events were identified on average for these lineages. Recombination in genomes can generate phylogenetic inconsistencies between taxa that can emerge in phylogenetic networks as the presence of alternative pathways (25). The network that we constructed from the whole-genome alignment (fig. S2) confirmed that recombination does not affect *Va francensis* isolate relationships, with few ambiguities among these taxa. One known consequence of the absence of recombination impact is strong linkage between loci in non-recombinant genomes (26). In *Va francensis* lineage A and, to a lesser extent, in lineage B, strong linkage between single nucleotide polymorphisms (*SNPs*) was observed (fig. S3). In contrast, the recombination impact detected in all other genomes was confirmed with phylogenetic networks, which showed ambiguities between taxa (fig. S2) and low linkage between loci in these genomes (fig. S3). However, recombination might have supported the emergence of the *Va francensis* group: 488 recombination events were detected at the node corresponding to the hypothetical common ancestor of all pathogenic oyster isolates (fig. S4).

**Core genome stability was observed in *Va francensis* lineages.** Mutations also generated little genetic diversity among *Va francensis*. Indeed, apart from the recombinant segments, among the 19 775 variant genomic positions in the full dataset, 666 and 83 positions vary among *Va francensis* A and B lineages. Finally, low impact of recombination and mutation on *Va francensis* lineages results in core genome stability. We used Tajima's D to compare observed genetic diversity in *V. aestuarianus* to that expected under neutral evolution and constant population size. Deviation from neutrality was larger among the *Va francensis* lineages A (Tajima's D = -2.3) and B (-2.5) than in the full dataset (-0.7), with less polymorphism than expected under neutral evolution (fig. 3 A). To determine whether the low genetic diversity was due to demographic effects (affecting whole genomes) or to selection effects (affecting particular genes), we adopted a gene-based approach to investigate selection pressures at the gene level. While most of the 1,974 core genes were under neutral evolution outside of the *Va francensis* subspecies, the vast majority were monomorphic within lineages A and B (fig. 3 B), which is consistent with the purging of genetic diversity through bottlenecks during transmission dynamics.

***Va francensis* subspecies were found to have a closed pangenome,** with genes largely shared among all isolates and almost no strain-specific genes, as determined by dataset pangenome analysis (fig S5). In contrast, other *V. aestuarianus* isolates exhibited many strain-specific genes. Altogether, our data support the clonal evolution of the two *Va francensis* lineages.

### **Positive selection signatures of oyster pathogen lineages**

We used *pcadapt*, which detects structure and clustering of individuals in a population, to detect potential signatures of positive selection affecting oyster pathogen lineages. 2,925 SNPs were selected with an adjusted p-value <0.001. Based on principal component analysis, principal component 1 (PC1) segregated the *Va francensis* lineages from the rest of *V. aestuarianus* strain collection (fig. S6). 46 outlier SNPs were associated with PC1 including 17 non-synonymous and one stop-gained SNP potentially involved in diversifying selection. These genes are listed in table S3 and notably include genes encoding flagellar proteins (*pomA*) or related to chemotaxis.

## **Oyster-pathogenic *V. aestuarianus* have genomic features of specialist pathogens**

According to low rates of homologous recombination and the closed pangenome, the two *Va francensis* lineages can be considered as clonally evolving lineages. Furthermore, clonal evolution, as well as the small number of known habitats (15), suggest that these lineages are oyster specialists. Pathogen populations have often undergone a change of niche (passage from a free-living lifestyle to an obligatory parasitic one), ultimately resulting in ecological isolation and thus inhibition of DNA transfer with the parental population, or even with the broader bacterial community (27, 28).

We further tested the hypothesis of specialization by analyzing genomic features known to be enriched during transition to specialist lifestyle : insertion sequences (ISs) and pseudogene (29). We found a higher number of ISs in the genomes of pathogenic oyster lineages A and B than in strains isolated from contexts without bivalve mortality (p-value = 0.01 and 0.02, respectively). Interestingly, in groups containing strains isolated during cockle mortality events, ISs were more abundant than in pathogenic oyster genomes (p-value = 0.02 and 0.03, respectively) (fig. 4). IS families were conserved between oyster pathogen genomes, with most ISs belonging to the IS66, IS902 and ISAS1 families (table S4 and fig S7). IS conservation in these clades suggests that IS enrichment and expansion in genomes stopped after pathogen emergence. The dynamics of the ISs appeared to be different in the cockle isolates. Indeed, the number and families of ISs represented appeared to be poorly conserved. We suspect that IS flux is active in cockle isolates, with ongoing horizontal exchange and intragenomic expansion.

To check whether IS enrichment is involved in pseudogenization, we crossed IS and pseudogene genomic coordinates and determined the number of ISs with pseudogenes around them (from 2,000 bp before the IS start to 2,000 bp after the IS end) (table S5 and S6). Regardless of the genome and chromosome considered, the vast majority (on average 86%) of ISs had pseudogenes nearby. IS and pseudogene enrichment supports our hypothesis that the *Va francensis* lineages are specialized toward oyster.

## **Copper resistance acquisition: One potential step in the emergence of oyster-pathogenic clades**

Trait acquisition is often the first step preceding selective bottlenecks and clonal expansion of host-adapted pathogens. To identify traits that may have preceded oyster pathogen emergence, we studied the *V. aestuarianus* pangenome and detected 139 genes that were shared exclusively by *Va francensis* genomes. Most of them (106) were annotated as

hypothetical proteins. The remaining 33 genes encode proteins with functions related to copper export, cell-bacteria interaction (LPS/antigen O, cell wall or peptidoglycan), chemotaxis and DNA repair. The sequences of these 139 genes were identical or well conserved between strains (table S7).

Some oyster pathogen specific genes localize to a putative mobile genetic element (MGE), as determined by crossing their coordinates with IS coordinates in an oyster pathogen genome (02\_041) (fig. 5 A). This putative MGE contains Cus operon genes (*cusABCF, S/R*) surrounded by ISs from the IS66 family (length = 15 kb), as well as the copper export genes *copA* and *copG* and the regulator *cueR*, located near *tn7* transposon genes (*tnA, B, C* and *E*) (length = 10 kb), and is later referred to as a *cus-cop*-containing island.

The *Va francensis* ancestor could have acquired copper export genes by horizontal transfer. Presence in an MGE could have facilitated integration of these genes into the bacterial genome. To investigate the origin of *cus-cop*-containing islands, we used BLAST analyses of each operon and of the entire region in 127 reference genomes of different *Vibrio* species (table S8 and fig S8). The *cus-cop*-containing island presence is scattered along the *Vibrio* phylogeny and is not specific to a monophyletic group. It appeared highly similar to some *V. fluvialis* and *V. furnissii* genomic sequences with a nucleotide identity >95%. Moreover, this region was close to plasmidic elements identified in *V. crassostreae* and *Vibrio* sp. dgh with a nucleotide identity >89% (fig. 5B).

To test whether the genomic differences between the oyster pathogens and other strains could lead to phenotypic differences, we tested copper resistance in 27 *V. aestuarianus* strains using an agar diffusion assay. Supporting our hypothesis, all tested oyster pathogens (8 strains from lineage A and 5 from lineage B) appeared significantly ( $p$ -value < 0.001) more resistant than other strains to copper in radial diffusion assays (fig. 5C).

## Discussion

Here, we describe a genomic analysis of *V. aestuarianus* isolated from multiple European countries, in different epidemic contexts and from multiple environments (five host species, zooplankton and water) since 2001. We report the expansion and clonal evolution of two oyster-pathogenic lineages from the *V. aestuarianus francensis* subspecies (11).

We estimate that  $7.23 \times 10^{-7}$  substitutions occur per site per year in *Va francensis*, similar to the evolutionary rate inferred in *V. cholerae* during pandemic waves (30): this indicates that pathogenic *Va francensis* lineages emerged during the 1990s, a decade when global oyster production greatly increased according to Food and Agriculture Organisation. Indeed, oyster production increased to over 140,000 tons per year in the 1990s (31). According to the

reconstructed demographic history, the effective population size of *Va francensis* is small and showed a slowly decrease that accelerated in the 1990s. This sharper decrease may have followed emergence of oyster-pathogenic lineages, indicating a possible bottleneck that resulted in selection of oyster-adapted strains. This bottleneck may have purged polymorphisms from this ancestral population, explaining the observed monomorphism in *Va francensis* core genes. Indeed, some pathogenic monomorphic lineages may endure population bottlenecks, supporting acquisition of new functions and colonization of new hosts (32).

Several genomic modifications may help pathogenic oyster lineages adapt to their host, including core genome substitutions and gene acquisition. We found non-synonymous substitutions that were fixed in pathogenic oyster lineages. These occurred in genes involved in host interaction or virulence, such as the *pomA* gene which encodes a flagellum motor protein and the gene *luxP* linked to quorum-sensing. The functional consequences of these substitutions remain to be explored.

Acquisition of copper resistance traits may also have contributed to the emergence of the oyster-pathogenic lineages. Our data indicate that the *Va francensis* ancestor acquired a genomic island carrying copper detoxification genes. Indeed, copper is a heavy metal found at high levels in coastal waters because of agricultural and industrial activities (33-35). Copper can accumulate in oyster tissues (up to 18,000 µg/g in China (36)), particularly at infection sites (37) where it supports antimicrobial defense as copper can kill invading microorganisms (37-39). Bacteria have, in turn, developed copper detoxification mechanisms which utilize the *cop* and *cus* genes (40). *Cop* genes support initial Cu<sup>+</sup> translocation from the cytoplasm to the periplasm. *Cus* genes encode a CusABC system that exports periplasmic copper into the extracellular medium (41). Importantly, *copA* is essential for copper resistance, oyster colonization and virulence in *V. tasmaniensis* LGP32, an oyster-pathogenic strain associated with the Pacific Oyster Mortality Syndrome (42). Similarly, *copA* deletion in *V. crassostreae* also attenuates virulence in oysters (7). Our data further support copper resistance as a shared trait that allows pathogens to adapt to oysters as a host.

Our results suggest clonal evolution in *Va francensis* lineages. Recombination has a low impact on genetic diversity. The *r/m* ratio, ~0.3 in both lineages, is similar to clonally evolving pathogenic bacteria like the *V. cholerae* 7 pandemic lineage (*r/m* = 0.1 ; (43)), *M. tuberculosis* complex (between 0,426 and 0,565, (44)) and lineage 1 of *Salmonella enterica* (*r/m* = 0.2 ; (45)). We also found that *Va francensis* has a closed pangenome. This led us to formulate the hypothesis of an ecological isolation of these lineages, a hallmark of specialized pathogens that do not exchange genes with other bacterial populations. This hypothesis is also supported

by enrichment of insertion sequences and pseudogenization in both oyster-pathogenic lineages. During specialization, pathogens transition from a free-living lifestyle to a permanent association with a host. Through host association, pathogens can acquire compounds of intermediate metabolism that allow genes associated with related biosynthetic pathways to become facultative or redundant (25). Studies on pathogen specialization have largely focused on highly specialized intracellular bacteria, which can undergo an extreme genome rationalization process (26). This process implies pseudogenization of non-essential genes that accumulate mutations or ISs and can ultimately result in gene loss (29, 46, 47). However, genome size reduction was not observed, probably because *Va francensis* pathogenic lineages are not obligate intracellular parasites. While oyster pathogens have a restricted habitat, they can still replicate in the absence of their host, at least in rich medium. Moreover, *Va francensis* can colonize diverse host tissues, including hemolymph, gills and digestive connective tissues (15). As a consequence, *Va francensis* is adapted to diverse tissular micro-environments, consistent with being less specialized than obligate intracellular bacteria. Further studies of oyster pathogen microhabitats may help to elucidate their complete intra-host life cycle, and the functions of specific genes linked to adaptation. Whether clades A and B occupy similar niches in infected oysters and whether they have the potential to cooperate remains unknown. Neither epidemiological parameter estimation (48) nor in-depth analysis of their genomes identified lineage-specific functional traits.

Here we report the clonal expansion of *Va francensis* lineages across Europe. It has been reported that another major pathogen, the herpes virus Ostreid OsHV-1, has also caused the mortality of *C. gigas* (49) along the French coasts since the emergence of a new variant in 2008 (50). Double infections by OsHV-1 and *Va francensis* were reported in French oyster farms in 2014 and 2015 (51, 52) and have also been observed in Ireland since 2008 (Cheslett, pers comm). Although experimental infections combining the two pathogens at high doses in spat and juvenile *C. gigas* have not demonstrated direct collaboration between them (53, 54), at the population level the virus may still weaken animal defenses and thus amplify the impact of *Va francensis*.

The global spread of pathogens is a recurrent problem in agriculture and aquaculture and is often favored by anthropogenic introductions via infected hosts (55). The many transfers taking place during the lifetime of an oyster probably explain most of the spread of pathogenic lineages of *Va francensis* across Europe. Preventing the spread of pathogens during transfers is particularly complicated in the case of *Va francensis* since the animals may be asymptomatic (15). There is therefore an urgent need to develop sensitive detection assays to monitor the spread of pathogens: the specific *Va francensis* genes revealed in this study,

such as the *cusS/R* genomic island, may provide new diagnostic tools, which may help to monitor and prevent future mortality events.

## **Material & methods**

### **Isolate selection**

The study collection was designed to represent the temporal, geographic and clinical heterogeneity of *V. aestuarianus* origins. However, ascertainment bias could occur due to sampling strategy used. Indeed, strains were mainly isolated during bivalve mortalities. We maximized recovery of the genetic diversity of oyster pathogenic *V. aestuarianus* by collecting isolates from all European countries reporting mortalities related to *V. aestuarianus* or presence of the bacteria. We also included strains isolated during field surveys of sites without known mortality events. Strains were collected with the help of European NRLs responsible for the diagnosis and surveillance of mollusk diseases: Ifremer (France), MI (Ireland), IZSVE (Italy), IRTA (Spain), Marine Scotland Science (Scotland), and NRLFMC (Bulgaria). Sequence comparisons of isolates from France, notably those isolated from moribund oysters, turned out to be very similar. In order to equilibrate our sampling, we excluded 17 isolates identical with included isolates. We selected approximately one strain per batch of moribund oysters (a batch represents a sampling point) (table S9). The 54 isolates used in the study are summarized in table S10.

### **Illumina, Ion torrent and PacBio whole-genome sequencing**

Genome sequencing was performed between 2019 and 2021. Several sequencing technologies were used depending on the objectives. We used a long-read sequencing technology for some strains to improve assembly quality and study genomic features. DNA was isolated from 35 strains using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer's guidelines. The concentration of each sample was adjusted to 0.2 ng/μl for library preparation using the Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit according to the manufacturer's guidelines. For each library, paired-end reads of 150 bp were produced on the Illumina NextSeq 550 platform (Bio Environnement, Perpignan, France). The quality of the resultant fastq files was assessed using FastQC (56). Primers, Illumina adapter sequences, low-quality bases at the 3' end of reads with Phred-scaled quality scores less than 30 and reads with a length <50 bp were removed using Trim Galore (57). Quality-controlled reads

were *de novo* assembled using the SPAdes genome assembler v3.13.1 (58) with the default kmer size and a coverage cutoff value of 20 reads (59).

For 2 strains (04\_091\_1T1 and U8), enzymatic shearing was performed on 500ng of genomic bacterial DNA using the NEBNext Fast DNA Library Prep kit (New England Biolabs) and following the manufacturer's recommendations. Samples were barcoded with individual IonCodes (Thermo). Purified libraries were then quantified by real-time PCR using the Ion Universal Library Quantification Kit (Thermo) prior to be diluted and pooled at 25µM each. The Ion Torrent S5 libraries were prepared using the “Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™” for Ion Chef Kit and sequenced on the Ion Torrent S5 using an Ion 530 semi-conductor sequencing chip (Thermo).

DNA was isolated from other strains using a MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Library preparation and sequencing on a PacBio Sequel II instrument were performed with the GENTYANE INRAe platform (Clermont-Ferrand, France). *De novo* genome assemblies were obtained using FLYE v2.8.3 (60). One round of polishing was performed using RACON v 1.4.3 (61).

The assembly was evaluated with QUAST, and genome completeness was checked using the BUSCO v5.1.1 (62) and *vibrionales\_odb10* databases as lineage datasets, including 57 *Vibrionales* as detailed in table S11.

Assembly features and GenBank accession numbers are summarized in table S1.

## **Genome annotations**

For each assembly, coding sequences (CDSs) were predicted using PROKKA v1.12 (63) with default databases and `-compliant` and `-rfam` flags and annotation of rRNAs, tRNAs and other ncRNAs enabled. Functional annotation of the detected CDSs was performed using EggNog-Mapper v2.1.0 (64, 65). ISs were detected in the genomes using ISEScan v1.7 (66). Pseudogene detection was performed with the GenBank files released from PROKKA with PSEUDOFINDER v1.0 (67), using the `diamond` flag and NCBI nonredundant database. These later analyses were performed only on resolved genomes to avoid obtaining false negatives in IS detection and false positives in pseudogene detection at the intercontig locations.

## **Phylogeny and recombination analysis**

Pairwise ANIs (%) were calculated using FastANI (68). Whole-genome alignments of the 54 isolate contigs were made using Progressive Mauve v13/02/2015 (69). Whole-genome alignment was used to infer the maximum likelihood phylogeny using RAxML v8.2.12 with the

TVM model of nucleotide substitution (transversion model, AG=CT and unequal base frequencies) and 100 bootstrap replicates, with strain 03\_008T as the outgroup.

To identify polymorphic sites, the haploid variant calling pipeline snippy v4.6 (available at <https://github.com/tseemann/snippy>) was used with default parameters.

To assess the influence of various structuring factors on the observed genetic diversity, we performed AMOVA on the sequence dataset, with environmental origin, isolation context, sampling year, and country as structuring factors, using the R package *pegas*.

Recombination was evaluated across this genome alignment using ClonalFrameML v1.12 (70). We used an extension that allows different recombination parameters to be inferred on different branches of the clonal genealogy. Linear regression analysis of the root-to-tip distances against sampling time was performed using TempEst v1.5.3 (71). The substitution rate was estimated under different demographic and clock models, using Beast v1.10.4, taking advantage of the sampling timeframe between 2001 and 2021. We tested both a strict and a relaxed molecular clock. Constant-sized, exponential-sized and GMRF Bayesian skyride plot models (72, 73) were used. For each model, two independent chains were conducted for 200 million generations and convergence was assessed by checking effective sample size values for key parameters using Tracer v1.7.1 (74). For robust model selection, both path sampling and stepping-stone sampling approaches were applied to each BEAST analysis to estimate the marginal likelihood (75, 76). The best model selected by Bayes factor comparison was a relaxed molecular clock with a GMRF Bayesian skyride demographic model. For this model, triplicate runs were combined using LogCombiner v1.10.4, with removal of 10% burn-in.

## **Selection analysis**

Tajima's D was calculated considering core genome alignment using MEGA 11 Tajima's test on neutrality. Core genome alignment were previously partitioned according to lineages or subspecies, resulting in *Va francensis* lineage A alignment (n = 17 sequences), *Va francensis* lineage B alignment (n = 8 sequences) and no *Va francensis* alignment (n = 29 sequences). Since sample size is known to influence population genetic parameter estimations (77), we calculated Tajima's D on subsamples of eight sequences. For *Va francensis* lineage A and no *Va francensis* isolates, Tajima's D was calculated on ten different alignments constructed with eight sequences randomly subsampled. Then we calculated mean of the Tajima's D obtained from the ten alignments. For the *Va francensis* lineage B alignment, the eight sequences represented the entire sampled set. Tajima's D was also calculated for each core genes, considering the same partitions, employing the R package *pegas*.

In order to detect SNPs that may explain *Va francensis* emergence, we performed a genome scan analysis using *pcadapt* package v.4.3.3 for R (78) that detect structure and clustering of individuals in a population. Number of principal components was set to six. We used LD.clumping option, with window size of 5 kb. LD.clumping uses p-value to sort the SNPs by importance (e.g. keeping the most significant ones). It takes the first one (e.g. most significant SNP) and removes SNPs that are too correlated with this one in a window around it. We also removed SNP with minor allele frequency under 0.05. After computing the test statistic, we used Bonferroni adjustment to correct for multiple comparisons, and threshold of 0.001 was applied to identify outliers SNPs.

### **Bacterial virulence estimation by injection**

Bacteria were grown with constant agitation at 22°C for 24 h in Zobell medium. Cultures were washed by centrifugation (10 min, 1500 g) and resuspended in artificial, sterile seawater to obtain  $OD_{600nm} = 0.1$ . Fifty microliters of bacterial suspensions ( $10^7$  cfu, checked by plating on Zobell agar) were injected intramuscularly into anesthetized specific pathogen-free (SPF) oysters produced and maintained in the IFREMER facility (79). After injection, the oysters were transferred to aquaria (10 oysters per 2.5 L aquarium, duplicate aquaria per bacterial strain) containing 2 L of aerated, UV-treated seawater at 22°C and kept under static conditions for 5 days.

### **Copper resistance phenotyping**

Paper discs (6 mm) were loaded with  $CuSO_4$  by soaking them overnight in 50 mM  $CuSO_4$ . Cells from stationary phase cultures at  $DO = 1$  were washed twice with SSW before being spread onto agar plates containing  $15\text{ g.L}^{-1}$  bactopectone and 0.5 M NaCl. Using sterile tweezers, copper-impregnated disks were placed on the bacterial lawn before incubation at 20°C. After 5 days of incubation, the diameter of the inhibition zone around the disk was measured.

### **Statistic tests**

Basic statistical analysis of all of the data were performed using R v4.1.2. Data were checked for normality and homogeneity of variance before analysis. Wilcoxon-Mann-Whitney was performed to evaluate if recombination ratios, IS number in genomes, virulence toward oysters and halo size (representing strains sensitivity to copper) differed among *Va francensis* lineages and between *Va francensis* lineages and other strains.

## Acknowledgments

We first thank the NRLs for mollusk diseases that contributed to the questionnaire survey (Bojan Adžić, Raquel Aranguren, Giuseppe Arcangeli, Deborah Cheslett, Marc Engelsma, Mark Fordyce, Ana Grade, Michael Gubbins, Lone Madsen, Petya Orozova, and Ewa Paździor). We thank Nicolas Bierne for helpful discussion and Viviane Boulo, Jean-Michel Escoubas, Nicole Faury and Gaelle Courty for their valuable technical assistance. We also thank Bruno Petton and staff of IFREMER Bouin, who contributed to animal production and delivery. We thank the Bio-Environment platform (University of Perpignan Via Domitia) and Jean-François Allienne for support in library preparation and sequencing. We are grateful to the Ifremer Bioinformatics Core Facility (SeBiMER; <https://ifremer-bioinformatics.github.io/>) for providing technical assistance and scientific support in bioinformatics analysis. We also acknowledge the Pôle de Calcul et de Données Marines (<https://wwz.ifremer.fr/en/Research-Technology/Research-Infrastructures/Digital-infrastructures/Computation-Centre>) for providing DATARMOR computing and storage resources. This work was funded by Europe DG-Sante (through European Union Reference Laboratory for mollusk diseases funding) and French Ministry DPMA (MIRAGE project) and DGAI through NRL funding. Moreover, A.M., PhD, was supported by IFREMER and Région Nouvelle Aquitaine. This study is part of the « Laboratoire d'Excellence (LabEx) » TULIP (ANR-10-LABX-41) framework.

## Table and figures:

Table 1: **Analysis of molecular variance** supporting genetic partitioning according to environmental origin and isolation context

<i>Factor</i>	<i>Variability (%)</i>	<i>p-value</i>
<i>Environmental origin</i>	<b>17.8</b>	<b>0.002</b>
<i>Isolation context</i>	<b>16.0</b>	<b>0.001</b>
<i>Country of isolation</i>	7.1	0.074
<i>Year of isolation</i>	3.4	0.25

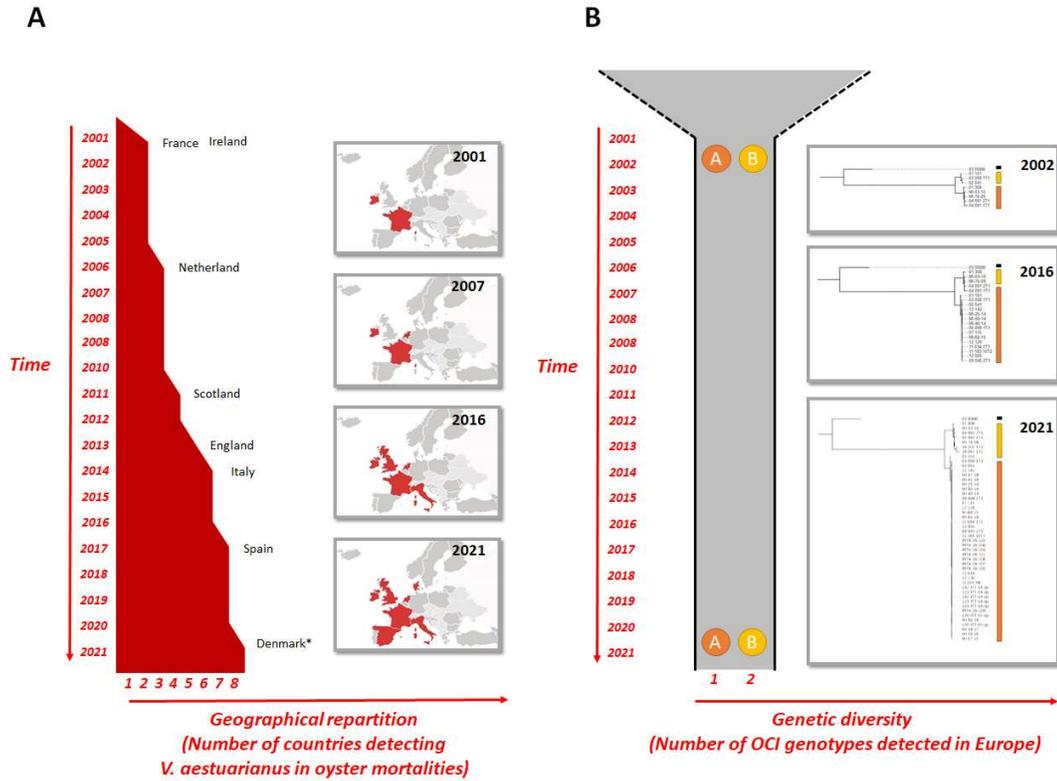


Figure 1: **European expansion of *V. aestuarianus francensis***. While the geographic distribution of *V. aestuarianus* strains involved in *C. gigas* mortalities expands, genetic diversity remains stable over time. A) The number of countries reporting the detection of *V. aestuarianus* was assessed through a questionnaire sent to European national reference laboratories (NRLs). \*Note: Denmark case report corresponds to a suspected case without bacterial isolation. B) The two lineage expansions: 2 genotypes were determined based on a maximum likelihood phylogenetic tree from complete genome alignments (GTR substitution model).

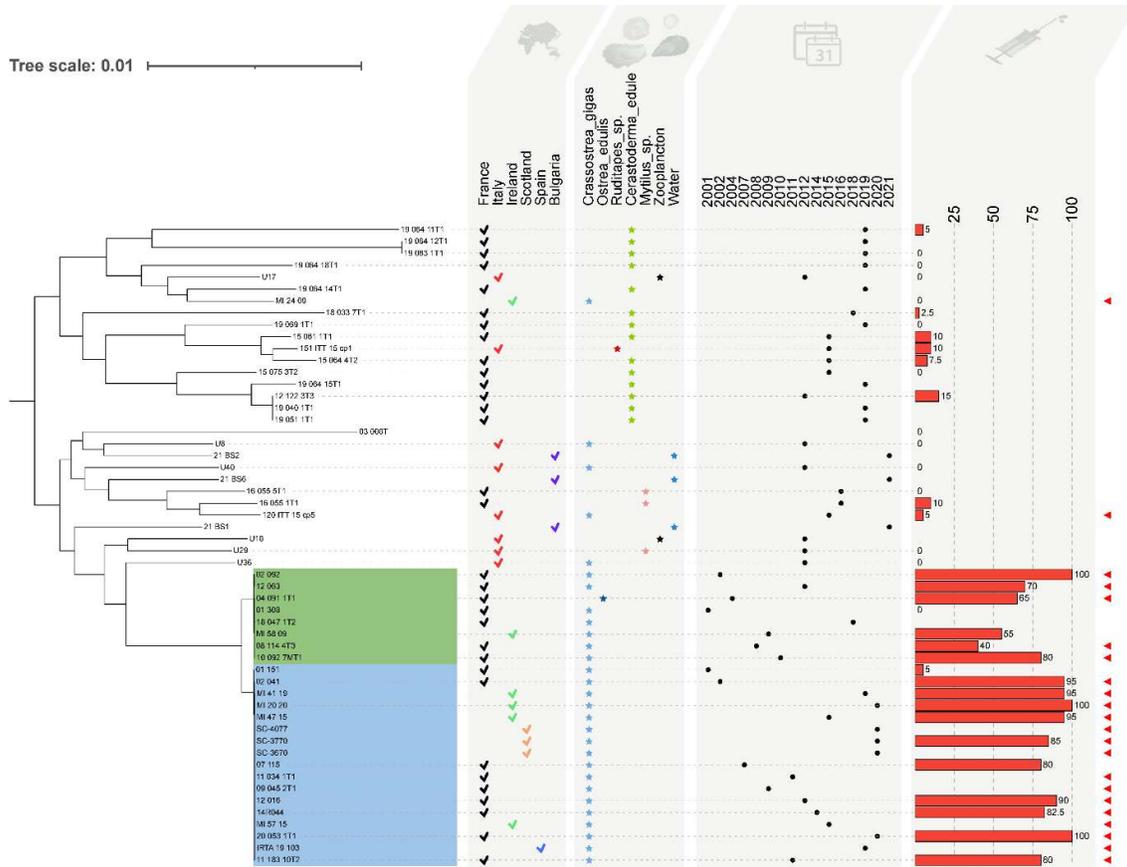
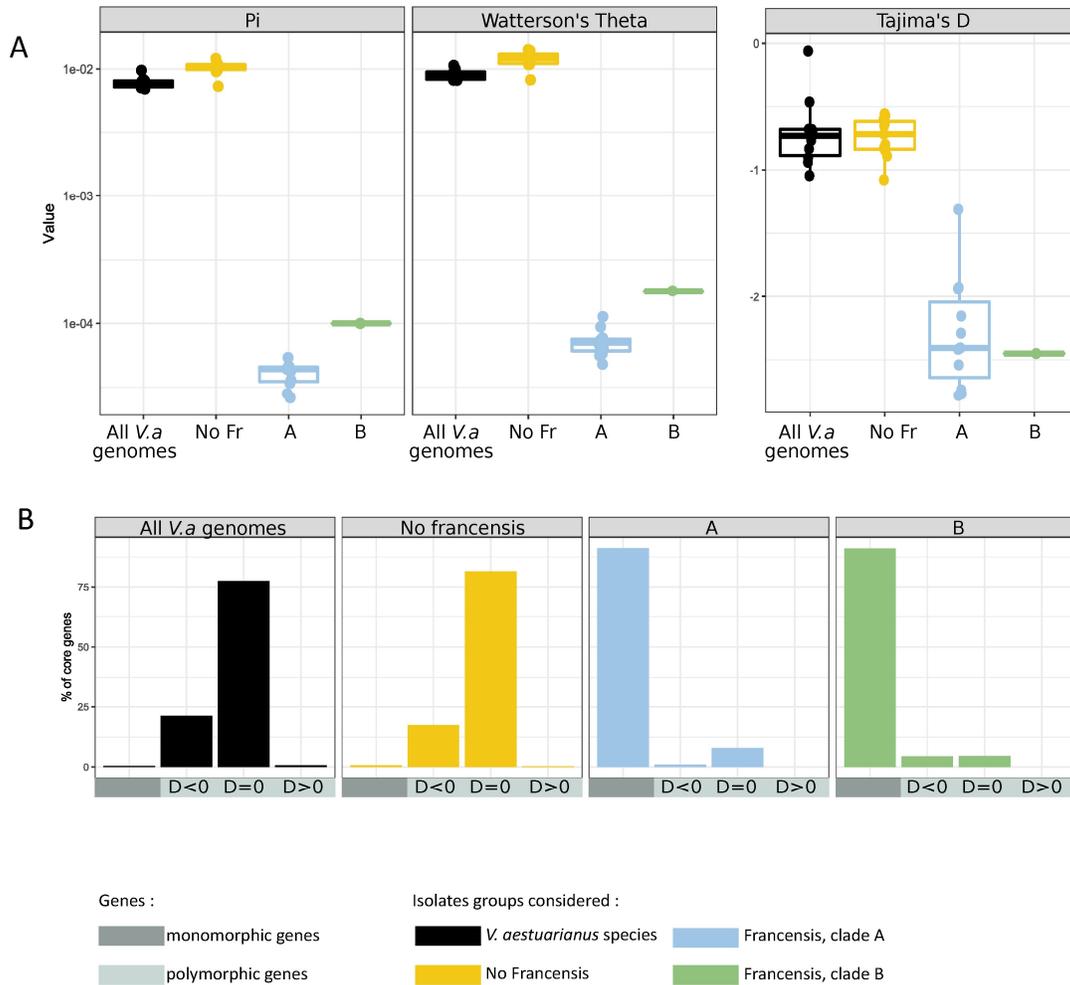


Figure 2: ***V. aestuarianus* diversity is structured according to host species and isolation context.** Phylogenetic tree of *V. aestuarianus* species calculated with RAXML using a GTR substitution model and rooted with the midpoint rooting option from whole-genome alignments. Several layers of annotations are added: country (check mark), matrix of isolation (star), year of isolation (point), virulence testing in the laboratory by injection into oysters ( $10^7$  UFC/animal, duplicates of 10 animals) indicated with a bar plot on the right side representing mortality percentages, and context (strains isolated during oyster mortality events are indicated with a red arrow on the right). *Va. francensis* lineages A and B are highlighted in blue and green, respectively. Their virulence is significantly higher compared to non clinical isolates (i. e. strains isolated on sites without mortalities) by Wilcoxon-Mann-Whitney test ( $p$ -value < 0.001). The absence of virulence data means the absence of a test for this strain.



**Figure 3: Support for a recent bottleneck that purged genetic diversity in *V. aestuarianus francensis* lineages.** Genetic statistics in *V. aestuarianus* species (black), other than *Va francensis francensis* (yellow), *Va francensis*, lineage A (blue) and lineage B (green). A) Whole genome scale. Even through the expected genetic diversity under neutral evolution and a stable population size in *Va francensis* is low (Watterson's theta), the observed diversity (Pi) is still lower, as shown by the Tajima's D value below -2. Pi: observed genetic diversity; Theta\_w: Watterson estimate of expected genetic diversity; Tajima\_D: Tajima's D test statistic. The Y axis in the Pi and Watterson's theta plots is log10 scaled. B) Gene scale. Core genes show different selection patterns among groups of strains and among core genes within groups. While most core genes are under neutral evolution in isolates other than *Va francensis*, most genes are monomorphic in *Va francensis* lineage A and B. D>0 and D<0: significantly negative or positive Tajima's D value ( $p < 0.05$ ) and D=0 ( $p > 0.05$ ). A negative Tajima's D is indicative of purifying selection or recent population expansion, while a positive Tajima's D is indicative of diversifying selection or population contraction. A zero value is indicative of neutral evolution.

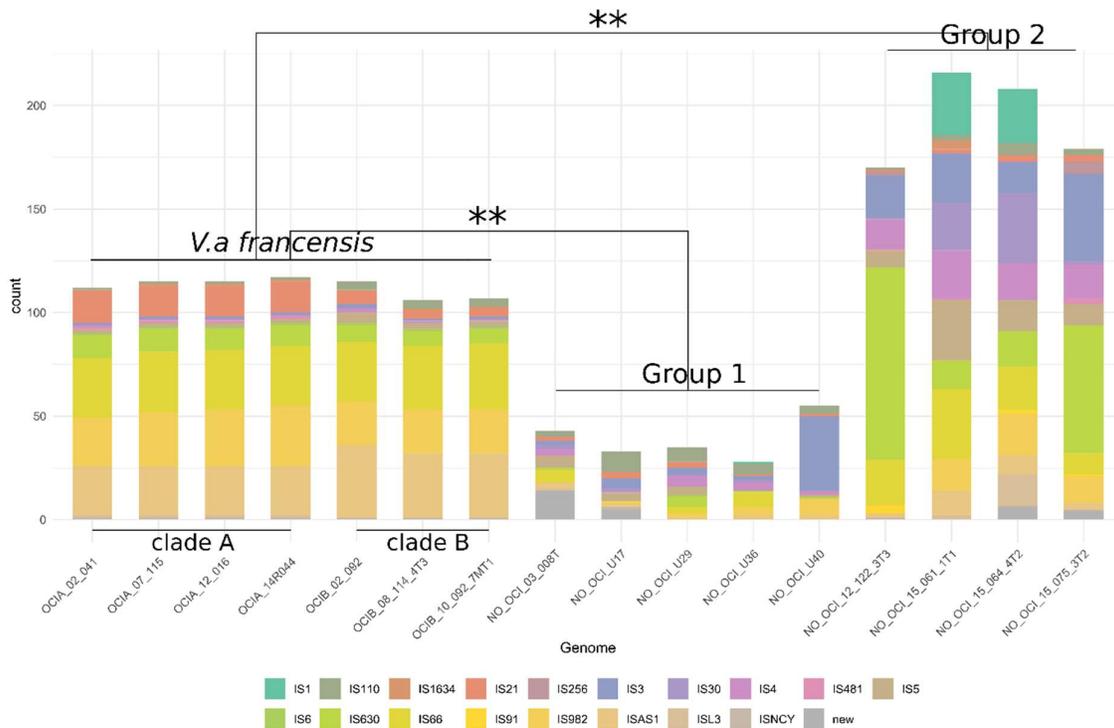
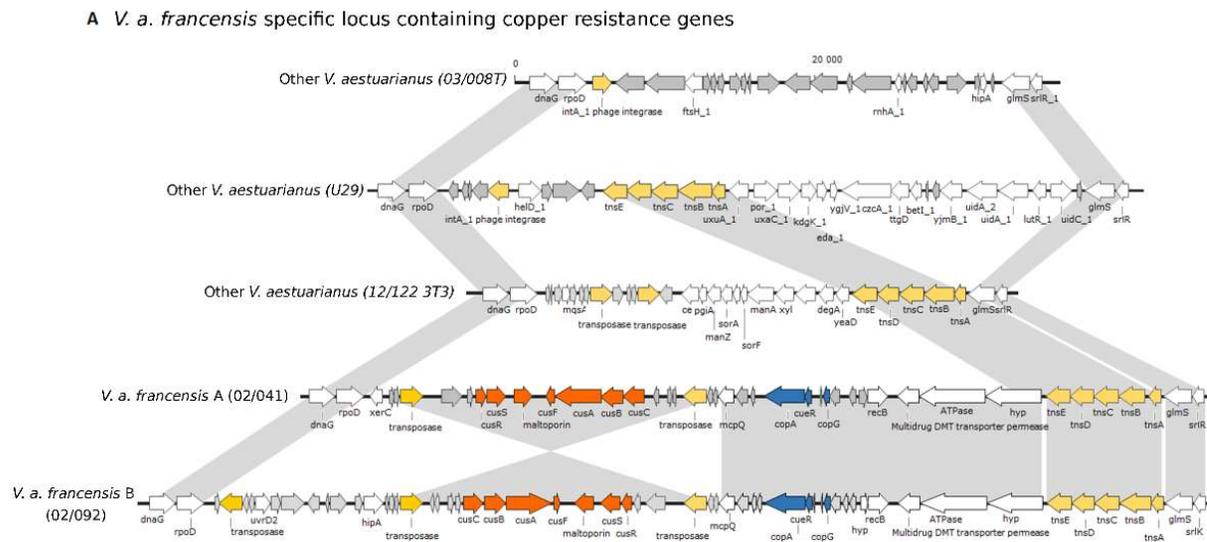
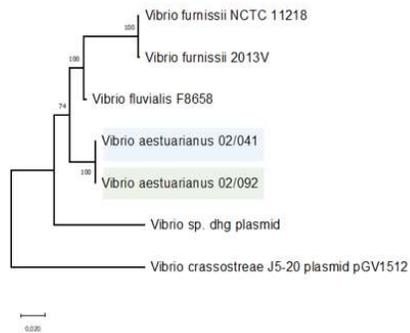


Figure 4: **Differential Insertion sequence (IS) enrichment is observed in *Va francensis* and cockle associated isolates genomes.** Distribution of the number of IS elements (complete and partial) in 16 complete genomes (chromosomes A and B). Colors represent IS families predicted by ISEScan. The genomes are those of 4 *Va francensis* lineage A strains, 3 *Va francensis* lineage B strains, 5 non clinical strains (isolated on sites without mortalities) (group 1), and 4 strains isolated during cockle mortality events (group 2). The conservation of IS number and families between genomes of *Va francensis* from lineage A or clade B indicates an ancestral origin of ISs. The genomes that contain the most ISs are those of strains isolated during cockle mortality events (group 2). The diversity of IS quantities and families represented suggests that IS enrichment is in progress. The number of ISs in groups was significantly different between *Va francensis* and other strains from group 1 and group 2 (\*\*: Kruskal test p value < 0.05).



**B** Evolutionary history of *cus/cop* locus



**C** Copper resistance phenotyping

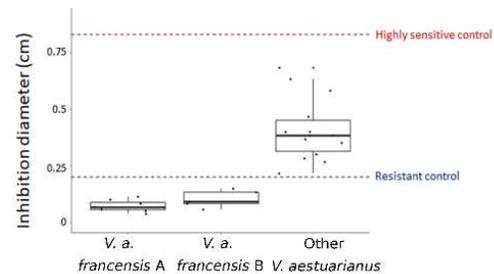


Figure 5: A) ***Va francensis*-specific locus containing copper resistance genes**. Transposase and integrase are indicated in yellow, *cus* genes in orange, and *cop* genes in blue. B) **Evolutionary history of the *cus/cop* locus**. NJ, bootstrap test (500 replicates). The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are shown as the number of base substitutions per site. This analysis involved 8 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There was a total of 29 555 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X [4]. C) **Agar plate assay: bacterial growth inhibition diameter around a pellet impregnated with 50 mM CuSO<sub>4</sub> solution**. *Va francensis* linages A and B are significantly more resistant to copper than other *V. aestuarianus* strains (Wilcoxon-Mann-Whitney test *p* value < 0.001).

## Bibliographic references

1. Le Roux F, Wegner KM, Baker-Austin C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C, Ritchie JM, Defoirdt T, Destoumieux-Garzón D, Blokesch M. 2015. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in microbiology* 6:830.
2. Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* 34:643-661.
3. Hewson I, Button JB, Gudenkauf BM, Miner B, Newton AL, Gaydos JK, Wynne J, Groves CL, Hendler G, Murray M, Fradkin S, Breitbart M, Fahsbender E, Lafferty KD, Kilpatrick AM, Miner CM, Raimondi P, Lahner L, Friedman CS, Daniels S, Haulena M, Marliave J, Burge CA, Eisenlord ME, Harvell CD. 2014. Densovirus associated with sea-star wasting disease and mass mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:17278-17283.
4. Lafferty KD, Kuris AM. 1993. Mass mortality of abalone *Haliotis cracherodii* on the California Channel Islands: tests of epidemiological hypotheses. *Marine Ecology-Progress Series* 96:239-239.
5. Lafferty KD, Harvell CD, Conrad JM, Friedman CS, Kent ML, Kuris AM, Powell EN, Rondeau D, Saksida SM. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science* 7:471-496.
6. Murray AG, Peeler EJ. 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67:223-235.
7. Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivesse S, Alunno-Bruscia M, Polz MF, Le Roux F. 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal* 11:1043-1052.
8. Lemire A, Goudenège D, Versigny T, Petton B, Calteau A, Labreuche Y, Le Roux F. 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME Journal* 9:1523-1531.
9. Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F. 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in microbiology* 6:686.
10. Reen FJ, Almagro-Moreno S, Ussery D, Boyd EF. 2006. The genomic code: inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nat Rev Microbiol* 4:697-704.
11. Garnier M, Labreuche Y, Nicolas JL. 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol* 31:358-65.
12. Lasa A, di Cesare A, Tassistro G, Borello A, Gualdi S, Furones D, Carrasco N, Cheslett D, Brechon A, Paillard C, Bidault A, Pernet F, Canesi L, Edomi P, Pallavicini A, Pruzzo C, Vezzulli L. 2019. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environ Microbiol* 21:4548-4562.
13. Mandas D, Salati F, Polinas M, Sanna MA, Zobba R, Burrai GP, Alberti A, Antuofermo E. 2020. Histopathological and Molecular Study of Pacific Oyster Tissues Provides Insights into *V. aestuarianus* Infection Related to Oyster Mortality. *Pathogens* 9.
14. Dégremont L, Azéma P, Maurouard E, Travers M-A. 2020. Enhancing resistance to *Vibrio aestuarianus* in *Crassostrea gigas* by selection. *Aquaculture* 526:735429.
15. Parizadeh L, Tourbiez D, Garcia C, Haffner P, Dégremont L, Le Roux F, Travers M-A. 2018. Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology* 20:4343-4355.
16. Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J. 2013. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerging microbes & infections* 2:e5-e5.

17. Sheppard SK, Guttman DS, Fitzgerald JR. 2018. Population genomics of bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics* 19:549-565.
18. Martínez JL. 2013. Bacterial pathogens: from natural ecosystems to human hosts. *Environmental Microbiology* 15:325-333.
19. Tibayrenc M, Ayala FJ. 2012. Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:E3305-E3313.
20. Cohan FM. 2002. Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetics of Mate Choice: From Sexual Selection to Sexual Isolation*:359-370.
21. Polz MF, Alm EJ, Hanage WP. 2013. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends Genet* 29:170-5.
22. Goudenège D, Travers MA, Lemire A, Petton B, Haffner P, Labreuche Y, Tourbiez D, Mangenot S, Calteau A, Mazel D, Nicolas JL, Jacq A, Le roux F. 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environ Microbiol* 17:4189-99.
23. Saulnier D, De Decker S, 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. *Journal of Microbiological Methods* 77:191-197.
24. Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL. 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* 53:187-96.
25. Moran NA. 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* 108:583-6.
26. Floriano AM, Castelli M, Krenek S, Berendonk TU, Bazzocchi C, Petroni G, Sasser D. 2018. The Genome Sequence of "Candidatus *Fokinia solitaria*": Insights on Reductive Evolution in Rickettsiales. *Genome Biol Evol* 10:1120-1126.
27. Hauck S, Maiden MCJ. 2018. Clonally Evolving Pathogenic Bacteria, p 307-325. *In* Rampelotto PH (ed), *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution* doi:10.1007/978-3-319-69078-0\_12. Springer International Publishing, Cham.
28. Bergstrom CT, McElhany P, Real LA. 1999. Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:5095-5100.
29. Bäuml A, Fang FC. 2013. Host Specificity of Bacterial Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3.
30. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood JL, Clemens JD, Czerkinsky C, Nair GB, Holmgren J, Parkhill J, Dougan G. 2011. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477:462-5.
31. FranceAgriMer. 2021. <https://www.franceagrimer.fr/>. <https://www.franceagrimer.fr/>. Accessed
32. Namouchi A, Didelot X, Schöck U, Gicquel B, Rocha EP. 2012. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Res* 22:721-34.
33. Claisse D, Alzieu C. 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Marine Pollution Bulletin* 26:395-397.
34. Hall LW, Anderson RD. 1999. A Deterministic Ecological Risk Assessment for Copper in European Saltwater Environments. *Marine Pollution Bulletin* 38:207-218.
35. Rossi N, Jamet J-L. 2008. *In situ* heavy metals (copper, lead and cadmium) in different plankton compartments and suspended particulate matter in two coupled Mediterranean coastal ecosystems (Toulon Bay, France). *Marine Pollution Bulletin* 56:1862-1870.

36. Weng N, Wang W-X. 2014. Variations of trace metals in two estuarine environments with contrasting pollution histories. *Science of The Total Environment* 485-486:604-614.
37. Shi B, Wang T, Zeng Z, Zhou L, You W, Ke C. 2019. The role of copper and zinc accumulation in defense against bacterial pathogen in the fujian oyster (*Crassostrea angulata*). *Fish Shellfish Immunol* 92:72-82.
38. Destoumieux-Garzón D, Canesi L, Oyanedel D, Travers M-A, Charrière GM, Pruzzo C, Vezzulli L. 2020. *Vibrio*-bivalve interactions in health and disease. *Environmental Microbiology* 22:4323-4341.
39. Yeh S-T, Liu C-H, Chen J-C. 2004. Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 17:437-446.
40. Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. 2013. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol Toxicol* 29:397-405.
41. Argüello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T. 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 3:73.
42. Vanhove AS, Duperthuy M, Charriere GM, Le Roux F, Goudenege D, Gourbal B, Kieffer-Jaquinod S, Coute Y, Wai SN, Destoumieux-Garzon D. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* 17:1152-65.
43. Didelot X, Pang B, Zhou Z, McCann A, Ni P, Li D, Achtman M, Kan B. 2015. The Role of China in the Global Spread of the Current Cholera Pandemic. *PLOS Genetics* 11:e1005072.
44. Namouchi A, Didelot X, Schöck U, Gicquel B, Rocha EPC. 2012. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Research* 22:721-734.
45. Didelot X, Bowden R, Street T, Golubchik T, Spencer C, McVean G, Sangal V, Anjum MF, Achtman M, Falush D, Donnelly P. 2011. Recombination and Population Structure in *Salmonella enterica*. *PLOS Genetics* 7:e1002191.
46. Siguier P, Goubeyre E, Chandler M. 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 38:865-891.
47. Touchon M, Rocha EPC. 2007. Causes of Insertion Sequences Abundance in Prokaryotic Genomes. *Molecular Biology and Evolution* 24:969-981.
48. Travers MA, Tourbiez D, Parizadeh L, Haffner P, Kozic-Djellouli A, Aboubaker M, Koken M, Degremont L, Lupo C. 2017. Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* 48:32.
49. Garcia C, Thébault A, Degremont L, Arzul I, Miossec L, Robert M, Chollet B, François C, Joly J-P, Ferrand S, Kerdudou N, Renault T. 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research* 42:73.
50. Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers MA. 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* 131:2-10.
51. Azéma P, Maurouard E, Lamy J-B, Degremont L. 2017. The use of size and growing height to improve *Crassostrea gigas* farming and breeding techniques against OsHV-1. *Aquaculture* 471:121-129.
52. Azema P, Travers MA, De Lorgeril J, Tourbiez D, Degremont L. 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Vet Res* 46:139.
53. Azema P, Lamy JB, Boudry P, Renault T, Travers MA, Degremont L. 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet Sel Evol* 49:23.

54. Azéma P, Travers M-A, Benabdelmouna A, Dégremont L. 2016. Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal of Invertebrate Pathology* 139:92-101.
55. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19:535-544.
56. Wingett SW, Andrews S. 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res* 7:1338.
57. Bush SJ. 2020. Read trimming has minimal effect on bacterial SNP-calling accuracy. *Microbial Genomics* 6.
58. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 19:455-477.
59. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072-5.
60. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology* 37:540-546.
61. Vaser R, Sovic I, Nagarajan N, Sikic M. 2017. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research* doi:10.1101/gr.214270.116.
62. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210-3212.
63. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068-2069.
64. Cantalapiedra CP, Hernández-Plaza A, Letunic I, Bork P, Huerta-Cepas J. 2021. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution* 38:5825-5829.
65. Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, Mende DR, Letunic I, Rattei T, Jensen Lars J, von Mering C, Bork P. 2018. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research* 47:D309-D314.
66. Xie Z, Tang H. 2017. ISEScan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* 33:3340-3347.
67. Syberg-Olsen MJ, Garber AI, Keeling PJ, McCutcheon JP, Husnik F. 2021. Pseudofinder: detection of pseudogenes in prokaryotic genomes. *bioRxiv* doi:10.1101/2021.10.07.463580:2021.10.07.463580.
68. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:81-91.
69. Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010. progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss and Rearrangement. *PLOS ONE* 5:e11147.
70. Didelot X, Wilson DJ. 2015. ClonalFrameML: Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes. *PLOS Computational Biology* 11:e1004041.
71. Rambaut A, Lam TT, Max Carvalho L, Pybus OG. 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution* 2.
72. Minin VN, Bloomquist EW, Suchard MA. 2008. Smooth Skyride through a Rough Skyline: Bayesian Coalescent-Based Inference of Population Dynamics. *Molecular Biology and Evolution* 25:1459-1471.

73. Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W. 2002. Estimating Mutation Parameters, Population History and Genealogy Simultaneously From Temporally Spaced Sequence Data. *Genetics* 161:1307-1320.
74. Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA. 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67:901-904.
75. Baele G, Lemey P, Bedford T, Rambaut A, Suchard MA, Alekseyenko AV. 2012. Improving the Accuracy of Demographic and Molecular Clock Model Comparison While Accommodating Phylogenetic Uncertainty. *Molecular Biology and Evolution* 29:2157-2167.
76. Baele G, Li WLS, Drummond AJ, Suchard MA, Lemey P. 2012. Accurate Model Selection of Relaxed Molecular Clocks in Bayesian Phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution* 30:239-243.
77. Subramanian S. 2016. The effects of sample size on population genomic analyses – implications for the tests of neutrality. *BMC Genomics* 17:123.
78. Paradis E. 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* 26:419-420.
79. Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* 3:257-273.

## Données supplémentaires

Les figures supplémentaires sont disponibles en annexe 2 de ce manuscrit.

Les tableaux supplémentaires sont disponibles dans un document en ligne, à l'adresse suivante :

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1LsP2QPjiRrcZ3yEAJZIIQrUB71TEHBwy6FsLvER9WI/edit?usp=sharing>

## Données supplémentaires à l'article 2 : Écologie de *V. aestuarianus francensis*

### Introduction

Bien que *V. aestuarianus francensis* soit associée aux mortalités des huîtres, les informations sur son cycle de vie, ses préférences écologiques et sur les facteurs favorisant le développement de la maladie sont limitées. Parizadeh et ses collaborateurs (Parizadeh et al., 2018) ont détecté des souches *V. aestuarianus francensis*, la sous-espèce pathogène d'huîtres, en association forte avec les tissus des huîtres, pendant et après des mortalités d'huîtres lors d'un suivi dans une claire ostréicole. De plus, les données supplémentaires sur le spectre d'hôte de cette sous-espèce, présentées dans le chapitre 1, ont montré que la souche 02/041 n'avaient pas pu infecter d'autre bivalve que les huîtres creuses et les huîtres plates. Ces données suggèrent que la bactérie est fortement associée à son hôte, et qu'elle aurait perdu la capacité d'occuper d'autres habitats. Ainsi, cet agent pathogène pourrait être un spécialiste de l'huître. Appuyant cette hypothèse, l'article présenté ci-dessus, montre que *V. aestuarianus francensis* possède d'autres caractéristiques de pathogène spécialiste, telles que la faible recombinaison dans les génomes de chaque lignée ainsi qu'un pan-génome fermé. Ces deux indices suggèrent que les échanges de gènes avec des bactéries d'autres populations sont rares voire inexistantes depuis l'émergence de ces lignées. L'une des explications de cela pourrait être un isolement écologique : les bactéries des lignées pathogènes occuperaient un seul habitat, l'huître, et auraient alors peu d'opportunités d'échanger du matériel génétique avec d'autres populations. Une autre caractéristique des bactéries des lignées pathogènes d'huîtres est l'enrichissement de leurs génomes en petits éléments transposables (séquences d'insertion), associé à une pseudogénération, qui pourrait être la première étape d'une rationalisation génomique, un processus largement décrit chez les bactéries pathogènes intracellulaires. En effet, la stabilité de leur habitat entraîne l'inutilité d'une partie de leurs gènes, qui ne sont alors plus sous pression de sélection, et peuvent accumuler des mutations et des éléments transposables (Siguier et al., 2014). L'ensemble de ces observations nous mène ainsi à émettre l'hypothèse que l'huître serait le seul habitat stable de *V. aestuarianus francensis*.

Au-delà des habitats, les connaissances sur les facteurs environnementaux influençant la dynamique de l'infection des huîtres par *V. aestuarianus francensis* sont restreintes. Des premiers travaux ont suggéré une transmission modérée de *V. aestuarianus* chez les huîtres creuses, sous influence de la température (Lupo et al., 2020). En effet, plus l'eau de mer est chaude plus rapide est l'infection (O'Toole et al., 2017). A ce jour, un seul suivi en milieu

naturel a été réalisé (Parizadeh et al., 2018), il paraît donc important de disposer de plus de données solides se basant sur des échantillonnages *in situ* et de préciser l'ensemble des conditions environnementales influençant la transmission ou l'expression de la maladie associée à *V. aestuarianus francensis*.

Cette partie présente des données supplémentaires permettant d'apporter quelques réponses quant à l'écologie de *V. aestuarianus francensis*, acquises dans le cadre des projets MIRAGE (financé par la DPMA<sup>1</sup> et porté par MA Travers) auquel j'ai eu l'opportunité de participer et MICROLAG (financé par le labex Cemeb<sup>2</sup> et porté par A Caro). De nombreuses personnes sont intervenues pour mener à bien ces projets : Marie-Agnès Travers (IHPE), Marion Richard (MARBEC LERLR), Gaëlle Courtay (IHPE), Remi Villeneuve (MARBEC LERLR), Franck Lagarde (MARBEC LERLR), Gregory Messiaen (MARBEC LERLR), Nicolas Cimiterra (MARBEC LERLR), Hervé Violette (MARBEC LERLR), Béatrice Bec (Université de Montpellier), Sofia Sahnoun (IHPE) pour le projet MIRAGE ; et Audrey CARO (MARBEC), Yannick Gueguen (MARBEC), Juliette Pouzadoux (IHPE) et Arthur Cousson (MARBEC) pour le projet MICROLAG.

Dans le cadre de ces projets, des suivis en milieu naturel ont été menés dans le bassin de Thau, dans des parcs ostréicoles proches, sur lesquels des épisodes de mortalités d'adultes avaient été recensés, et attribués à *V. aestuarianus*. Le projet MICROLAG était initialement centré sur l'écologie d'un autre agent pathogène affectant les huîtres, l'herpès virus OsHV-1, mais nous avons eu l'opportunité de pouvoir utiliser cet échantillonnage complémentaire pour rechercher la bactérie *V. aestuarianus*.

Dans le cadre du projet MIRAGE, 5 campagnes de prélèvements dans plusieurs compartiments environnementaux (huîtres, macroalgues, sédiments, eau filtrée sur 20 µm, 5 µm et 0.2 µm) ont été réalisées entre mai et octobre 2021. Le site suivi était situé dans la première rangée de table de la zone de Bouzigues.

Dans le cadre du projet MICROLAG, 9 campagnes de prélèvement dans plusieurs compartiments environnementaux (huîtres adultes, eau filtrée 0.2 µm, sédiment) ont été réalisées entre février et octobre 2021. Le site suivi était situé dans la rangée de table du milieu de la zone de Bouzigues.

---

<sup>1</sup> DPMA Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture, du ministère en charge de l'écologie

<sup>2</sup> CEMEB Centre Méditerranéen Environnement et Biodiversité

## Matériel et méthodes

### Suivi des mortalités sur le terrain

Un suivi des mortalités d'huîtres a été réalisé en partenariat avec l'entreprise conchylicole Huîtres-Bouzigues.com (HBC), située dans la Zone conchylicole accès Est du Port de Loupian, sur l'étang de Thau en 2020 et en 2021.

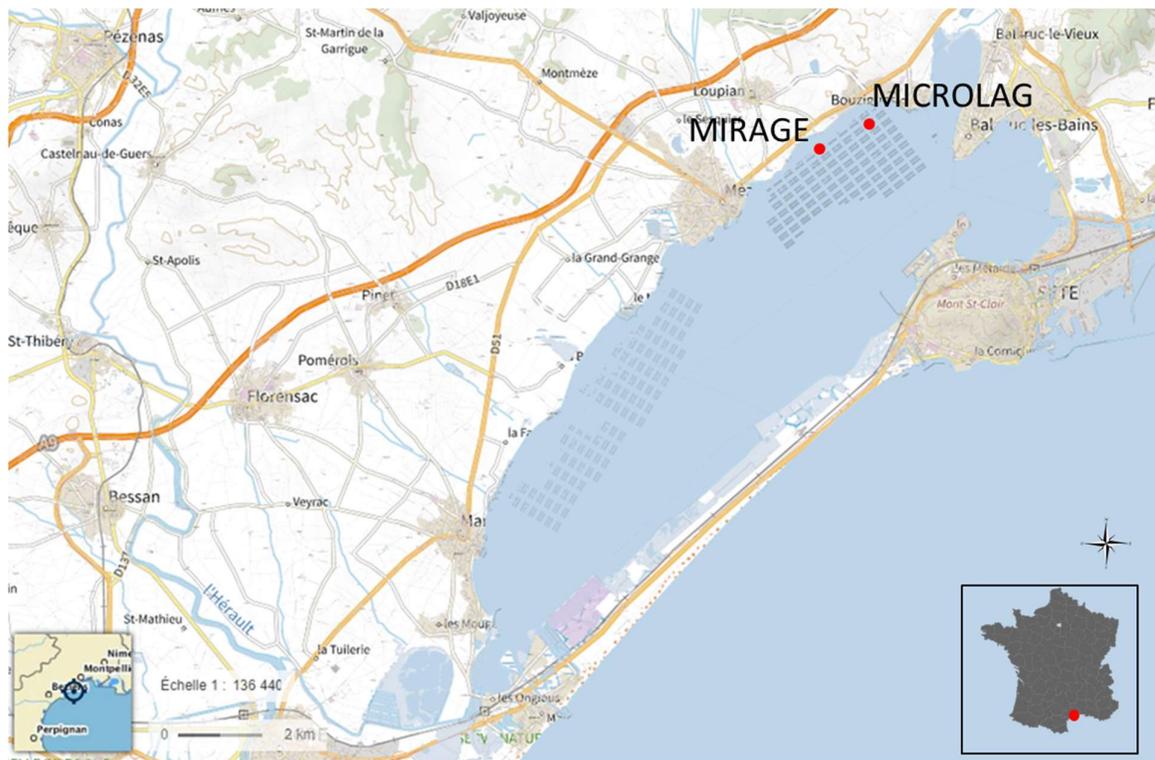


Figure 26 : Localisation des zones de suivi dans le Bassin de Thau (Source : Geoportail.fr).

Pour les 2 projets, des tables ostréicoles ont été mises à disposition par des producteurs de l'Étang de Thau (HBC). Des animaux achetés par ces producteurs d'huîtres dans des écloséries (selon leurs pratiques culturelles habituelles) ont également été utilisés.

Pour le projet MIRAGE, 3 poches de 15kg d'huîtres issues de tables « Grande » ont été tirés au hasard parmi les 190 poches, stockées sur la même table. Ces poches ont été identifiées pour le suivi de mortalité. A chaque comptage, les poches ont été vidées pour un dénombrement des individus morts, moribonds et vivants. Chez une huître moribonde, les valves sont relâchées mais se referment après stimulation. Chez une huître morte, les valves sont ouvertes et il n'y a plus de réaction aux stimulations. A partir des comptages, les taux de

mortalité ont été calculés en cumulé (cumul des morts rapporté à l'abondance initiale d'huîtres) et en instantané (nombre de mort à l'instant t rapporté à l'abondance initiale d'huîtres) à fréquence hebdomadaire ou mensuelle. Après chaque comptage, toutes les huîtres ont été remises en poches quel que soit leur statut (mort, vivant, moribond).

Pour le projet MICROLAG, les huîtres suivies étaient collées sur deux cordes, avec 144 adultes chacune. Une des cordes était dédiée au suivi de mortalité et l'autre aux prélèvements (même si les données de mortalité ont tout de même été enregistrées pour cette seconde corde). Comme précédemment, les mortalités ont été calculées en instantané et en cumulé.

### **Niche écologique de *V. aestuarianus francensis* dans l'étang de Thau**

Afin de définir la niche écologique de *V. aestuarianus francensis*, quatre campagnes d'échantillonnages ont été réalisées en plongée. Elles ont été réalisées les 26/05/21, 30/06/21, 28/07/21 et 27/10/21. Ces dates ont été définies à partir des constats de mortalités effectués antérieurement dans l'étang de Thau. En effet des mortalités avaient été constatées à la fin du mois de mai 2020 et à la fin du mois de juin 2021.

### Habitat de la bactérie

Lors de chaque campagne d'échantillonnage, des prélèvements d'eau de mer ont été effectués à hauteur des poches d'huîtres à l'aide d'une bouteille Hydrobios. Au laboratoire, l'eau de mer prélevée a été filtrée sur 20 µm, 5 µm et 0,2 µm. Cinq carottes de sédiment ont été réalisées par des plongeurs et des prélèvements ont été effectués sur les premiers centimètres de la carotte. Un diagnostic de macrophytes et un prélèvement de chaque espèce d'algues a été effectué par deux plongeurs. Lors de chaque campagne, 10 huîtres ont été prélevées par les plongeurs dans les poches de réserves.

L'ensemble des échantillons du projet Mirage (filtres, sédiments, huîtres, macrophytes) et Microlag (huîtres adultes) ont été broyés selon le protocole standard du broyeur Precellys : 5500 rpm, 2 cycles de 20 secondes séparés par une pause de 30 secondes à température ambiante, avec 1ml/g de tampon de lyse ATL. Pour les échantillons d'huîtres, la concentration en ADN total extrait a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Fisher), et ajustée à 5 ng/µL. Les détections de *V. aestuarianus* ont été réalisées grâce aux protocoles de qPCR développés par Saulnier et ses collaborateurs (Saulnier et al., 2009) en utilisant une courbe standard d'ADN titré de *V. aestuarianus*.

### Données environnementales

Les données météorologiques (température de l'air et cumul de pluie) ont été fournies par Météofrance pour la station de Sète. Les données concernant la température de l'eau, la salinité, l'oxygène dissous ont été obtenues grâce aux bases de données du réseau d'observation du REPHY (Réseau Phytoplancton). Toutes ces données couvrent la période comprise entre le 1<sup>er</sup> janvier 2020 et le 31 décembre 2021.

De plus, un enregistreur mesurant les concentrations en oxygène dissous et la température de l'eau (HOBO U26) a été mis en place au niveau de poches d'huîtres suivies pour la mortalité. Les mesures étaient enregistrées toutes les heures entre le 29/05/2020 et le 02/09/2020, et toutes les 15 minutes entre le 17/05/2021 et le 04/11/2021.

## Résultats et discussion

Sur le site choisi sur la base des données de mortalité observées en 2020 (Données de M. Richard et huitresbouzigues.com), nous avons pu suivre en 2021 des mortalités plus progressives. En 2020, les mortalités ont été importantes, jusqu'à atteindre un taux cumulé de  $64.5 \pm 4.9\%$  le 19 août (Figure 27). La mortalité avait progressé rapidement puisque l'essentiel des individus étaient morts entre la 20<sup>e</sup> semaine et la 30<sup>e</sup> semaine de l'année. En 2021, les mortalités d'huîtres ont augmenté plus progressivement et sur toute la période de suivi, entre la 20<sup>e</sup> semaine et la 50<sup>e</sup> semaine de l'année (Figure 27). Aucun phénomène de mortalité massive n'a été observé pendant le mois de mai, comme cela avait été le cas en 2020. Finalement, la mortalité cumulée a atteint  $43,9 \pm 6,9\%$  le 25 octobre. Sur le deuxième site suivi en 2021 sur le site de Bouzigues, et avec des pratiques culturelles différentes (cordes et non poches), les mortalités cumulées ont atteint 39.93% en 2021, ce qui est tout à fait comparable aux données obtenues sur l'autre site. Ces résultats montrent que, quelle que soit la dynamique des mortalités, les conséquences pour les ostréiculteurs sur l'année restent importantes.

Les plus faibles mortalités observées en 2021 peuvent être liées à des conditions environnementales moins favorables comme de salinités de l'eau de mer importantes constatée cette année-là (Figure 28.D). En effet, des tests de corrélation entre les moyennes mensuelles de salinité et les taux de mortalité ont montré une corrélation négative ( $R^2 = 0,69$ ,  $p=0,0026$ ,  $n=10$ ). Les taux de mortalités les plus élevées étaient en effet observés au moment des valeurs de salinités les plus faibles (Figure 29.A). Aucune relation linéaire n'a été observée entre mortalité et température de l'eau (Figure 29.B). Les mortalités ont été observées entre 18 et 25°C.

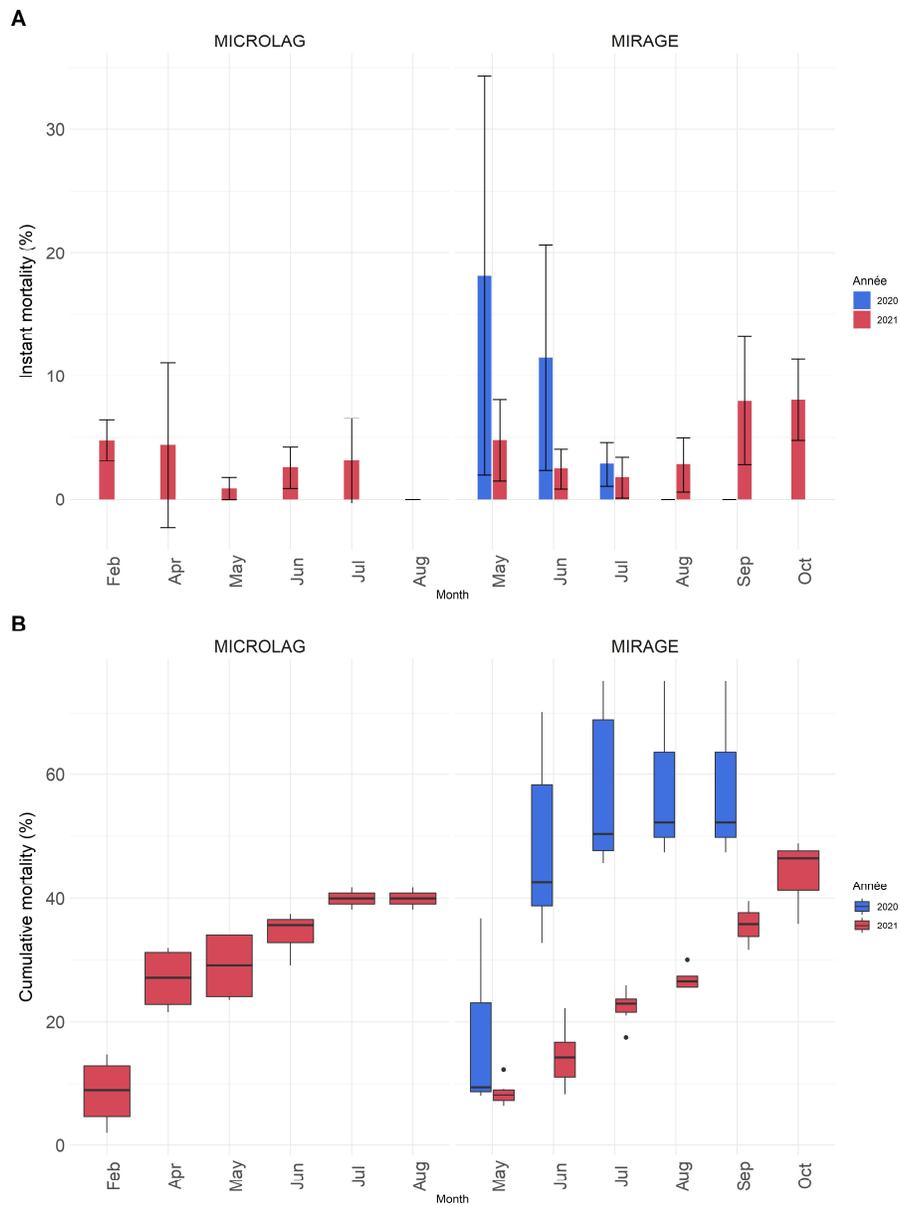


Figure 27 : A : Moyennes ( $\pm$  Ecart type) du taux mensuel de mortalité observés dans le cadre du projet MIRAGE en 2021 et des projets MIRAGE et MICROLAG en 2021, dans le bassin de Thau. B : Boxplot représentant la distribution des taux cumulés de mortalité.

Les taux de mortalité mesurés dans le cadre de MIRAGE ont été obtenus à partir de 3 poches. Les taux de mortalité observés dans le cadre de MICROLAG ont été obtenus à partir de 2 cordes.

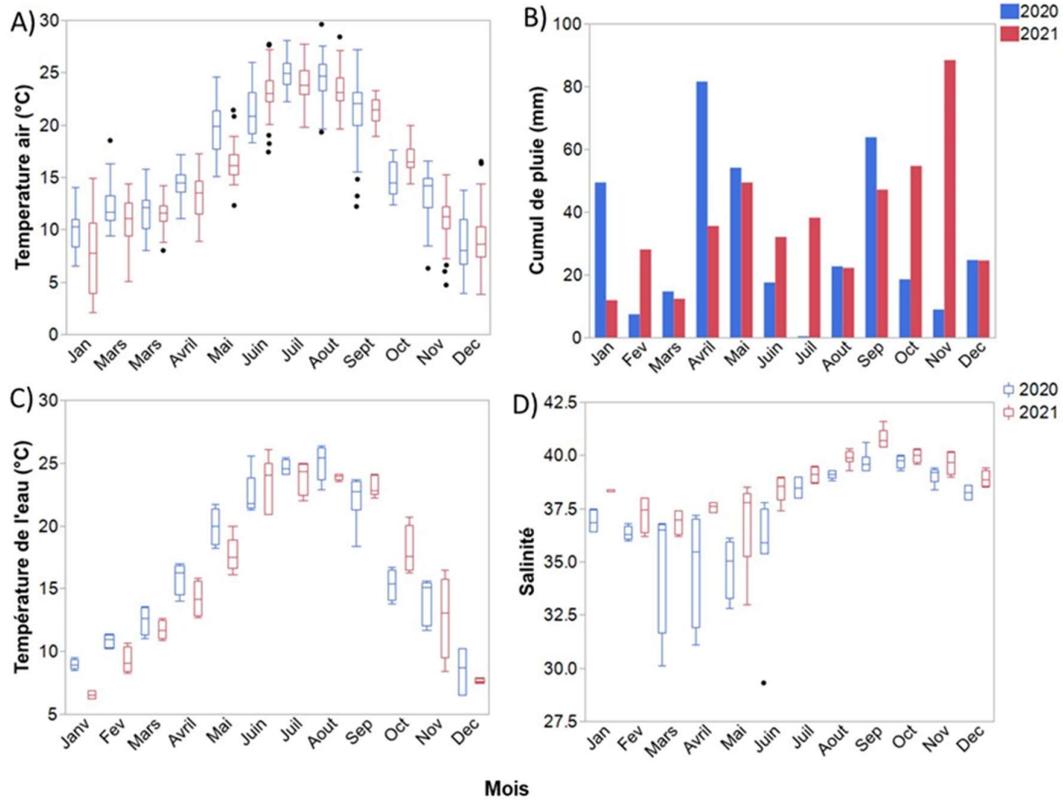


Figure 28 : Evolution mensuelle de A) la température de l'air (°C), B) du cumul de pluie, C) de la température de l'eau et C) de la salinité de l'eau observés au niveau de Sète (A, B) et au niveau du site REPHY Bouzigues a (C, D) en 2020 et 2021.

La ligne centrale des boîtes à moustache correspond à la médiane. Les boîtes sont construites à l'aide du 25 et du 75eme percentile. Les extrémités des moustaches représentent les valeurs min et max du paramètres étudiés. Les points sont considérés comme des valeurs aberrantes. Figure extraite du rapport MIRAGE 2021, réalisée par Marion Richard.

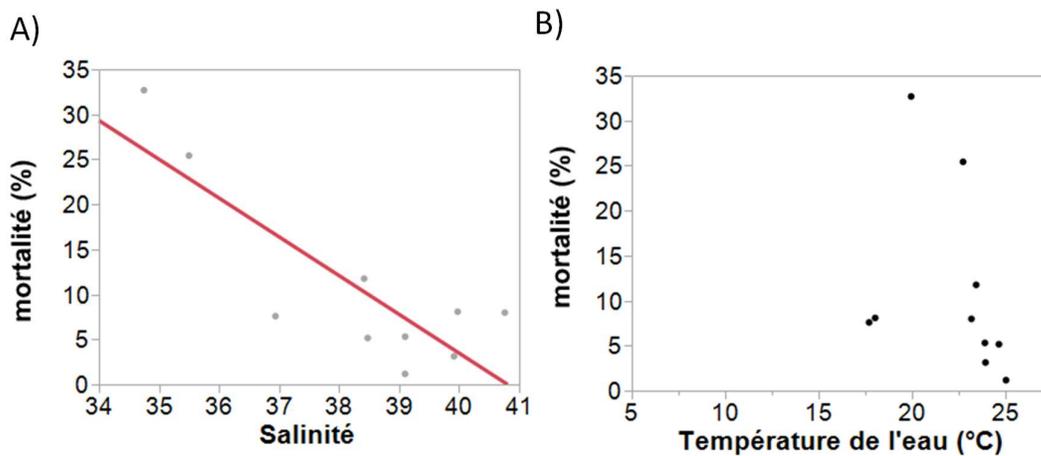


Figure 29 : A) Relation linéaire significative observée entre les taux cumulés mensuels moyens de mortalités et les moyennes de salinité mensuelles, B) taux cumulés mensuels moyens de mortalité représentés en fonction des températures moyennes mensuelles de l'eau.

Figure extraite du rapport MIRAGE 2021, réalisée par Marion Richard.

Lors du suivi de la bactérie dans les différents compartiments de l'environnement, effectué en 2021, la prévalence était faible dans les animaux même si l'échantillonnage ne permet pas de l'estimer précisément (Tableau 3). En dehors d'un échantillon d'eau de mer prélevé le 25 mai, tous les échantillons autres que les huîtres étaient négatifs pour *V. aestuarianus*, suggérant que la bactérie ne se développe pas dans l'environnement, même si elle se transmet par l'eau de mer. Concernant les huîtres adultes, les concentrations mesurées dans les tissus étaient faibles (de l'ordre de  $10^4$  bactéries / 25 ng d'ADN extrait) et n'ont été observées que dans 6 des 13 campagnes. Ces résultats suggèrent que *V. aestuarianus francensis* est présente dans les huîtres pendant toute l'année à faibles concentrations et en prévalences faibles.

Tableau 3 : Nombre d'échantillons positifs / nombre d'échantillons total prélevés dans plusieurs compartiments de l'environnement.

Les compartiments échantillonnés étaient les huîtres adultes (1 échantillon = 1 individu), le sédiment (premiers centimètres du sédiment à proximité des tables ostréicoles), les particules en suspension dans l'eau de mer (fractions 0,22-5  $\mu\text{m}$  ; 5-20  $\mu\text{m}$  et > 20  $\mu\text{m}$ ) et les macroalgues. Les échantillons positifs sont indiqués en gras. La dernière ligne indique le nombre de campagne au cours desquelles *V. aestuarianus* a été détecté / nombre total de campagnes effectuées, pour chaque compartiment.

Date	Huîtres adultes	Sédiment	Eau de mer			Macroalgues	Projet
			0,22 – 5 $\mu\text{m}$	5 – 20 $\mu\text{m}$	> 20 $\mu\text{m}$		
23/02	<b>2/10</b>	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
27/04	0/10	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
20/05	0/10	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
27/05	<b>2/10</b>	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
25/05	<b>1/11</b>	-	<b>2/3</b>	0/3	0/3	0/9	MIRAGE
03/06	0/5	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
10/06	0/5	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
17/06	<b>1/5</b>	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
01/07	<b>1/10</b>	-	0/3	0/3	0/3	0/9	MIRAGE
13/07	0/5	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
28/07	<b>1/10</b>	-	0/3	0/3	0/3	0/9	MIRAGE
27/08	0/5	0/10	-	-	-	-	MICROLAG
28/10	0/10	-	0/3	0/3	0/3	0/11	MIRAGE
Toutes les campagnes	<b>6/13</b>	0/9	<b>1/4</b>	0/4	0/4	0/4	

## Conclusions

Grâce à deux projets de suivi des mortalités liées à *V. aestuarianus* dans l'étang de Thau, MIRAGE et MICROLAG, la niche de cette bactérie pathogène pour les huîtres a pu être précisée. Son habitat semble limité aux huîtres puisque la bactérie n'a pas été détectée dans les autres compartiments échantillonnés, quel que soit le mois d'échantillonnage et le niveau de mortalité observé. Seul un échantillon de particules en suspension dans l'eau de mer (fraction 0,22-5 µm, correspondant aux bactéries libres et aux petites particules (Yung et al., 2016) a été positif, au moment où nous avons pu isoler la bactérie dans un individu moribond. Nous savons que *V. aestuarianus* est transmise d'un individu à l'autre en tant que bactérie libre dans l'eau de mer (Parizadeh et al., 2018). Les bactéries détectées dans cette échantillon pourraient être des bactéries excrétées par des huîtres moribondes peu de temps avant leur décès. Le fait qu'il s'agisse de l'unique échantillon positif, parmi ceux prélevés dans l'environnement, suggère que la bactérie ne se maintient pas dans l'environnement, qu'elle y transite et que l'huître est son unique habitat. Néanmoins, il reste difficile de prouver l'absence d'un micro-organisme, de par les seuils de détection des méthodes de dépistage. De nouvelles études, au cours d'évènements plus massifs, et avec un échantillonnage plus conséquent sont à prévoir pour compléter nos données.

Dans le cadre de ces suivis, il a été observé qu'une diminution de la salinité pourrait être liée à une augmentation des mortalités liées à cette bactérie. En effet, une corrélation négative a été mise en évidence entre les mortalités cumulées et la salinité. De plus, les mortalités moins importantes et plus progressives observées en 2021, pourraient être liées à une salinité globalement plus élevée dans le bassin de Thau cette année-là. Cependant, d'autres facteurs sont à explorer et pourraient participer au développement de la maladie (oxygène dissous, état reproductif, microflore hémolympatique...) afin d'identifier les périodes/zones/pratiques à risque et d'imaginer avec les professionnels d'éventuelles mesures prophylactiques.

### Chapitre 3 : Dynamique de *Vibrio aestuarianus* chez les coques *Cerastoderma edule* dans des gisements exploités des Hauts de France

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, qui contient les pathogènes de coques *Cerastoderma edule*. Jusqu'alors, les données concernant la niche écologique de *V. aestuarianus cardii* étaient très lacunaires, de même que la structure génétique de cette population. Nous présentons donc une étude portant sur la dynamique évolutive et l'écologie des populations de *V. aestuarianus cardii* dans les gisements naturels de coques des Hauts de France. Il s'agit d'une zone impactée par les mortalités de coques dues à ce pathogène, plus précisément en baie de Somme et en baie d'Authie. Ces deux baies, distantes d'environ 10 kilomètres, sont caractérisées par une activité professionnelle de pêche à pied et environ 3000 tonnes de coques y sont collectées par an. Un suivi a été réalisé sur plusieurs sites dans ces deux baies entre 2019 et 2021 et a permis de collecter de nombreux échantillons de coques adultes et naissains et de sédiments. De plus, des moules élevées à proximité des gisements de coques ont été prélevées dans le cadre de ce suivi. Ces échantillons ont été collectés avant, pendant et après les mortalités de coques.

Les objectifs de cette étude étaient de mieux caractériser l'habitat de *V. aestuarianus cardii* tout au long de l'année tout en identifiant des paramètres environnementaux influençant le développement de la maladie. De plus, l'isolement des souches et le séquençage de leurs génomes complets, a permis de réaliser des analyses de génétique de populations, et d'identifier des facteurs potentiels d'émergence de lignées pathogènes pour les coques.



### Article 3: Ecology and population genetic of *Vibrio aestuarianus cardii* in cockle beds in Hauts-de-France

Mesnil, A., Tourbiez, D., Jacquot, M., Hocquet, J., Dégremont, L., Girardin, F., Ricard, M., Rocroy, M., Merland, A., Destoumieux-Garzón, D., Travers, M-A., Garcia, C.

#### Résumé de l'article 3

Les données génétiques combiné aux données de prévalence permettent de décrire les distributions des populations chez les hôtes et peut aider à caractériser leur niche écologique. La sous-espèce *Vibrio aestuarianus cardii* récemment décrite est une bactérie pathogène qui affecte depuis 2012 les gisements naturels de coques *C. edule* situés le long des côtes de la Manche. Cependant, on sait peu de choses sur les préférences écologiques de cette sous-espèce et sur les processus évolutifs qui façonnent sa diversité. Dans cette étude, nous avons suivi *V. aestuarianus cardii* dans des bancs naturels de coques sur deux sites impactés en baie de Somme et en baie d'Authie et effectué des analyses génomiques comparatives de 40 souches afin de mieux définir les préférences écologiques de *V. aestuarianus cardii* dans ces zones. Cela nous permet de définir des conditions thermiques permissives permettant le développement bactérien au sein des populations de coques, et d'identifier les naissains de coques comme un réservoir probable. Nous avons identifié plusieurs génogroupes associés aux coques mais avec différents niveaux de virulence. De plus, les résultats ont montré que les échanges génétiques sont fréquents au sein de ces génogroupes et auraient pu favoriser la différenciation génétique et permettre l'acquisition de facteurs de virulence tels que les systèmes de sécrétion de type 1 et de type 6.



# Ecology and population genetic of *Vibrio aestuarianus cardii* in cockle beds in Hauts-de-France

Aurélie Mesnil<sup>1,2#</sup>, Delphine Tourbiez<sup>1#</sup>, Maude Jacquot<sup>1</sup>, Juliette Hocquet<sup>1</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Frédéric Girardin<sup>1</sup>, Morgane Ricard<sup>3</sup>, Mélanie Rocroy<sup>4</sup>, Antoine Merland<sup>3</sup>, Delphine Destoumieux-Garzon<sup>2</sup>, Marie-Agnès Travers<sup>2#\*</sup> et Céline Garcia<sup>1#</sup>

# Aurélie Mesnil / Delphine Tourbiez equally participated to this work

# Marie-Agnès Travers / Céline Garcia equally participated to this work

\* Marie-Agnès Travers : corresponding author

Manuscript in preparation

## Abstract

Genetic data combined with prevalence data make it possible to describe the distributions of populations among hosts and can help to characterize their ecological niche. The recently described *Vibrio aestuarianus cardii* subspecies is a pathogenic bacterium that has been affecting natural cockle *C. edule* beds along the Channel coasts since 2012. However, little is known about the ecological preferences of this subspecies and the evolutionary processes that shape its diversity. In this study, we followed *V. aestuarianus cardii* in natural cockle beds at two impacted sites in the Bay of Somme and the Bay of Authie and performed comparative genomic analyses of 40 strains to better define the ecological preferences of *V. aestuarianus cardii* in these areas. This allows us to define permissive thermal conditions allowing bacterial development within cockle populations, and to identify cockle spat as a likely reservoir. We identified several cockle-associated genogroups but with different levels of virulence. Moreover, the results showed that genetic exchanges are frequent within these genogroups and could have favoured genetic differentiation and allowed the acquisition of virulence factors such as type 1 and type 6 secretion systems.

## Introduction

*Cerastoderma edule* is a key species of estuarine ecosystems and of the economics of professional beach fishing in Hauts-de-France. Cockle beds in the Picardy estuaries are among the most productive for this species in France (3000 tons a year) (Bellamy et al., 2009). However, cockles are subjected to mortality episodes linked to several factors such as anoxia (Desprez et al., 1992), that can promote the proliferation of anaerobic bacteria, potentially pathogenic for bivalves (Coffin et al., 2021). Other driving factors are predation, diseases, climatic events, pollution, poor recruitment and over-fishing (Ducrottoy et al., 1991). They are

affected by numerous parasites including trematod *Gymnophallus choledochus*, and protozoan *Marteilia cochillia* (Longshaw & Malham, 2013). In 2012, a novel cockle pathogen has been identified in Hauts-de-France: the bacteria *V. aestuarianus*. Several strains from this species have regularly been isolated from moribund adult cockles since then, collected through French zoosanitary surveillance system (Garcia et al., 2021).

*V. aestuarianus* is known as an oyster pathogen involved in adult mortalities dramatically affecting oyster farms in France since its re-emergence in 2012 (Garnier et al., 2008; Goudenège et al., 2015), and expanding in Europe (Mesnil et al submitted). *V. aestuarianus* oyster pathogenic isolates belong to *Francensis* subspecies (Garnier et al., 2008) whereas cockle pathogenic isolates belong to the recently described subspecies *Cardii* (Garcia et al., 2021). To date, cockle mortalities associated with *V. aestuarianus cardii* were reported only on the French Channel coast, mostly during summer and their dynamic seems to be influenced by temperature (Garcia et al., 2021).

In order to better understand, and potentially predict, the development of diseases and the spread of pathogens, it is crucial to define their ecological niche, namely the multidimensional properties of the lifestyle of the pathogen population, including the resources it uses, preferred physico-chemical conditions, and interactions (predators, preys, etc.) (G. E. Hutchinson, 1957). In Vibrios, the occurrence of specific populations has been linked to temperature (Motes et al., 1998), salinity (S. C. Jiang & Fu, 2001; Motes et al., 1998) and nutrient status of water (Thompson et al., 2004). Consequently, different vibrio populations have been described to succeed each other throughout the year. In addition, populations of pathogenic bacteria can have different behaviors, from generalist (often opportunistic), to specialist strongly associated with a particular host. This is particularly true for Vibrios (Preheim et al., 2011). To better characterize ecological niche and environmental factors influencing disease development, bacteria prevalence time-series are necessary and must be supplemented by genomic data to study population genetic structure and diversity.

In this study, we took advantage of a monitoring program of mortalities in Haut-de-France to collect isolates from cockles and their environment. This monitoring was performed, cumulatively, for 2 years and allowed to better define ecological preferences of *V. aestuarianus cardii* in the studied area. Isolate genome sequencing allowed conducting a population genetic study of *V. aestuarianus cardii*. Several genomic groups with contrasting levels of virulence towards cockles were identified and genetic exchanges have been shown to potentially have favoured the differentiation of these groups and allowed virulence factors acquisition.

## Material and methods

### Field study of *V. aestuarianus cardii* prevalence in cockles, sediment and mussels

To better understand the ecological preferences of the subspecies *V. aestuarianus cardii*, we followed the dynamics of two populations, one from the Bay of Somme and one from the Bay of Authie, both located in the Hauts-de-France ten kilometres away from each other. These sites have been impacted by cockle mortalities and on one site (Bay of Somme), *V. aestuarianus cardii* has been detected since 2012. Two sites were monitored during this study (Figure 1): *i*) one in Baie of Somme (CH'4) and *ii*) one in Bay of Authie (Fort Mahon in 2019 then Groffliers in 2020 and 2021).

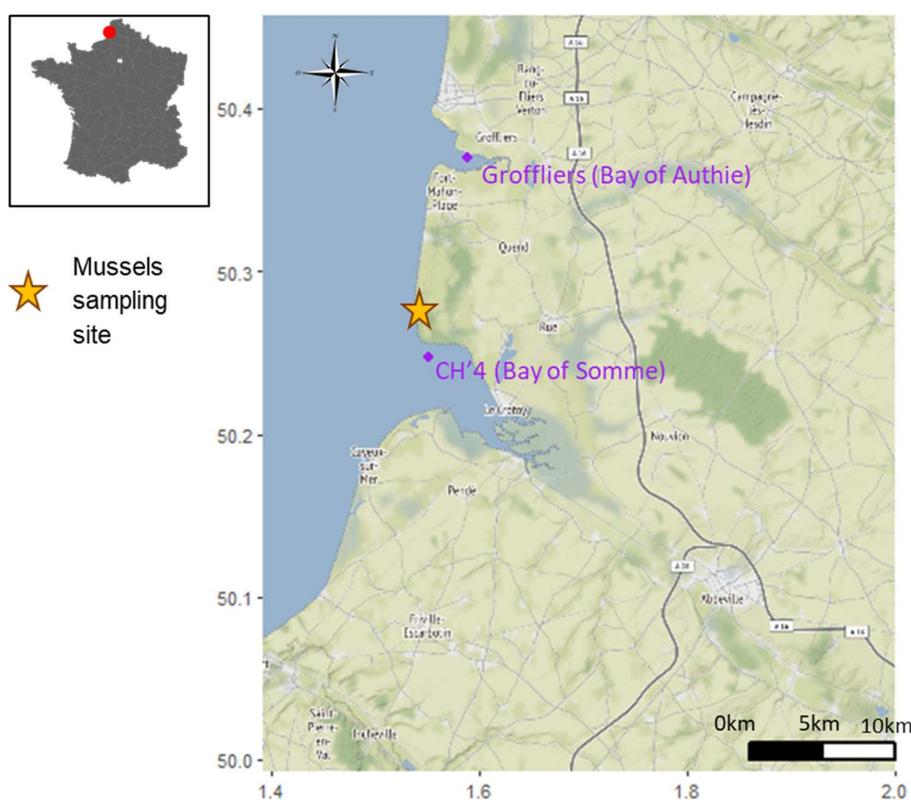
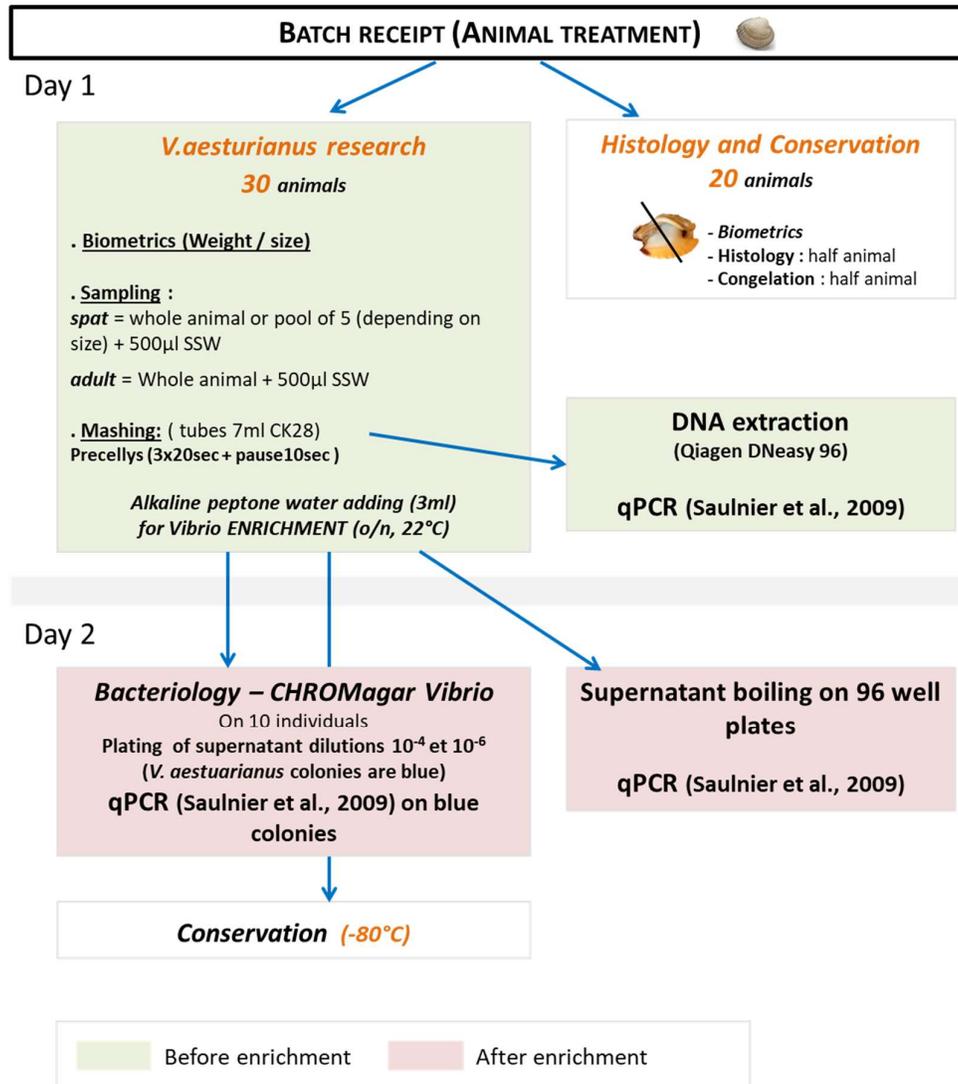


Fig. 1 : Map of the main cockle sites in the Bay of Somme and the Bay of Authie: Groffliers N:50°22'11" et E:1°35'20" ; CH'4 N:50°14'51.1" et E:1°33'05.6"

These sites were monitored in 2019 during a preliminary study and their monitoring continued in 2020 and 2021 in order to collect two years of data on these two deposits. Unfortunately, in 2020, the Fort Mahon shell deposit in the Bay of Authie disappeared due to re-silting work; this sampling point was therefore replaced by another nearby site with similar environmental conditions, the Groffliers deposit (Figure 1). Cockle samples were collected by the Hauts-de-

France CRPMEM (Regional Committee for Maritime Fisheries and Marine Farming), professionals and GEMEL (Estuarine and Coastal Environments Study Group). Sampling was conducted monthly during spring and summer 2019 and quarterly during fall and winter 2019. In 2020 and 2021, sampling was conducted monthly between August 2020 and August 2021 regardless of the sampling season. Two cohorts were systematically sampled at each site: large shells, *i.e.* greater than 27 mm length, and smaller shells, *i.e.* less than 25 mm length. A minimum of fifty cockles from each cohort were sampled for the analyses. In addition, sediments and mussels were sampled in order to determine whatever the bacterium *V. aestuarianus cardii* could also be found in these compartments. Sediment was sampled at the same site of cockles samples (bay of Somme and Authie) and mussel came from the mussel breeding located in "Pointe St-Quentin" of bay of Somme. A total of 73 batches of cockles were received, corresponding to 1824 individuals as well as 10 mussels and 18 sediment samples and all were analysed. To search for *V. aestuarianus*, three techniques were used (Figure 30) : *i*) a real-time PCR on shredded whole individuals, allowing to follow the evolution of the bacterium over time within the different beds, *ii*) a real-time PCR after enrichment of whole individual shredded material: this technique makes it possible to detect the bacterium in a "latency/dormancy" period without clinical expression in carrier individuals, *iii*) bacteriological seeding after enrichment of ground individuals on ChromAgar medium. This technique makes it possible to isolate bacterial strains and then to characterize their virulence and genetic diversity. Enrichment was performed using Alkaline Peptone Water, which allow growth and selection of *Vibrio* species. Animals were crushed in 500 µl of Sterile Seawater (SSW) in 7ml CK-28 tubes (Precellys): three series of 20s with 10s of delay between cycles. After conservation of a part of the tissues for direct DNA extraction (Qiagen DNeasy 96), 3ml of saline APW pH9 was added directly to the tube and incubated at 22°C overnight. Enrichment broths were (1) subcultured to ChromAgar that were incubated at 22°C for 18 to 20 h. Colonies resembling those of *V. aestuarianus* (turquoise blue) were picked, rechecked and identified by qPCR. (2) Enrichment broth supernatants were also boiled (100°C 5min, 4°C 5min), diluted to 1/100 and subjected to qPCR for *V. aestuarianus* detection. Finally (3) a part of the enrichment broths was conserved at -80°C (Figure 2).



**Bacteriology – CHROMagar Vibrio**  
On 10 individuals

Plating of supernatant dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$   
(*V. aesturianus* colonies are blue)

**qPCR (Saulnier et al., 2009) on blue colonies**

**Supernatant boiling on 96 well plates**

**qPCR (Saulnier et al., 2009)**

**Conservation (-80°C)**

Before enrichment
  After enrichment

Fig. 2 : Process diagram applied to cockles batches

### Isolates selection

From the 77 batches of cockles that were received from both sampling sites, *V. aesturianus cardii* could have been isolated from 51 of them and 370 isolates were obtained. Among them, 53 isolated strains were sequenced, representing 50 batches. After removal of incomplete and contaminated genomes, or those finally not attributed to *V. aesturianus*, we kept 30 genomes (Table 1) for the subsequent analysis. From the ten mussel samples received, three isolates belonging to *V. aesturianus* could have been isolated from only one batch. Two isolates got prepared for sequencing. From the 18 sediment samples received, seven isolates belonging to *V. aesturianus* could have been isolated from two batches. Two of them were prepared for sequencing. They were added to five previously sequenced and assembled *V. aesturianus cardii* genomes. The context of isolation of each strain is presented in table S1.

Tab. 1: Genome selection from strains isolated during field survey in Hauts-de-France between 2019 and 2021

	Isolated	Sequenced	Included
<b>Strains</b>			
<i>C. edule</i>	250	53 21%	30 12%
Sediment	7	2 29%	2 29%
<i>Mytilus</i> sp.	3	2 66%	2 66%
<b>Batches from which Va is originated</b>			
<i>C. edule</i>	30	30 100%	30 100%
Sediment	2	2 100%	2 100%
<i>Mytilus</i> sp.	1	1 100%	1 100%

### Sequencing, assembly and genome annotation

DNA was isolated from 35 strains using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer’s guidelines, and the concentration of each sample was adjusted to 0.2 ng/μl for library preparation using the Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit according to the manufacturer’s guidelines. For each library, paired-end reads of 150 bp were produced on the Illumina NextSeq 550 platform (Bio Environnement, Perpignan, France). The quality of the resultant fastq files was assessed using FastQC (Andrews et al., 2010). Primers, Illumina adapter sequences, low-quality bases at the 3’ end of reads with Phred-scaled quality scores less than 30 and reads with a length <50 bp were removed using Trim Galore (available at [github.com/ FelixKrueger/TrimGalore](https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore)). Quality-controlled reads were *de novo* assembled using the genome assembler SPAdes v3.13.1 (Bankevich et al., 2012) with the default kmer size and a coverage cut-off value of 20 reads.

For each assembly, coding sequences (CDSs) were predicted using PROKKA v1.12 (Seemann, 2014) with default databases and –compliant and –rfam flags and annotation of rRNAs, tRNAs and other ncRNAs enabled. Functional annotation of the detected CDSs was performed using EggNog-Mapper v2.1.0 (Huerta-Cepas et al., 2016, 2017). The annotated genomes were then processed with Roary v3.13, using the options “-e -n -i 95 -cd 100” params to perform a pangenome analysis and identify the set of core genes (Page et al., 2015). Assembly features and GenBank accession numbers are summarized in table S2.

## Phylogeny and recombination analysis

Pairwise ANIs (%) between pairs of genomes were calculated using FastANI (Jain et al., 2018). We performed a core-genome alignment of the contigs using ParSNP v13/02/201 (Treangen et al., 2014).

This alignment was used to perform a cluster analysis of samples by genetic distance *via* Ward-linkage (hclust, method = "ward.D") with the R package *stat* (Murtagh & Legendre, 2014). Pairwise genetic distances between samples were calculated using GENPOFAD distance (dist.snp, model = "GENPOFAD") with the R package *pofadinr* (Joly et al., 2015). GENPOFAD distance can be defined as one minus the ratio of the number of nucleotides shared between two samples divided by the maximum number of nucleotides observed in either individual at a given sequence site. A phylogenetic network was computed using the neighborNet command from the R package *phangorn* (Schliep, 2011).

The core-genome alignment was also used to infer a maximum likelihood phylogeny using RAxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014) with the TVM model of nucleotide substitution (transversion model, AG=CT and unequal base frequencies), as determined using jModelTest based on Akaike Information Criterion (AIC) (Posada, 2008) and 100 bootstrap replicates were performed for robustness assessment. To single nucleotide polymorphisms (SNPs), the haploid variant calling pipeline snippy v4.6 (available at <https://github.com/tseemann/snippy>) was used with default parameters. Recombination was evaluated across this genome alignment using ClonalFrameML v1.12 (Didelot & Wilson, 2015); we used an extension that allows different recombination parameters to be inferred on different branches of the clonal genealogy.

## Positive selection signatures

In order to detect SNPs that may explain *V. aestuarianus cardii* population structure, we performed a genome scan analysis using the *pcadapt* package v.4.3.3 for R (Luu et al., 2017) that detects structure and clustering of individuals in a population. Number of principal components was set to six, based on scree.plot analysis (Figure S5). We used LD.clumping option, with window size of 5 kb. LD.clumping uses p-values to sort SNPs by relevance (*i.e.* keeping the most significant ones). It takes the first one (*i.e.* the most significant SNP) and removes SNPs that are highly correlated with this one in a window around it. We also removed SNP with minor allele frequency under 0.05. After computing the test statistic, a Bonferroni adjustment was used to correct for multiple comparisons, and a threshold of 0.001 was applied to identify outliers SNPs.

## **Bacterial virulence estimation by injection**

Pathogenicity of 69 *Vibrio aestuarianus cardii* isolates on reared cockles was investigated by experimental injections, which also included *Vibrio aestuarianus* oyster strain 02/041, pathogenic for oysters (negative control) and *Vibrio aestuarianus* cockle strain 12/122 3T3 pathogenic for cockles (positive control). Cockles were induced to spawn in February 2021 at the Ifremer hatchery in La Tremblade and larvae were grown according to standard protocols used for *C. gigas*, except that seawater temperature was maintained at 20°C for cockle larvae. Settlement took place from 11 to 16 days post fertilization. All progenies were maintained under controlled environmental conditions in our facilities using unheated UV treated (40 mj/cm<sup>2</sup>) seawater in a flow-through system. All animals were fed *ad libitum*. Following an initial screening of 30 of these animals (no detection of *Vibrio aestuarianus* and no detection of any other pathogens by histology) for each experiment and in the absence of mortality over the rearing period, we chose to use this biological material for the controlled infections. Experiments were conducted in July and November 2021 and May 2022 when cockles weighed 0.75 g and measured 12.92 mm.

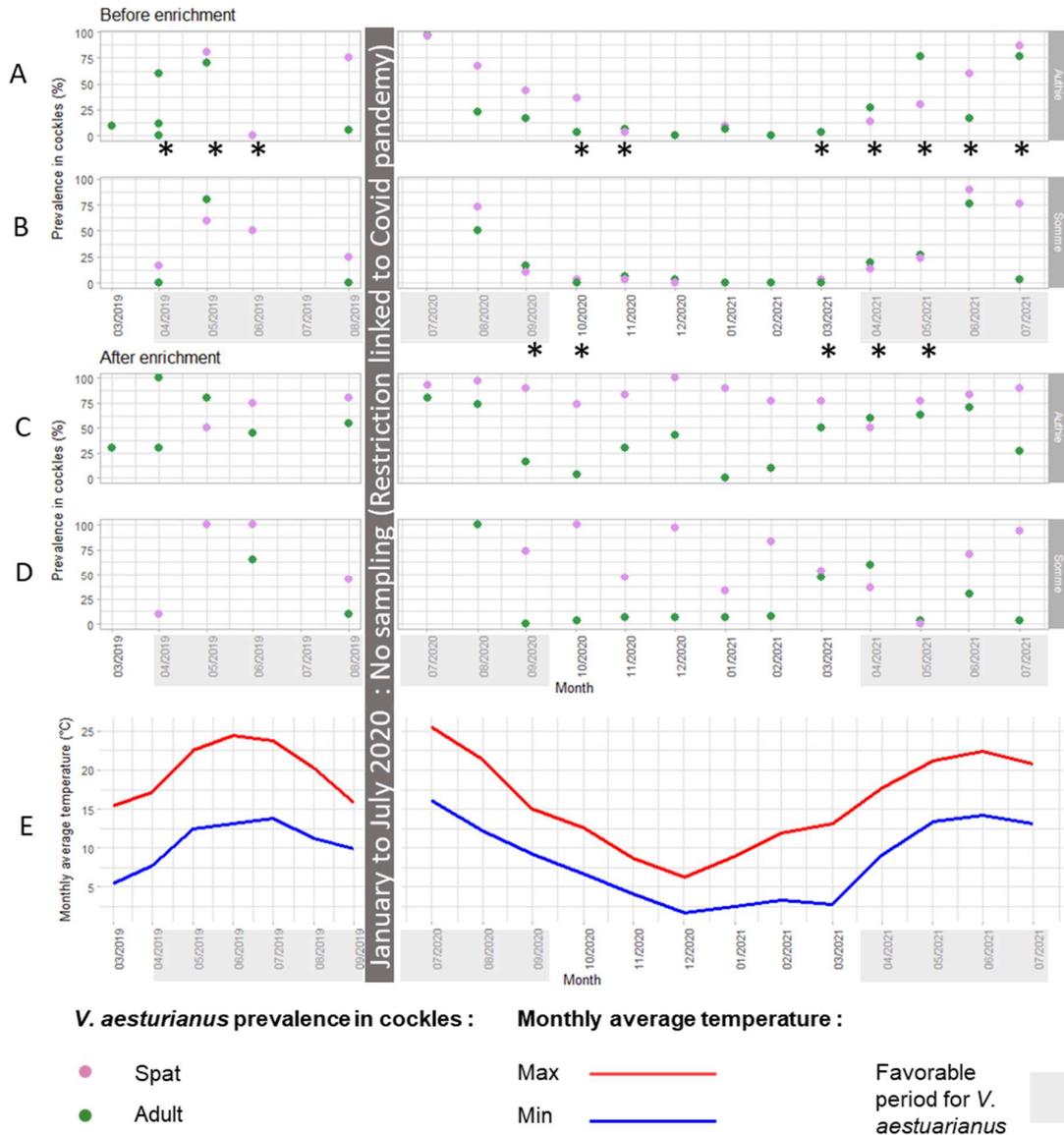
Bacteria were grown with constant agitation at 22°C for 24 h in Zobell medium. Cultures were washed by centrifugation (10 min, 1500 g) and resuspended in artificial, sterile seawater to obtain OD<sub>600nm</sub> = 0.1. Fifty microliters of bacterial suspensions (10<sup>7</sup> cfu, checked by plating on Zobell agar) were injected in the posterior adductor muscle into anesthetized cockles. After injection, cockles were transferred to aquaria (10 cockles per 2.5 L aquarium, duplicate aquaria per bacterial strain) containing 2 L of aerated, UV-treated seawater at 22°C and kept under static conditions for 5 days. During this period, cockle mortalities were followed and recorded twice a day.

## **Results**

### **Cockles spat could be reservoir of *V. aestuarianus cardii* in Hauts-de-France**

To better characterize ecological preferences of *V. aestuarianus cardii*, field study allowed collecting 1824 cockles, 17 sediment samples and 10 mussel samples. It appears that the favourable period for *V. aestuarianus cardii* extends between April and September. During this period, bacteria can be detected in cockles tissues of spat and adults using real time PCR without enrichment, suggesting that they are present in high concentrations (Figure 3). They can also be found in sediment samples using real-time PCR after enrichment and in mussels using culture technique (table S3), but not using real-time PCR without enrichment, suggesting that they are present at low concentrations in these compartments. Outside this period, *V.*

*aestuarianus cardii* was mainly detected in spat batches, using real-time PCR after enrichment, and was never detected in sediment and mussels samples, whatever the technic used. These results suggest that the bacterium remains alive but in latent or dormant state, principally in cockle spat during winter.



**Fig. 3 : Cockle spats could be reservoir of *V. aestuarianus cardii* in Hauts-de-France.** *V. aestuarianus* prevalence was evaluated on batches of 30 cockles. Prevalence in spat batches is represented by pink points, prevalence in adult batches is represented by green points. Bacteria presence in individuals from the batches was determined before bacteria enrichment, in Bay of Authie (A) and Bay of Somme (B) and after (plots C and D). Monthly average air temperatures were collected from meteociel.fr, on Abbeville station (in Somme department) (plot E). Absence of data in 2020 is linked to French restrictions linked to Covid pandemy.

One of the factors governing the bacteria prevalence in cockles could be the increase in temperature as suggested by the positive correlation between temperature and prevalence in cockles adult and spat (linear regression :  $R^2$  between 0.32 and 0.63) (Figure S1).

### ***V. aestuarianus cardii* encompasses several genogroups that can coexist**

In order to study parental relationship between oyster pathogenic lineages and cockle pathogenic lineages at the whole genome level, we performed core genome alignment using cockle isolates (n=34 sampled during the field survey + 6 isolated in other regions/countries and shared by collaborators), oyster isolates (n=7) and non-clinical isolates (n=6) whole genome assemblies. *V. aestuarianus* belongs to *V. anguillarum* clade so we used *V. anguillarum* strain 775 as an outgroup, to root the tree. Phylogenetic analysis confirmed the non-random phylogenetic distribution of the two clinical phenotypes, *i.e.* oyster clinical isolates and cockle clinical isolates that emerged from different sibling ancestors (Figure S2).

To reconstruct the overall population structure of *V. aestuarianus cardii*, we assessed the genetic diversity at the whole genome level. We aligned the 40 genome sequences with the type strain (03/008T) genome and detected a total of 146,942 SNPs. Relationships between isolates were studied by building a maximum likelihood phylogeny (Figure 4). Globally, genomes were close to each other in the tree and showed highly similar nucleotide compositions, as indicated by average nucleotide identities (ANIs) higher than 97.0 % for all pairwise comparisons (Table S4). According to Ward clustering (Figure S3), we could differentiate three monophyletic groups (Figure 4): group A composed of nine strains, group B including 20 strains and group C with 12 strains. In groups A and B, ANI were higher than 98% (minimum ANI in group A: 98.7% and B: 98.4%). In group C, diversity is slightly higher with a minimum ANI of 97%. On the phylogenetic tree, group C is paraphyletic. Indeed, a divergence appears at the node corresponding to the common ancestor of the subspecies between the first part of group C and the other strains of the subspecies. Among these, a new divergence takes place between the second part of group C and the other strains.

As indicated in Figure 3, all group A strains were isolated in Hauts-de-France between 2012 and 2021, from cockle and mussel tissues. Group B contains strains from more diverse geographical origin including Normandy (15/061 1T1), Italy (151-ITT-15-cp1, isolated from clam *Ruditapes philippinarum*), Brittany (15/064 4T2), all isolated in 2015 and in Hauts-de-France in 2020 and 2021 from cockles and mussel. Finally, group C contains isolates from Hauts-de-France between 2019 and 2021, from cockle tissues and sediment. It also includes one strain isolated in Ireland in 2009 (MI-24-09) from oyster tissues (Table S1).

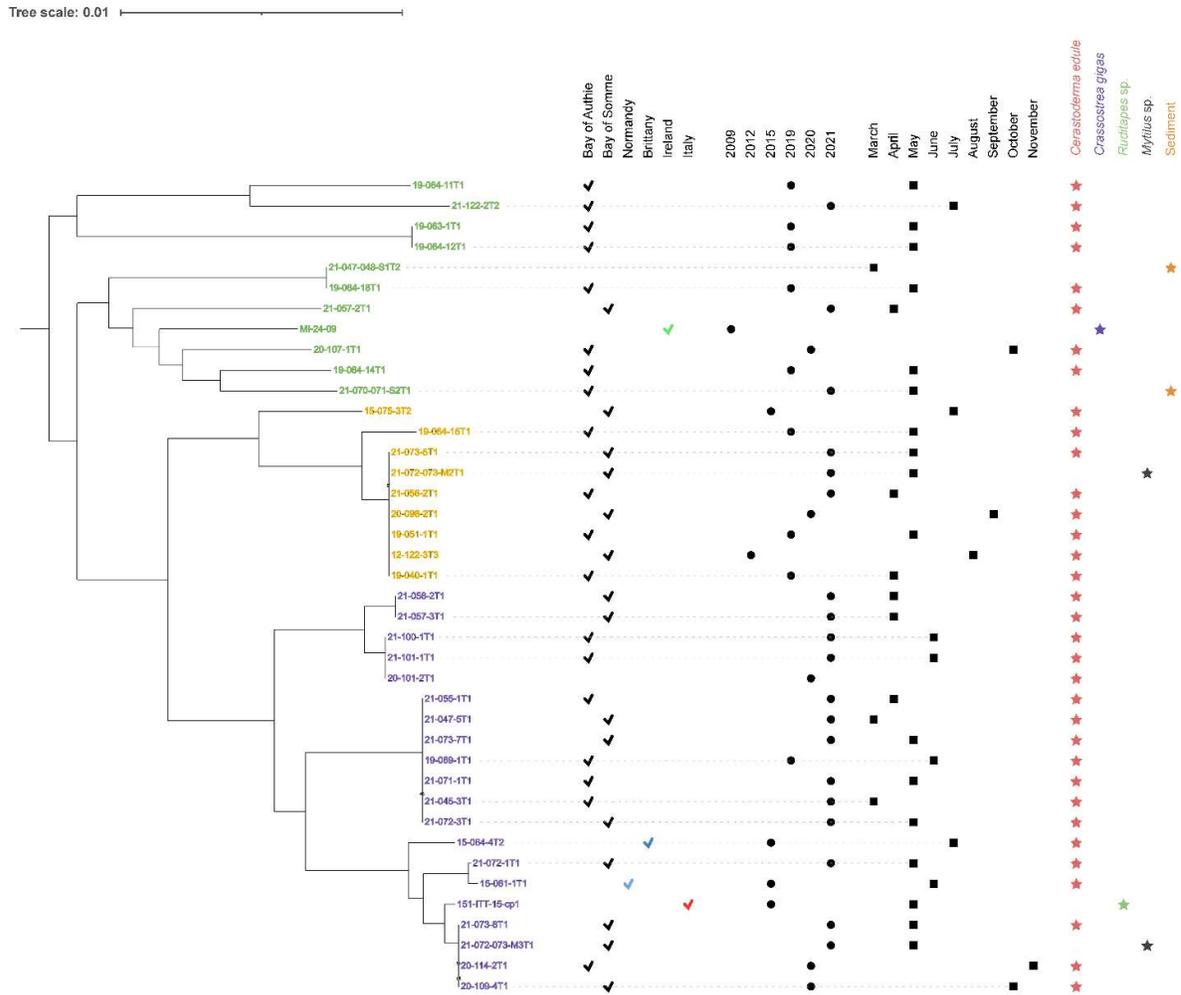


Fig. 4 : Phylogenetic tree of *V. aestuarianus cardii* calculated with RAxML using a TVM substitution model and rooted with the midpoint rooting option from whole-genome alignments. Several layers of annotations are added: geographical origin (check mark), year of isolation (point) and environmental origin (star). *V. aestuarianus cardii* groups A to C, determined using Ward clustering, are colored in yellow, blue and green, respectively and were delaminated according to a Ward clustering. White stars indicate strains isolated on Bay of Somme in May 2021.

Several isolates sampled during May 2021 in Bay of Somme (indicated with white stars on Figure 4), from spat cockles (isolates names beginning with 21-072), adult cockles (names beginning with 21-073) or mussels (names beginning with 21-072-073) belong to different groups. 21-073-5T1 and 21-072-073-M2T1 belong to group A. 21-072-3T1, 21-073-7T1, 21-072-073-M3T1, 21-073-8T1 and 21-072-1T1 belong to group B. This observation suggests that important diversity is maintained and that multiple genogroups can coexist on the same place at the same time.

All these observations suggest the absence of geographical structuration of *V. aestuarianus cardii*, as well as the coexistence of the three genogroups in Hauts-de-France cockle beds.

## ***V. aestuarianus cardii* population is structured according to virulence toward cockles**

The *V. aestuarianus cardii* populations are structured according to virulence toward cockles. Groups A and B include cockles high-virulence isolates (HV), causing more than 50% mortality during cockle infections in the laboratory by injection in muscles ( $10^5$  CFU / animal). Group C contains significantly lower-virulent isolates (LV) (p-value < 0.001) (Figure 5). Two exceptions have to be noted though: 19-064-14T1 belonging to group C, showing high virulence phenotype and 21-045-3T1, belonging to group B, showing low virulence phenotype.

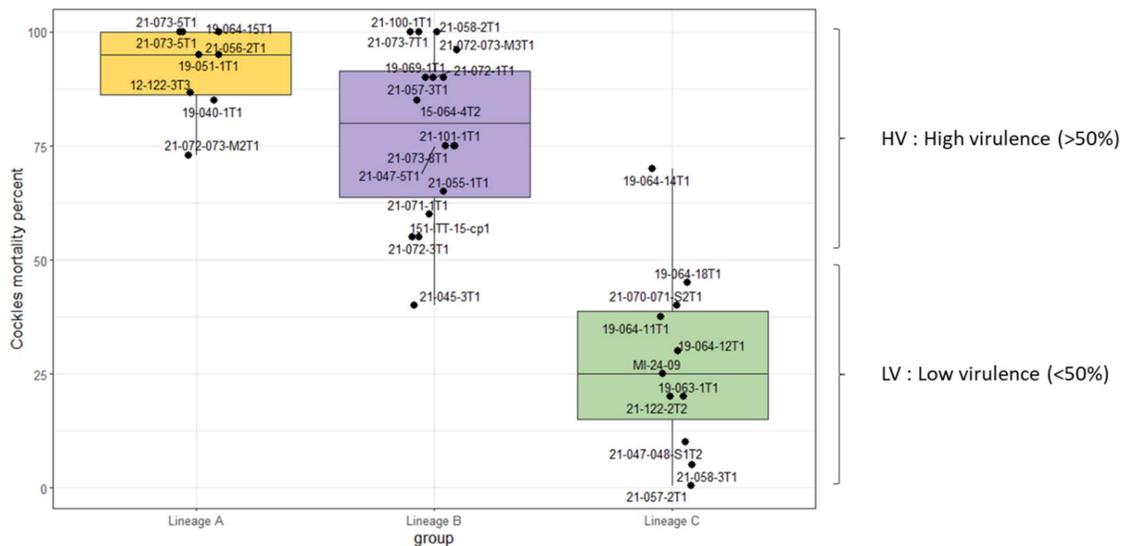


Fig. 5: Percentages of cockle mortalities after *V. aestuarianus cardii* strains injection assays in laboratory ( $10^5$  CFU/animal). Wilcoxon-Mann-Witney tests were used to determine if virulence of the three datasets were significantly different from each other. Lineages A to C are highlighted respectively in yellow, blue, and green.

LV and HV strains were isolated throughout the year (from March to November, Table S1) from cockle's tissues. In conclusion, the three identified genogroups differed by their toxicity toward cockles, but may have the same population dynamics whatever their virulence level. Strains isolated from mussels (21/072-073-M3T1 and 21/072-073 M2T1) belong to HV groups whereas strains isolated from sediment belong to LV group (21/070-071 S2T1 and 21/047-048 S1T2).

## **Homologous recombination strongly impacts *V. aestuarianus cardii* evolution**

We further examined the evolutionary processes of the *V. aestuarianus cardii* subspecies by looking for signals of homologous recombination. Homologous recombination in genomes can generate phylogenetic inconsistencies between taxa that can be visible on a phylogenetic network by the presence of alternative pathways. The one we have constructed from the whole

genome alignment confirms that recombination affects *V. aestuarianus cardii* isolates relationship, with alternative pathways between these taxa (Figure S4).

To quantify homologous recombination at the subspecies and genogroups scales, we used ClonalFrameML (Didelot & Wilson, 2015). By this method, only 975 375 bp were remaining after removing the predicted recombinant sites from the original 2 833 354 bp alignment, suggesting that approximately 66% of the sites may have undergone recombination at some point. However, results indicated that the impact of recombination ( $r$ ) on the genome wide substitution rate is more than half of the impact of substitution in HV in all groups (Table 2). This result suggest that *V. aestuarianus cardii* groups exchange genetic material with other microbial populations.

Tab. 2: Mean  $r/m$  ratios calculated using ClonalFrameML (Didelot & Wilson, 2015) on each genogroup

<b>Genogroup</b>	<b>Mean <math>r/m</math></b>	<b>sd</b>
<i>V. aestuarianus cardii</i>	0.76	0.43
Group A	0.63	0.30
Group B	0.54	0.16
Group C	0.69	0.27

To study the impact of homologous recombination on the genetic structure of the *Cardii* subspecies, we compared phylogenies constructed from the alignment of the whole core genome with the one purged from genomic region potentially impacted by recombination. The removal of the recombinant regions disturbs the relationships within the group C (which contain low-virulence strains). Indeed, while this group is paraphyletic in a phylogeny constructed from complete data (Figure 6, A), it is monophyletic when recombinant regions are filtered (Figure 6, B). The fact that recombination increases the distance between the two parts of group C suggests that they have access to different pools of genetic material.

In the HV strains, we observe a homogenizing effect of recombination between groups A and B. Indeed, genetic distance appears less important between the two groups with recombination. We also observe this homogenizing effect inside the groups, with lower distances between strains inside groups when we consider recombination. This result suggest that recombination takes place between groups.

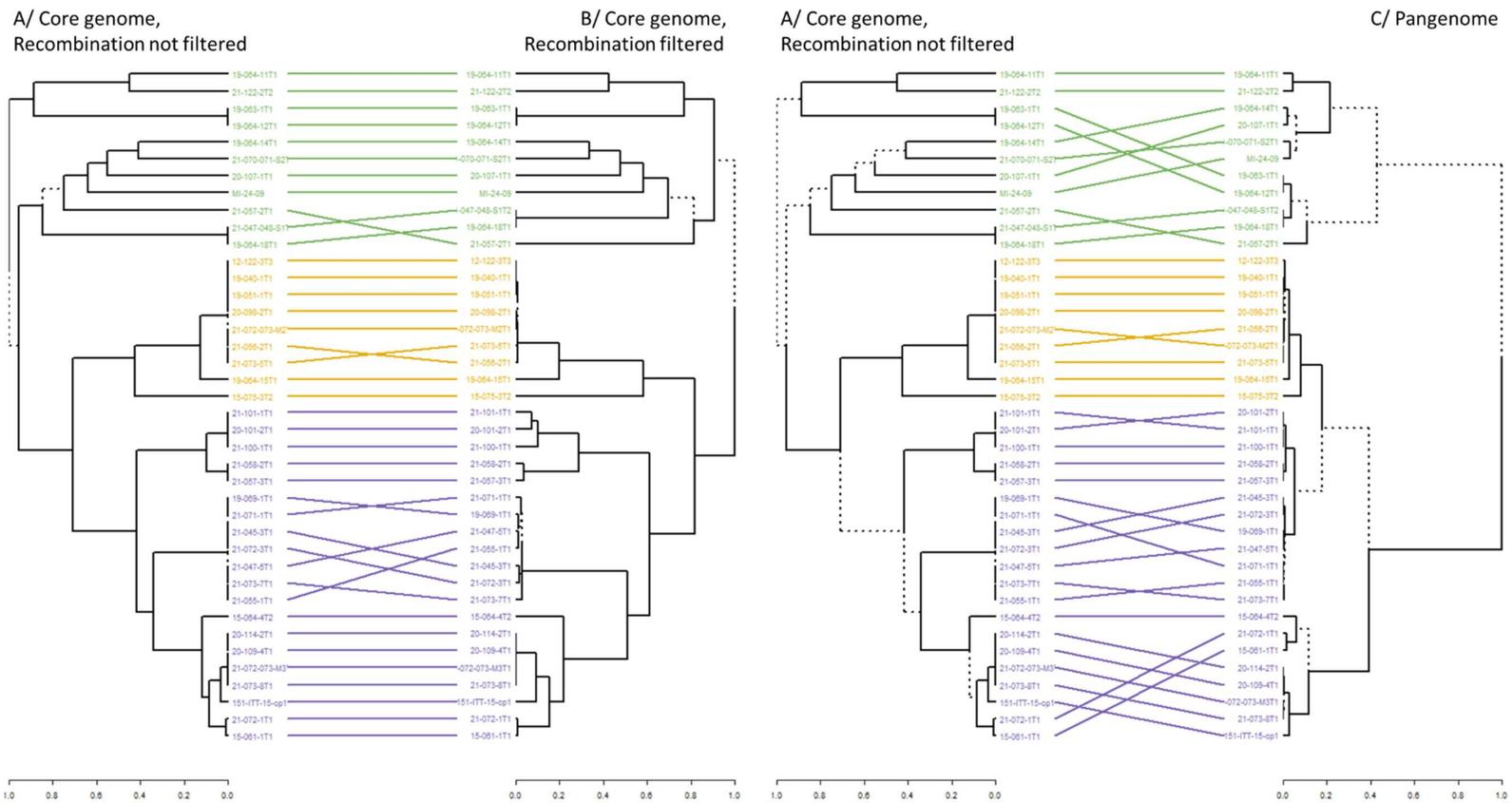
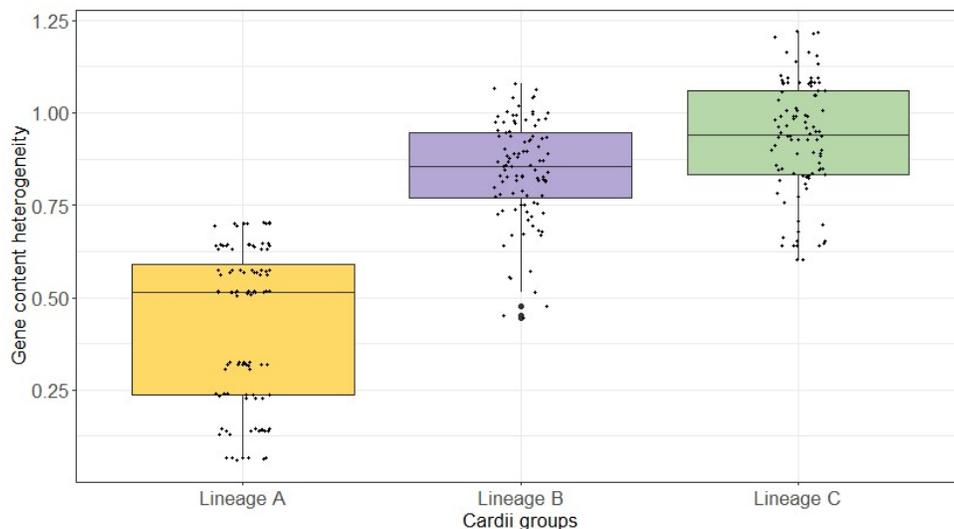


Fig. 6: Tanglegram depicting the relationship between the predicted evolutionary histories of *V. aestuarianus cardii*. Left plot: Core genome phylogenies, with recombination (length : 2 833 354 bp) versus core genome phylogeny without regions detected to be impacted by recombination (975 375 bp). Right plot: Core genome phylogenies, with recombination versus Hierarchical clustering of the pangenome presence/absence matrix. Correspondences were used to designate clade groups, which are linked in the tanglegram using individual colours per clade. Trees A and B were constructed with a TVM substitution model and maximum likelihood algorithm. The trees were midpoint rooted. Genogroups A to C are highlighted respectively in yellow, blue and green. "Unique" nodes, with a combination of labels not present in the other tree, are highlighted with dashed lines.

## ***V. aestuarianus cardii* groups have open pan-genomes**

To assess overall gene content diversity, we conducted a pan-genome analysis using Roary (Page et al., 2015), and estimated a core genome size of 2355 genes and a pangenome size of 11 661 genes. We calculated gene content heterogeneity in each group. The heterogeneity is calculated as the inverse of the ratio between intersection and union genes, minus 1, as defined in (Pedersen, 2017). Intersection genes are common to all samples in the genome set. Union genes are present in at least one genome of the set. The more genes the genomes share, the higher the ratio, the lower the heterogeneity. A value of 0 means that all genes are shared by all strains, and a value of 1 means that half of genes in the pool is shared by every strain.

In order to reduce sampling size bias into the calculation of heterogeneity, we calculated it for 100 random subsamples of 5 genomes per group. The results obtained for the 100 sub-samplings show that heterogeneity is significantly less important in pathogenic group A (average heterogeneity = 0.42 +/- 0.20) than in pathogenic group B (0.84 +/- 0.14) and non-pathogenic group C (0.93 +/- 0.15) (student test, p-value < 10<sup>-5</sup>) (Figure 7). Heterogeneity is higher in the group B than in the group A, probably because several subgroups are appearing in this group. Indeed, a phylogeny based on genes heterogeneity, splits group B into two subgroups, one of which becoming closer to group A (Figure 6, C).



*Fig. 7: Calculated heterogeneity in V. aestuarianus cardii groups on one hundred subsamples of 5 genomes. Genogroups A to C are highlighted respectively in yellow, blue and green.*

## Cockles pathogenic strains share virulence genes repertoires

Pangenome study allowed identifying groups conserved and specific genes. Specific group genes set sizes range from 2 in LV group C to 55 in HV group A. 53 genes are common and specific to all HV strains. Among them are gene encoding a complete type 6 secretion system potentially involved in interspecific competition (MacIntyre et al., 2010). Furthermore, in this gene set, are genes encoding complete type 1 secretion system (T1SS: *macAB/tolC*) involved in virulence (Fuche et al., 2015; Navarro-Garcia et al., 2019), genes encoding transcriptional regulators involved in metabolism (*cdhR*, *csgD* and *sgrR* : for a complete list of these genes see Table S5). Therefore, these results suggest that the common ancestor of HV groups A and B acquired T1SS and T6SS encoding genes, favouring the HV lineages emergence.

## Positive selection signatures in pathogenic groups

To investigate the evolutionary changes that led to the divergence of cockle virulent isolates in *V. aestuarianus cardii*, we performed a genome scan analysis using *pcadapt* that detect structure and clustering of individuals in a population. Number of principal components was set to eight based on *scree.plot* (Figure S5A). Based on principal component analysis, principal component 1 (PC1) segregated the HV groups (groups A and B) from the LV group (group C) in strain collection (Figure S5B).

Finally, we kept outliers that are more correlated to PC1 than other principal components. 126 outliers SNPs were associated with PC1 including 19 non-synonymous SNPs potentially involved in diversifying selection. These SNPs are listed in table S6 and notably include the two members of the two-component system *cpxA/cpxR* which is known to be involved in regulation of expression of the porins *ompF* and *ompC* in *Escherichia coli* (Batchelor et al., 2005), and in colonization ability and virulence of uropathogenic *E. coli* (Debnath et al., 2013).

## Discussion

In this study, ecological preferences of *V. aestuarianus cardii* were investigated through a field study of prevalence of the bacteria conducted in cockle beds in Hauts-de-France between 2019 and 2021. Our study revealed that *V. aestuarianus cardii* is present in cockle spats, one of its probable reservoirs, throughout the year, within which the bacterial load increases sharply from April to August. At this time, corresponding to the spawning period for adult cockles (Malham et al., 2012), the bacteria is also present in cockle adults, sediment, where the bacterium might be able to maintain itself. Thus, the presence of *V. aestuarianus cardii* in the sediment could be

explained by the fact that the infected cockles reject the bacterium in the environment and that it is thus found in the sediment. The presence of *V. aestuarianus cardii* in mussels could be due to an accumulation by filtration of the bacterium by the mussels due to its significant presence in the environment. Indeed, *V. aestuarianus cardii* proliferation in cockles tissues is observed during this period, and could lead to cockles mortalities. The presence in adult cockles could be favoured by their reproductive status. Susceptibility to infectious diseases has already been linked to physiological status of bivalves. For example, negative correlation between reproductive effort and oysters resistance to summer mortality has been observed (Huvet et al., 2010). These assumptions should be tested in other populations of *V. aestuarianus cardii* impacting Breton or Norman cockles for example. Mortality episodes do not occur every summer, suggesting that other factors influence the development of the disease, and still remain to be identified.

Although strains isolated over a decade were included in our dataset, the sampling time range is not sufficient enough to get strong temporal signal and date the emergence of this subspecies (data not shown) (Drummond et al., 2003). However, our sampling enabled describe *V. aestuarianus cardii* genomic structuring in function of their virulence phenotype in cockles. Thus, we could differentiate highly virulent (HV) strains and low virulent (LV) strains. A second level of structuring appears inside the HV strains with two different groups, A and B. The evolutionary trajectory of the different lineages is impacted by recombination and genetic exchange. Group B appears to have a more complex evolutionary history than group A. Indeed, the phylogeny based on gene content splits this group into two. Part of this group has a gene content closer to that of group A strains. One hypothesis could be that this subgroup shares at least partially a niche with group A. Furthermore, we observed that the two HV groups (A and B) coexist at a sampling point (a site in the Bay of Somme in May 2021). Additionally, we observe a homogenizing effect of recombination between groups A and B. All these results suggest that genetic exchanges take place between groups A and B, involving that they share, at least partially the same niche.

Finally, the data collected allow us to formulate a population dynamics hypothesis summarized in Figure 8. The bacterium, regardless of its genogroup, is maintained in the cockle spats throughout the year. Then, depending on factors, including temperature, it multiplies between April and August. During this period, it is found in adult cockles, and in the environment. Data suggest little exchange between the different groups, whose microhabitats remain to be delimited. The role of low-virulence group C in cockles mortality events in Bay of Somme remains to be elucidated.

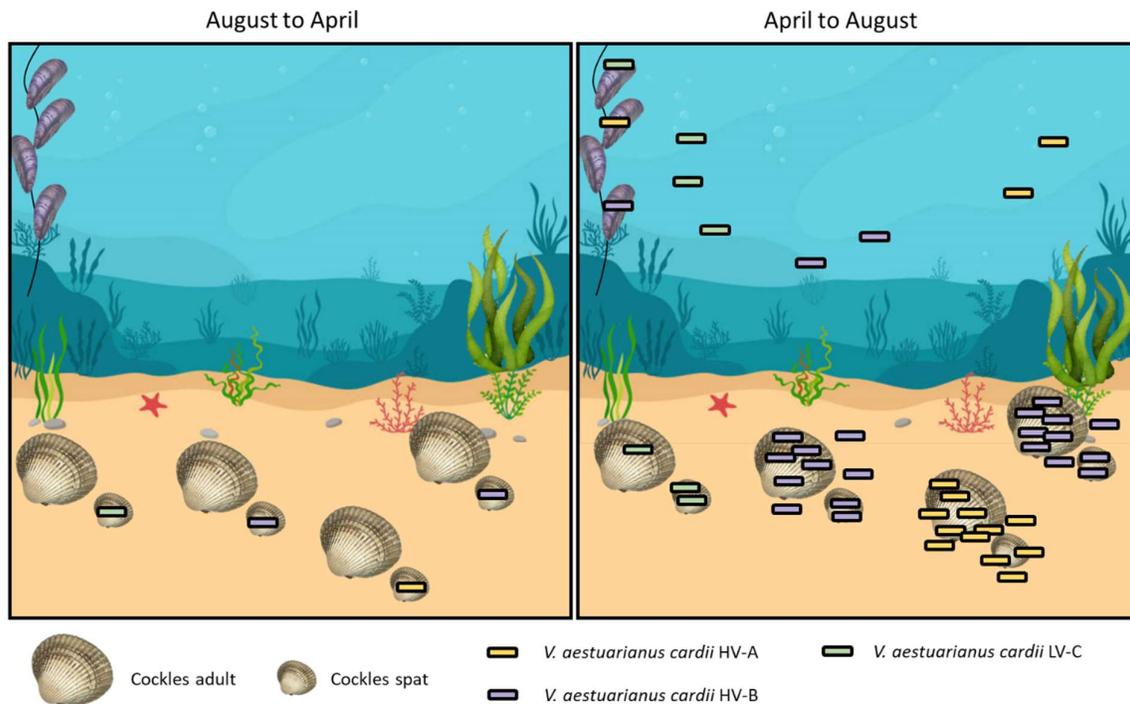


Fig. 8: *V. aestuarianus cardii* population dynamics hypothesis. Genogroups A, B and C are highlighted in yellow, blue and green respectively.

Unlike the subspecies *V. aestuarianus francensis*, which shows characteristics of a specialist pathogen (Mesnil et al., in prep), field study suggests that strains of the subspecies *cardii* could be able to survive in the environment during summer. This might give them the opportunity to recombine with other bacterial populations, which generates diversity of sequences and gene content in these groups. This suggests that the *Cardii* subspecies has a more generalist lifestyle.

The existence of lineages presenting contrasting virulence allow detecting genes involved in virulence that could be specific of HV groups. Two operons encoding secretion systems (T1SS and T6SS), potentially involved in interspecific competition (MacIntyre et al., 2010) and virulence (Fuche et al., 2015; Navarro-Garcia et al., 2019) are present in HV groups. These genes could have been acquired from the environmental gene pool, conferring toxicity toward cockles to these groups. However, T1SS/T6SS direct implication in *V. aestuarianus cardii* virulence has to be demonstrated.

Considering that *V. aestuarianus cardii* seems to be able to survive for a time in the environment, there is a risk of introduction into "unscathed" areas linked to the transfer of other animals, equipment or by hydrodynamic currents. Furthermore, considering the geographical area of *C. edule*, our study leads us to consider the risk of expansion of this disease. Moreover, the frequent recombinations suggest a risk of emergence of new pathogenic lineages. Additionally, increasing

temperatures could extend the period during which the bacteria can multiply (Harvell, 2002), leading to a stronger impact of mortality. This could also push back the northern limit of its distribution. Macro-ecological studies on the impact of climate change on persistence and spread of *V. aestuarianus cardii* in the aquatic environment, combined with studies on host susceptibility and exposure, are needed to better understand the risks for *C. edule*, linked to *V. aestuarianus cardii*.

## Données supplémentaires

Les figures supplémentaires sont disponibles en annexe 3 de ce manuscrit.

Les tableaux supplémentaires sont disponibles dans un document en ligne, à l'adresse suivante :

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1RfeS0O8VsNAO5R025ZcvpQz4H5JH4rnFleM7TcyqyMg/edit?usp=sharing>

## Bibliographic references

- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2010). FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes : A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bao, Y.-J., Shapiro, B. J., Lee, S. W., Ploplis, V. A., & Castellino, F. J. (2016). Phenotypic differentiation of *Streptococcus pyogenes* populations is induced by recombination-driven gene-specific sweeps. *Scientific Reports*, 6(1), 36644. <https://doi.org/10.1038/srep36644>
- Batchelor, E., Walther, D., Kenney, L. J., & Goulian, M. (2005). The *Escherichia coli* CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5723-5731. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5723-5731.2005>
- Bellamy, E., Lefebvre, A., Mahe, K., & de Rafelis, M. (2009). Croissance de la coque (*Cerastoderma edule*) en baie de Somme : Morphométrie et Marquage.
- Coffin, M. R. S., Clements, J. C., Comeau, L. A., Guyondet, T., Maillet, M., Steeves, L., Winterburn, K., Babarro, J. M. F., Mallet, M. A., Haché, R., Poirier, L. A., Deb, S., & Filgueira, R. (2021). The killer within: Endogenous bacteria accelerate oyster mortality during sustained anoxia. *Limnology and Oceanography*, 66(7), 2885-2900. <https://doi.org/10.1002/lno.11798>

- Debnath, I., Norton, J. P., Barber, A. E., Ott, E. M., Dhakal, B. K., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2013). The Cpx Stress Response System Potentiates the Fitness and Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(5), 1450-1459. <https://doi.org/10.1128/IAI.01213-12>
- Deschamps, G. (2016). La pêche à pied : Histoire et techniques. *La pêche à pied*, 1-232.
- Desprez, M., Rybarczyk, H., Wilson, J. G., Ducrotoy, J. P., Sueur, F., Olivesi, R., & Elkaim, B. (1992). Biological impact of eutrophication in the bay of somme and the induction and impact of anoxia. *Netherlands Journal of Sea Research*, 30, 149-159. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(92\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0077-7579(92)90054-1)
- Didelot, X., & Maiden, M. C. J. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 18(7), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.04.002>
- Didelot, X., & Wilson, D. J. (2015). ClonalFrameML : Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes. *PLOS Computational Biology*, 11(2), e1004041. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004041>
- Drummond, A. J., Pybus, O. G., Rambaut, A., Forsberg, R., & Rodrigo, A. G. (2003). Measurably evolving populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9), 481-488. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00216-7)
- Ducrotoy, J., Rybarczyk, H., Souprayen, J., Bachelet, G., Beukema, J., Desprez, M., Dörjes, J., Essink, K., Guillou, J., & Michaelis, H. (1991). A comparison of the population dynamics of the cockle (*Cerastoderma edule*, L.) in north-western Europe. *Estuaries and coasts: spatial and temporal intercomparisons*, 173-184.
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., & Gilbert, C. (2015). Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *Journal of bacteriology*, 197(3), 563-571.
- Garcia, C., Mesnil, A., Tourbiez, D., Moussa, M., Dubreuil, C., Gonçalves de Sa, A., Chollet, B., Godfrin, Y., Dégremont, L., Serpin, D., & Travers, M.-A. (2021). *Vibrio aestuarianus* subsp. *Cardii* subsp. Nov., pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *Aestuarianus* subsp. Nov. And *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis* subsp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(2). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004654>
- Garnier, M., Labreuche, Y., & Nicolas, J.-L. (2008). Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis* subsp. Nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>
- Goudenège, D., Travers, M. A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., Tourbiez, D., Mangenot, S., Calteau, A., Mazel, D., Nicolas, J. L., Jacq, A., & Le roux, F. (2015). A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters : Comparative genomics of *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4189-4199. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12699>
- Harvell, C. D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296(5576), 2158-2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by

- eggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115-2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2016). eggNOG 4.5: A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D286-D293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22(0), 415-427. <https://doi.org/10.1101/SQB.1957.022.01.039>
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., & Boudry, P. (2010). Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture*, 304(1-4), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.022>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Joly, S., Bryant, D., & Lockhart, P. J. (2015). Flexible methods for estimating genetic distances from single nucleotide polymorphisms. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 938-948. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12343>
- Le Roux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., Ritchie, J. M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C. C., Strauch, E., Kirschner, A., & Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: Ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>
- Legué, P., & Prou, J. (2012). L'huître, un coquillage nomade sans tête ni jambe mais avec un pied. *Techniques & culture*, 59, 284-305. <https://doi.org/10.4000/tc.6717>
- Longshaw, M., & Malham, S. K. (2013). A review of the infectious agents, parasites, pathogens and commensals of European cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(1), 227-247. <https://doi.org/10.1017/S0025315412000537>
- López-Pérez, M., Jayakumar, J. M., Haro-Moreno, J. M., Zaragoza-Solas, A., Reddi, G., Rodriguez-Valera, F., Shapiro, O. H., Alam, M., & Almagro-Moreno, S. (2019). Evolutionary Model of Cluster Divergence of the Emergent Marine Pathogen *Vibrio vulnificus*: From Genotype to Ecotype. *MBio*, 10(1), e02852-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02852-18>
- Luu, K., Bazin, E., & Blum, M. G. B. (2017). pcadapt: An R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 67-77. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>
- MacIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M., & Pukatzki, S. (2010). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19520-19524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012931107>
- Malham, S. K., Hutchinson, T. H., & Longshaw, M. (2012). A review of the biology of European cockles (*Cerastoderma* spp.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(7), 1563-1577. <https://doi.org/10.1017/S0025315412000355>

- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method : Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31(3), 274-295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., & Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli*: Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary : Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Pedersen, T. L. (2017). Hierarchical Sets : Analyzing Pangenome Structure through Scalable Set Visualizations. *Bioinformatics*, btx034. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx034>
- Pernet, F., Lupo, C., Bacher, C., & Whittington, R. J. (2016). Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1689), 20150213. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0213>
- Posada, D. (2008). jModelTest : Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn : Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592-593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Seemann, T. (2014). Prokka : Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8 : A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. 15.

## Chapitre 4 : Interactions cellulaires entre *V. aestuarianus* et les hémocytes d'huîtres creuse *C. gigas*

### Résumé du chapitre

Chez les invertébrés, les hémocytes sont des cellules de la défense immunitaire, qui circulent dans l'hémolymphe et sont recrutées en cas d'infection ou de blessure de l'animal au niveau des tissus lésés et/ou infectés. Afin d'étudier l'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes d'huîtres creuses, Labreuche et ses collaborateurs ont choisi la souche 01/032, qui appartient à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Leurs observations ont suggéré que 01/032 échappait à la phagocytose des hémocytes et en plus, induisait la production de ROS par ces cellules, provoquant leur propre cytotoxicité, grâce à un facteur de virulence, la métalloprotéase Vam. Cependant, 01/032 n'est pas capable de coloniser l'huître et d'induire des mortalités lorsqu'elle est transmise par des protocoles « écologiquement réalistes » suggérant qu'elle ne possède pas l'ensemble du répertoire de virulence de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Afin d'étudier le rôle de l'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes dans la virulence des souches, nous avons voulu observer la réponse des hémocytes d'huîtres face à des souches avec différents niveaux de virulence à l'égard des huîtres. Nous avons donc réalisé des contacts *in vitro* et *in vivo* entre les hémocytes et trois souches. La souche 12/016 est hautement virulente envers les huîtres, le mutant 12/016 $\Delta$ varS présente une virulence atténuée et la souche 12/122 3T3 n'est pas virulente envers les huîtres. Ces contacts nous ont permis d'observer que le gène *varS* n'influçait ni la capacité de colonisation des huîtres de *V. aestuarianus francensis*, ni la réponse des hémocytes à *V. aestuarianus francensis*, mais probablement des étapes ultérieures. Nous avons également observé que la souche 12/122 3T3 était capable de coloniser les huîtres et que sa présence entraînait une diminution de la réponse pro-inflammatoire des hémocytes.



## Introduction

Lors d'infections expérimentales réalisées dans des conditions proches de celles rencontrées dans la nature (« écologiquement réalistes ») par des souches pathogènes de *V. aestuarianus*, il est apparu que la bactérie est capable de coloniser l'hémolymphe des huîtres, de s'y multiplier puis de se propager dans tous les tissus (Parizadeh et al., 2018). Au contraire, une souche non pathogène peut pénétrer dans l'environnement interne de l'huître mais est incapable de s'y multiplier (Parizadeh et al., 2018). L'interaction entre *V. aestuarianus* et des facteurs présents dans l'hémolymphe est donc apparue déterminante pour le développement de la maladie.

Chez les invertébrés, les hémocytes sont les cellules immunitaires, jouant un rôle central dans la défense antimicrobienne. Ces cellules circulent dans l'hémolymphe et sont mobilisables en cas d'infection. En effet, chez les huîtres creuses, leur recrutement a été observé avec une infiltration massive dans les tissus lésés et/ou infectés (Bachère et al., 2004). Afin d'étudier l'interaction entre les hémocytes de l'huître et *V. aestuarianus*, Labreuche et ses collaborateurs ont réalisé des contacts *in vitro* entre la souche 01/032 (*V. aestuarianus francensis*, clade A) et des hémocytes d'huîtres, révélant que la bactérie interagissait avec ces cellules de manière extracellulaire et inhibait leurs capacités de phagocytose (Labreuche et al., 2010; Labreuche, Lambert, et al., 2006a; Labreuche, Soudant, et al., 2006). Les ECP (extracellular products) synthétisés par la souche testée avaient des effets sur les hémocytes d'huîtres : diminution de la phagocytose, diminution des capacités d'adhésion (perte des pseudopodes, arrondissement cellulaire) et augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Labreuche, Soudant, et al., 2006). Les ROS sont synthétisés à l'intérieur des hémocytes où ils vont avoir une action microbicide contre les bactéries phagocytées (Bachère et al., 2015). Les effets observés des ECP sur les hémocytes ont été reliés à l'activité protéase, reposant sur la métalloprotéase Vam (Labreuche et al., 2010). L'hypothèse était donc que 01/032 échappait à la phagocytose et en plus, induisait la production de ROS par les hémocytes, provoquant leur propre cytotoxicité, grâce à un facteur de virulence, la métalloprotéase Vam. Ces conclusions sont néanmoins à nuancer, principalement parce que la souche 01/032 n'est pas capable de coloniser l'huître et d'induire des mortalités chez les huîtres quand elle est transmise par des protocoles « écologiquement réalistes » c'est-à-dire *via* l'eau de mer. A forte dose, en injection, elle induit des symptômes chez les animaux, mais il est possible qu'il lui manque une partie du répertoire de virulence permettant de réaliser l'ensemble du cycle. Les conclusions obtenues avec cette souche ne paraissent donc pas forcément généralisables à l'ensemble des bactéries pathogènes de *V. aestuarianus francensis*.

Chez *V. aestuarianus*, des niveaux contrastés de virulence envers les huîtres sont observés selon les souches. Au sein de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, la souche 12/016 est considérée comme hautement virulente, alors que la souche 07/115 présente une virulence intermédiaire (Goudenège et al., 2015). Un décalage du cadre de lecture a été constaté dans la séquence du gène *varS* chez cette souche. Une délétion de ce gène chez le mutant 12/016 $\Delta$ *varS* aboutit à une perte de toxicité, démontrant son rôle dans la pathogénicité de *V. aestuarianus francensis* envers les huîtres (Goudenège et al., 2015). Dans les autres sous-espèces, *V. aestuarianus cardii* et *V. aestuarianus aestuarianus*, les souches sont non virulentes envers les huîtres, même lorsqu'elles sont injectées en forte concentration dans l'animal (cf. chapitre 1).

Afin d'étudier le rôle de l'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes dans la virulence des souches, nous avons voulu observer la réponse des hémocytes d'huîtres face à des souches avec différents niveaux de virulence à l'égard des huîtres. Nous avons donc réalisé des contacts *in vivo* entre les hémocytes et trois souches présentant différents niveaux de virulence (12/016, hautement virulente, 12/016 $\Delta$ *varS*, faiblement virulente et 12/122 3T3, appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, non virulente envers les huîtres). Afin d'identifier les gènes impliqués dans cette interaction, nous avons réalisé un séquençage du transcriptome de la bactérie et des hémocytes (dual RNAseq) après un contact *in vitro*.

Nous avons pu observer que les deux souches de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* sont capables de proliférer dans l'hémolymphe des huîtres, quelle que soit leur virulence. Au contraire, la souche 12/122 3T3 ne peut que s'y maintenir, sans prolifération. Parmi les gènes impliqués dans la réponse hémocytaire face à *V. aestuarianus francensis*, le gène codant l'interleukine-17 apparaît surexprimé, lors du contact avec les deux souches testées.

## Matériel et méthodes

### Suspensions bactériennes

Les souches 12/016 (une souche hautement pathogène isolée lors d'un épisode de mortalité d'huîtres), sa variante mutante 12/016 $\Delta$ *varS* (une mutation du gène *varS*) (Goudenège et al., 2015) et la souche 12/122 3T3 (une souche non virulente pour les huîtres, isolées pendant un épisode de mortalité de coques) (Garcia et al., 2021) de *V. aestuarianus* ont été utilisées pour les interactions bactéries hémocytes réalisées dans cette étude.

Les souches de *V. aestuarianus* étaient conservées à -80 °C dans un milieu Zobell contenant 15% de glycérol (v/v). Elles ont été cultivées sur un milieu nutritif Zobell (peptone 4 g L<sup>-1</sup>, extrait

de levure 1 g L<sup>-1</sup>, tampon Tris-HCl 0,5 g L<sup>-1</sup>, gélose 15 g L<sup>-1</sup> dans 1 L d'eau de mer artificielle, pH 7,8) à 22 °C. Chaque suspension a été obtenue à partir d'un isolat, placée dans le milieu Zobell liquide et incubée pendant 24 h à 22°C sous agitation constante à 20 tr/min. La suspension résultante a été centrifugée à 1500 g pendant 10 min à température ambiante. Le culot a été remis en suspension dans de l'eau de mer artificielle stérile (ASSW). La concentration bactérienne a été évaluée par spectrophotométrie à 600 nm et ajustée à une densité optique (DO) de 1,0 (5 × 10<sup>8</sup> cellules bactériennes ml<sup>-1</sup>). La pureté et la concentration des bactéries ont été contrôlées par étalement sur gélose Zobell.

## **Animaux**

Des huîtres ASI (Adultes Standardisés Ifremer) ont été produites à l'écloserie d'Argenton (Ifremer) à partir d'un pool de géniteur. Elles ont, par la suite, été transféré pour grossissement sur le site de Bouin (Ifremer) et conservés indemnes dans ces installations bénéficiant d'un traitement de l'eau adapté (filtration et traitement aux UV de tous les entrants) puis ramenés à La Tremblade à l'âge de 12 mois pour les expérimentations.

## **Capacité de prolifération dans l'hémolymphe *in vivo***

### Contact *in vivo*, protocole par injection

Quelques jours avant l'expérimentation, un trou a été percé dans la coquille des huîtres, à proximité du muscle adducteur afin de pouvoir injecter et prélever les animaux sans les anesthésier. Puis les individus percés ont été replacés en stabulation jusqu'à l'injection des bactéries, dans un aquarium de 2,5L contenant 2L d'eau de mer filtrée et traitée aux UV. 100 µL de suspension bactérienne à DO<sub>600nm</sub>=0.1, diluée 50 fois (10<sup>5</sup> bactéries) ont été injectés dans le muscle adducteur des animaux. 10 individus ont été injectés par condition, puis ont été replacés dans leur aquarium.

### Contact *in vivo*, protocole par balnéation dans de l'eau contaminée

Cinq huîtres donneuses ont été infectés par injection avec une souche de *V. aestuarianus*, puis placés dans de l'eau de mer artificielle stérile pendant 24h. Après 24h, les huîtres donneuses ont été retirés de l'eau de mer, puis la bactérie a été dosée par qPCR pour ajuster les concentrations bactériennes dans les différents bacs d'eau de mer contaminée à 7.10<sup>6</sup> copies de *V. aestuarianus*/mL. Après ajustement, des huîtres receveuses ont été placées dans l'eau de mer contaminée pendant 24 heures. Puis un trou a été percé dans la coquille des huîtres receveuses, qui ont ensuite été placées dans de nouveaux bacs d'eau de mer « propre » (filtrée et traitée aux UV) pendant deux jours. Le premier prélèvement d'hémolymphe a donc eu lieu 24 heures après la mise en place de l'infection par balnéation.

### Prélèvements d'hémolymphe et quantification de *V. aestuarianus*

100 µL d'hémolymphe ont été prélevés 1h, 24h et 48h après l'injection des bactéries, et après 24h et 48h après immersion dans l'eau de mer contaminée. L'ADN total a été extrait de l'hémolymphe au moyen du kit DNeasy 96 Blood and Tissue (Qiagen). Les concentrations d'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop, Thermo Fischer). La quantification de l'ADN de *V. aestuarianus* a été réalisée via un protocole qPCR (Saulnier et al., 2009) sur des thermocycleurs Mx3000 et Mx3005 (Agilent). Les réactions d'amplification ont été réalisées en double, dans un volume total de 20 µl. Chaque puits contenait 5 µl d'ADN génomique (5 ng µl<sup>-1</sup>), 10 µl du Brilliant III Ultra-Fast Master Mix (Agilent), 0,060 µl de chaque amorce à 100 µM (DNAj-F 5'-GTATGAAATTTAACTGACCCACAA, DNAj-R 5'-CAATTTCTTTCGAACAACCAC), 0,040 µl de sonde DNAj 100 µM (5'-TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC), et 4,84 µl d'eau distillée. Les conditions de cycle qPCR étaient les suivantes : 3 min à 95°C, suivis de 40 cycles d'amplification à 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 20 s. Les concentrations bactériennes ont été calculées en utilisant une courbe standard réalisée à partir de l'ADN total de la souche 02/041 dosé et ajusté à 10<sup>10</sup> unités génomiques UG/ml

### Analyses statistiques

Afin de comparer les concentrations bactériennes dans l'hémolymphe des huîtres après différents temps d'infection, des tests non-paramétriques de Wilcoxon-Mann-Witney ont été réalisés.

### **Dual RNA seq**

#### Préparation de l'hémolymphe

L'hémolymphe de 200 huîtres dont la coquille avait été préalablement percée, a été prélevée. Chaque prélèvement a fait l'objet d'un contrôle pour vérifier la présence et la qualité des hémocytes ainsi que l'absence de gamètes ou d'éventuelles traces d'infection microbiologique. L'hémolymphe a été centrifugée (1 000g, 15 minutes, 4°C). Le surnageant a été filtré sur 0,22 µm et utilisé pour resuspendre le culot d'hémocytes. Puis l'hémolymphe a été conservée sur glace jusqu'à la réalisation des contacts. Un comptage des hémocytes a été réalisé sur lame de Malassez et estimé à 2.10<sup>5</sup> hémocytes/mL d'hémolymphe.

#### Contact *in vitro*

Pour chaque souche testée (12/016, 12/016ΔvarS et 12/122 3T3), 1 mL de suspension bactérienne ajustée à DO = 0,5 (5.10<sup>7</sup> bactéries) a été ajouté à 10 mL d'hémolymphe (2.10<sup>6</sup> hémocytes) pour obtenir une MOI de 1:25, dans des tubes Falcon de 15 mL. Pour chaque condition, le contact a été réalisé en 5 réplicats techniques. Puis les tubes de contact ont été laissés à 20°C pendant 2 heures. En parallèle, des hémocytes sans bactéries ajoutées ont été

laissée dans les mêmes conditions pendant 2 heures (5 tubes). Puis les tubes contenant les hémocytes seuls ou les hémocytes et les bactéries ont été centrifugés (1 500g, 10 min à 4°C). Le surnageant a été retirée, et les culots ont été lysés dans 1,5 ml de Trizol, puis vortexés pendant 15 secondes (Life technologies Inc.). Les échantillons ont été stockés à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

#### Extraction d'ARN et préparation des librairies

L'ARN a été extrait dans chaque tube de contact à l'aide du kit Direct-Zol RNA (Zymo), et selon le protocole du fabricant. Une étape de purification de l'ARN a été réalisée avec le kit RNA Clean & Concentrator. Après contrôle de la qualité des extractions (ratio 260/280 et 260/230), 3 échantillons ont été sélectionnés pour la construction des librairies. La construction des librairie a été réalisée par Acobiom (Montpellier, France, <https://www.acobiom.com/fr/>). Elle comprend une étape de ribo-deplétion avec le kit RiboMinus Transcriptome Isolation kit, bacteria (Invitrogen, référence K155004), puis la construction des librairies proprement dite avec le kit Truseq stranded mRNA (Illumina), selon le protocole du kit. Les librairies ont été séquencées sur une plate-forme Nextseq500, en paired-end 2x150 pb. Au total, 1,1 milliard de reads ont été séquencés, dont 0,8% ont été mappé sur le génome de *C. gigas* et 0,8% sur le génome de *V. aestuarianus*.

**Tableau 4 : Nombre de reads et pourcentage des reads totaux alignées sur les génomes de *V. aestuarianus* 02/041 et *C. gigas*, dans les différents échantillons.**

**HC : hémocytes seuls ; HC(12/016) : Hémocytes en contact avec 12/016 ; HC(12/016ΔVARS) : Hémocytes en contact avec 12/016ΔvarS ; HC(12/122 3T3) : hémocytes en contact avec 12/122 3T3.**

LIBRAIRIES	Séquences alignées sur le génome de <i>V. aestuarianus</i>		Séquences alignées sur le génome de <i>C. gigas</i>	
	Nombre	% du nombre de reads totaux	Nombre	% du nombre de reads totaux
HC 1	119	0,00	223 149	0,02
HC 2	149	0,00	756 363	0,07
HC 3	150	0,00	375 526	0,03
HC(12/016) 1	827 354	0,08	942 497	0,09
HC(12/016) 2	608 004	0,06	581 742	0,05
HC(12/016) 3	527 948	0,05	697 527	0,06
HC(12/016ΔVARS) 1	593 128	0,05	813 607	0,07
HC(12/016ΔVARS) 2	581 097	0,05	769 204	0,07
HC(12/016ΔvarS) 3	456 856	0,04	1 325 085	0,12
HC(3T3) 1	1 722 504	0,16	770 246	0,07
HC(3T3) 2	1 299 484	0,12	523 665	0,05
HC(3T3) 3	1 744 125	0,16	805 734	0,07

### Bioinformatique et analyses statistiques

Une première étape de nettoyage des séquences (adaptateurs et séquences de mauvaise qualité ou trop courtes) a été réalisée avec FastP (Chen et al., 2018), suivi d'un contrôle de la qualité des séquences avec FastQC (Simons, 2010). Les séquences ont été alignées sur le génome de la souche 02/041 avec le logiciel RNA Star (Dobin et al., 2013). Le nombre de séquences alignées par gènes bactériens a été compté grâce au logiciel HTseq count (Anders et al., 2015). Ensuite, les séquences restantes ont été alignées sur le génome de l'huître *C. gigas* (version V9, disponible sur NCBI) (G. Zhang et al., 2012), et le nombre de séquences alignées par gènes de l'huître a été compté grâce au logiciel HTseq count (mode union). Les gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été identifiés avec DESeq v.2 (Love et al., 2014) sur R (R Core Team, 2021) lors des comparaisons suivantes :

- Hémocytes en contact avec 12/016 (HC(12/016)) vs Hémocytes seuls (HC)
- Hémocytes en contact avec 12/016 $\Delta$ varS (HC(12/016 $\Delta$ varS)) vs Hémocytes seuls (HC)
- Hémocytes en contact avec 12/122 3T3 (HC(12/122 3T3)) vs Hémocytes seuls (HC)
- Bactéries 12/016 en contact avec des hémocytes (12/016(HC)) vs Bactéries 12/016 $\Delta$ varS en contact avec des hémocytes (12/016 $\Delta$ varS(HC))

Des annotations fonctionnelles des gènes de l'huître (Goterms <http://geneontology.org/>) ont été obtenues grâce au logiciel Blast2GO (Conesa & Götz, 2008) et les annotations fonctionnelles des gènes bactériens ont été obtenues en utilisant EggNog-Mapper v2.1.0 (Huerta-Cepas et al., 2016, 2017).

## Résultats et discussion

**VarS n'influence pas la capacité de colonisation de l'hémolymphe des huîtres de *V. aestuarianus francensis*.** La dynamique de la colonisation et du maintien, voire du développement de *V. aestuarianus* a été étudiée via des expériences d'injection dans le muscle adducteur d'animaux, et d'immersion d'huîtres dans de l'eau de mer contaminée. Lors des tests par injection, nous avons observé que *V. aestuarianus francensis* est capable de proliférer dans l'hémolymphe, quel que la souche 12/016 ou son mutant delta varS, à virulence atténuée (Figure 30). Il est à noter que malgré le parcours zootechnique « sécurisé » que les huîtres ASI ont suivi, de faibles détections de l'ADN de *V. aestuarianus* ont pu être détecté dans l'hémolymphe de nos animaux témoins.

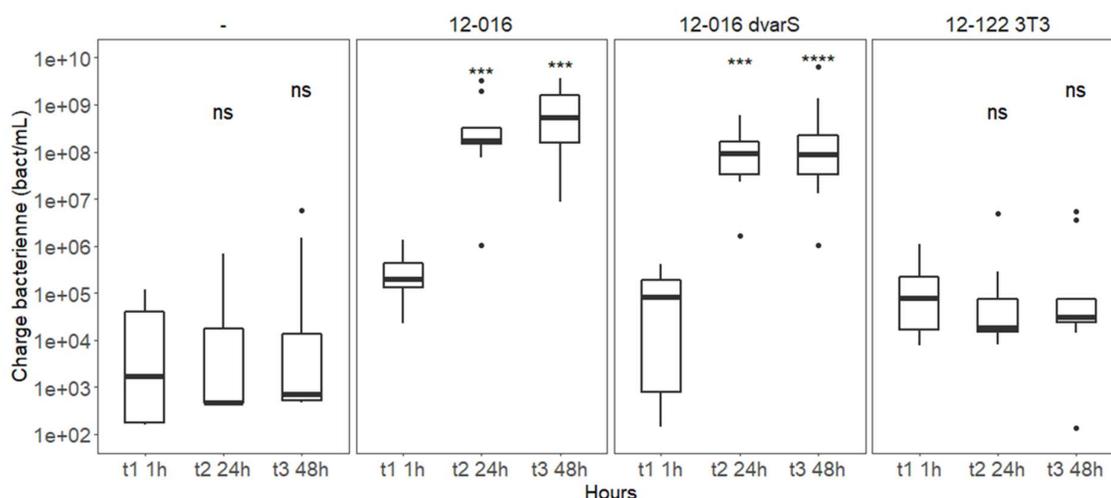


Figure 30 : Charges bactériennes mesurées par qPCR dans l'hémolymphe d'huîtres injectées avec *V. aestuarianus*. Pour chaque souche, les charges bactériennes mesurées après 24 et 48h ont été comparées avec celles mesurées après 1h avec un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. \*\*\* : p-value < 0,01 et \*\*\*\* : p-value < 0,005, ns : non significatif. Pour chaque condition, 10 individus ont été injectés.

Lors des expérimentations d'infection des huîtres par immersion dans l'eau de mer contaminée, nous avons constaté que les deux souches de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis* parvenaient à coloniser l'hémolymphe des huîtres creuses dès 24h après immersion, et à y proliférer (Figure 31), même si le développement de la souche 12/016 $\Delta$ varS paraît plus limité.

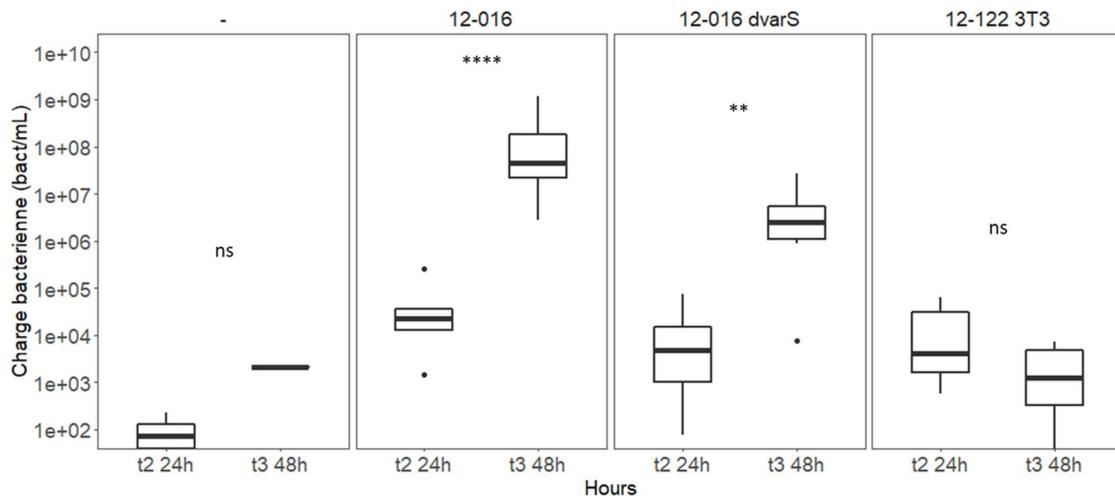


Figure 31 : Charges bactériennes mesurées par qPCR dans l'hémolymphe d'huîtres immergées dans de l'eau de mer contaminée avec *V. aestuarianus*.

Pour chaque souche, les charges bactériennes mesurées après 48h ont été comparées avec celles mesurées après 24h avec un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. \*\* : p-value < 0,005, \*\*\* : p-value < 0,01 et \*\*\*\* : p-value < 0,005, ns : non significatif. Pour chaque condition, 10 individus ont été infectés.

Ces expérimentations montrent que le gène *varS* de *Vibrio aestuarianus* n'est pas impliqué dans la capacité bactérienne d'infection et de colonisation de l'hémolymphe des huîtres. Cela suggère que le système à deux composants *varA/varS* régule des facteurs de toxicité de la bactérie, une délétion de ce gène entraînant une virulence plus faible (Goudenège et al., 2015), mais pas des facteurs de prolifération (ou du moins pas aux temps que nous avons étudiés).

**VarS n'influence pas la réponse des hémocytes des huîtres face à *V. aestuarianus francensis*.** Lors du contact *in vitro* entre les hémocytes d'huîtres et la souche *V. aestuarianus francensis* 12/016, 226 gènes significativement différentiellement exprimés (DEG, FDR < 0,01 ; log2FC <-1 ou >1) par les hémocytes ont été détectés. 152 sont surexprimés et 74 sont sous exprimés. Ce nombre de DEG n'a pas permis de réaliser une étude d'enrichissement fonctionnelle, de type RBGOA (Rank-based gene ontology analysis) (R. M. Wright et al., 2015), pour identifier d'éventuelles fonctions hémocytaires régulées en présence de la bactérie. Nous nous sommes donc intéressés à des fonctions spécifiques comme l'immunité.

Parmi les gènes surexprimés à des temps précoces en présence de la bactérie, nous avons identifié plusieurs gènes impliqués dans l'immunité, et plus précisément dans la réponse pro-inflammatoire chez les invertébrés (J. Li et al., 2014; Lv et al., 2022; Qiu et al., 2009; Y. Zhang et al., 2011) (Tableau 1). Parmi eux, un gène code pour l'interleukine IL17-like, une cytokine (molécule jouant le rôle de médiateur chimique) connue pour stimuler la transcription de gènes codant des molécules pro-inflammatoires et généralement surexprimée en présence de pathogènes du genre *Vibrio* (J. Li et al., 2014). Ces gènes sont également surexprimés par les

hémocytes en présence de la souche 12/016 $\Delta$ varS. Plus généralement, nous n'avons pas détecté de DEG entre les hémocytes en contact avec 12/016 et les hémocytes en contact avec 12/016 $\Delta$ varS. Cela suggère que les deux bactéries sont reconnues de la même manière par les hémocytes et que le gène varS n'influence pas la réponse hémocytaire.

Tableau 5 : Gènes de l'hôte différenciellement exprimés en présence de différentes souches, impliqués dans la réponse inflammatoire.

HC(souche S) = hémocytes en présence de la souche S. HC = hémocytes seuls. Le log<sub>2</sub>FC condition 1/condition 2 représente le différentiel d'expression de la condition 1 par rapport à la condition 2.

ID Gène	Protéine	Log <sub>2</sub> FC	Log <sub>2</sub> FC	Log <sub>2</sub> FC
		HC(12/016) / HC	HC(12/016 $\Delta$ varS) / HC	HC(12/122 3T3) / HC
30492	interleukin 17-like protein	+2,53	+2,19	-1,88
24775	TNF receptor-associated factor 6	+1,82	+1,68	-
26254	tumor necrosis factor receptor superfamily member 27	+1,61	+1,41	-
23464	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	+1,40	+1,37	-
14572	interleukin enhancer-binding factor 2 homolog	+1,39	-	-
26465	NF-kappa-B inhibitor epsilon-like	+1,38	-	-1,04

### **VarS régule des gènes impliqués dans l'export du cuivre chez *V. aestuarianus francensis*.**

Pour tenter d'identifier des gènes régulés par le système varA/varS chez *V. aestuarianus francensis*, nous avons comparé les transcriptomes de la souche WT 12/016 et de la souche mutée 12/016 $\Delta$ varS, lorsqu'elles sont en présence d'hémocytes d'huîtres. Nous avons identifié 404 DEG, dont 213 sont sous-exprimés et 191 sont surexprimés chez le mutant 12/016 $\Delta$ varS par rapport à la souche WT. 30 DEG (12 surexprimés et 18 sous-exprimés) n'ont pas d'annotation fonctionnelle. Ensuite, que ce soient les gènes sous exprimés chez le mutant (Figure 32.A) ou les gènes sur-exprimés chez le mutant (Figure 32.B), ils codent majoritairement pour des protéines impliqués dans le métabolisme.

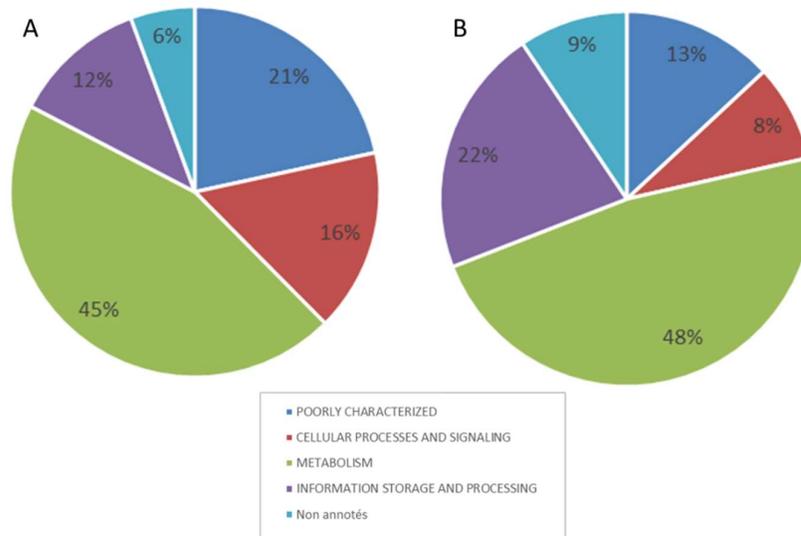


Figure 32 : Pourcentages de gènes (A) sous-exprimés chez le mutant 12/016 $\Delta$ varS par rapport à la souche WT et (B) de gènes sur-exprimés chez le mutant, dans les différentes catégories fonctionnelles.

De manière surprenante, nous n'avons pas retrouvé le gène codant la métalloprotéase Vam parmi les DEG. Cependant nous avons pu observer une sous-expression chez le mutant du gène codant pour la protéase permettant la maturation de Vam : Vpp (Vam processing protease). Cette enzyme permet la transformation en une forme active de la protéase dans le périplasme et limite ainsi sa toxicité dans les bactéries qui la produisent. Cela suggère que la souche 12/016 régulerait l'activité de sa protéase par des mécanismes post-traductionnels plutôt que transcriptionnels, tout du moins dans ces conditions d'expérimentation et/ou dans cette phase de l'infection (soit après 2h de contact). Ceci serait en accord avec Goudenège et ses collaborateurs qui avaient observé une activité protéasique plus faible des ECP (extracellular products) produits par la souche mutée, *in vitro* (Goudenège et al., 2015).

Les gènes codant pour les ARN interférents CsrB sont sous-exprimés chez 12/016 $\Delta$ varS par rapport à 12/016 (Tableau 6). La régulation de ces ARN interférents par le système à deux composants VarA/VarS avait déjà été observée chez des bactéries du genre *Vibrio*. Par exemple, chez *V. tasmaniensis* LGP32, une bactérie pathogène d'huîtres creuses, VarA/VarS régule l'expression des gènes *csrB2*, *csrB3* et *csrB4*, mais pas celle de *csrB1* (Nguyen et al., 2018). Les deux systèmes VarS/VarA et *csrB/csrA* sont également impliqués dans la virulence de LGP32, par la synthèse de toxines Vsm et PrtV (métalloprotéases).

De façon intéressante, nous avons observé que plusieurs gènes impliqués dans l'export du cuivre sont significativement plus exprimés par le mutant 12/016 $\Delta$ varS que par la souche WT (Tableau

6). Cela suggère que les systèmes de régulation de l'export du cuivre sont eux-mêmes régulés par VarA/VarS. Ces 2 systèmes étant des éléments clés du répertoire de virulence de *V. aestuarianus francensis*, il serait intéressant d'explorer leur interconnexion.

Tableau 6 : Gènes bactériens différenciellement exprimés par la souche 12/016 et par 12/016 $\Delta$ carS en présence d'hémocytes d'huîtres.

Souche S(HC) = souche S en présence d'hémocytes. Le log<sub>2</sub>FC condition 1/condition 2 représente le différentiel d'expression de la condition 1 par rapport à la condition 2.

ID Gène	Protéine	Log <sub>2</sub> FC
		12/016 $\Delta$ varS (HC) / 12/016(HC)
12832160	Signal transduction histidine-protein kinase barA (or varS)	-9,28
12834731	CsrB-like sRNA	-6,07
12834834	CsrB	-5,10
12834730	CsrB-like sRNA	-3,90
12831215	Vam processing protease (Vpp)	-1,38
12831123	copper/silver efflux system, membrane component CusA	+1,21
12834172	NA-binding response regulator in two-component regulatory system CusR	+1,33
12831122	putative copper/silver efflux system membrane fusion protein CusB	+1,42

**La souche 12/122 3T3 parvient à coloniser l'hémolymphe des huîtres creuses.** Lors des tests par injection, la souche 12/122 3T3, appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, s'est maintenue dans l'hémolymphe des huîtres, sans prolifération (Figure 1). Lors des expérimentations d'infection des huîtres par immersion dans l'eau de mer contaminée, nous avons constaté que cette souche parvenait à coloniser l'hémolymphe des huîtres creuses dès 24h après immersion, tout comme les deux souches de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, mais encore une fois, sans se multiplier (Figure 2).

Ces deux expérimentations confirment que la souche 12/122 3T3 peut être portée par les huîtres creuses, au moins sur les temps courts ici étudiés (48h). L'importance de cette association dans le cycle naturel de la bactérie reste néanmoins à préciser. Sa stabilité dans le temps devra être évaluée, de même que son existence en milieu naturel sur des sites où les deux espèces de bivalves sont présentes.

**La souche 12/122 3T3 entraîne une diminution de la réponse pro-inflammatoire des hémocytes des huîtres creuses.** Lorsque les hémocytes sont mis en contact avec la souche 12/122 3T3, 280 gènes sont différenciellement exprimés. La plupart (200 DEG) sont sous-exprimés en présence de la bactérie, suggérant que globalement, celle-ci réprime l'expression des gènes dans les hémocytes. Parmi les DEG sous-exprimés, nous retrouvons le gène codant

l'interleukine-17. Cela suggère que la souche 12/122 3T3 réprime la réponse pro-inflammatoire des hémocytes. Une hypothèse pourrait alors être que la réponse pro-inflammatoire des hémocytes de l'huître, face à *V. aestuarianus francensis*, pourrait jouer un rôle dans la virulence, peut-être en se dirigeant vers des cellules de l'huître et non vers la bactérie. Il a été observé que les hémocytes phagocytaires chez *C. gigas* étaient riches en cytokines de type interleukine-17 et en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (S. Jiang et al., 2016). On peut alors imaginer que lorsque les hémocytes phagocytaires d'huîtres sont en contact avec une souche appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, ils mettent en place une réponse de type phagocytose et inflammation avec production de ROS, qui est médiée notamment par l'interleukine-17, mais que la bactérie échappe à la phagocytose par un mécanisme qui doit encore être identifié. Ainsi, la réponse inflammatoire se retourne contre les hémocytes, comme cela a déjà été suggéré par Labreuche et ses collaborateurs (Labreuche, Lambert, et al., 2006a). Sous cette hypothèse, la souche 12/122 3T3 pourrait alors avoir un rôle bénéfique puisqu'elle est capable de réprimer la réponse anti-inflammatoire. Considérant que cette souche est néanmoins contrôlée par le système immunitaire de l'huître, d'autres voies de signalisation sont potentiellement activées par sa présence. Néanmoins, nous n'avons pas pu identifier de voie de signalisation liée à l'immunité, surexprimée en présence de cette souche.

## Conclusions

Ce chapitre présente des résultats préliminaires qui devront être complétés pour mieux comprendre l'interaction entre *V. aestuarianus* et les hémocytes. Par exemple, pour mieux caractériser la stratégie de *V. aestuarianus*, il apparaît primordial d'étudier d'autres fonctions hémocytaires, comme la production de ROS. La survie des hémocytes et le dénombrement en présence des bactéries devraient également être estimés. Labreuche et ses collaborateurs avaient observé une faible survie hémocytaire en présence de la souche 01/032 (*V. aestuarianus francensis*), potentiellement liée à la réponse pro-inflammatoire des hémocytes en présence de la bactérie, se traduisant par une production de ROS (Labreuche, Lambert, et al., 2006a). Comme le suggère nos résultats, cette réponse pro-inflammatoire pourrait être médiée par l'interleukine-17. Dans l'étude de Labreuche et ses collaborateurs, une diminution de la capacité de phagocytose des hémocytes avaient également été observée. Celle-ci devrait être confirmée, avec d'autres souches plus virulentes, et en tenant compte des types hémocytaires. Bien que ce nombre soit très probablement sous-évalué, au minimum trois types hémocytaires différents sont présents dans l'hémolymphe des huîtres, avec des fonctions différentes et plus ou moins spécifiques. Des approches single-cell RNAseq et de cytométrie accompagnée de tri cellulaire permettraient d'évaluer plus précisément l'impact de *V. aestuarianus francensis* sur la réponse cellulaire chez *C. gigas*. Ensuite, pour tester l'hypothèse du rôle protecteur de la souche 12/122 3T3, des infections par un mélange de bactéries (une souche virulente *V. aestuarianus francensis* et la souche 12/122 3T3) pourraient être réalisées.

Ce chapitre présente des résultats préliminaires d'interactions *in vivo* et de RNAseq *in vitro*. Le comportement des gènes candidats identifiés devra être étudié *in vitro* et *in vivo* en utilisant un ensemble de souches pour s'assurer de pouvoir généraliser nos conclusions.

Enfin, les connaissances sur l'interaction entre les souches de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* et les coques sont actuellement nulles. Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons identifié plusieurs génogroupes dans cette sous-espèce avec des niveaux de virulence contrastés à l'égard des coques. Des tests d'infection de coques par immersion dans de l'eau de mer contaminée pourraient être réalisés avec des souches de niveaux de virulence différents pour étudier la dynamique de l'infection, ainsi que la réponse hémocytaires dans ces différents cas. Cela permettrait potentiellement de mieux comprendre le rôle des souches les moins virulentes dans le développement de la maladie.



## Discussion générale

Dans les années 1980, l'espèce bactérienne *V. aestuarianus* a été décrite comme une bactérie associée aux environnements estuariens (Tison & Seidler, 1983) pouvant être isolée d'espèces de bivalves ou de crabes, mais sans provoquer de maladies. Mais au début des années 2000, son implication dans des mortalités d'huîtres *C. gigas* a pu être constatée (Garnier et al., 2007). Les souches responsables de ces mortalités ont été regroupées dans la sous-espèce *V. :aestuarianus francensis* (Garnier et al., 2008). Puis en 2012, des mortalités de coques *C. edule* associées à *V. aestuarianus* ont été rapportées (François et al., 2013). Cependant, les processus ayant mené à l'émergence de ces lignées pathogènes de bivalves sont restés inconnus. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse était de mieux comprendre les processus gouvernant l'émergence et l'évolution de ces lignées en intégrant des données génétiques, phénotypiques et écologiques.

Grâce aux travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, la structuration génétique de l'espèce est mieux connue : à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, qui regroupe les souches pathogènes d'huîtres (Garnier et al., 2008), s'ajoute la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, décrite dans le cadre de cette thèse (chapitre 1, article 1), qui regroupe les souches pathogènes de coques. Les deux sous-espèces provoquent des maladies dans leurs populations d'hôtes en été, et parmi les facteurs définissant les conditions permissives au développement des maladies, la température a été identifiée. De plus, le développement de la maladie des huîtres est également corrélé à une diminution de la salinité.

Dans le chapitre 2, nous proposons que les souches de la sous-espèces *V. aestuarianus francensis* ont un mode de vie de spécialiste, avec un habitat restreint aux huîtres. Elle a émergé au cours de la seconde moitié du 20<sup>e</sup> siècle, et l'un des événements ayant favorisé l'émergence de ce pathogène pourrait être l'acquisition et l'intégration génomique d'un élément génétique mobile contenant des gènes codant des protéines impliquées dans l'export du cuivre. Nous avons observé que, depuis son émergence, l'histoire évolutive de cette sous-espèce est peu impactée par la recombinaison et les échanges génétiques. Nous assistons ainsi à l'expansion clonale de ce pathogène, à l'échelle européenne. Nous avons pu étendre son spectre d'hôtes sensible à l'huître plate, en montrant qu'une souche de cette sous-espèce est capable de se multiplier dans l'hémolymphe de ces animaux puis de se propager dans l'ensemble des tissus (chapitre 1). Les connaissances sur l'interaction entre les bactéries de cette sous-espèce et les hémocytes des huîtres creuses ont été complétées par la mise en évidence de l'induction d'une réponse pro-inflammatoire chez les hémocytes en contact avec ces souches (chapitre 4).

Dans le chapitre 3, nous montrons que l'histoire évolutive de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* (pathogène de coques) est plus impactée par la recombinaison et les échanges génétiques que celle de la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Plusieurs groupes génétiques présentant des niveaux de virulence différents envers les coques ont pu être identifiées et la comparaison des génomes entre ces groupes a permis d'identifier des facteurs de virulence potentiels (T1SS et T6SS). Bien que cette sous-espèce ne tue que les coques, elle apparaît moins dépendante de son hôte que la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. En effet, elle peut se maintenir dans l'environnement des coques en été. La maladie liée à cette sous-espèce apparaît géographiquement moins répandue que celle due à *V. aestuarianus francensis*. En effet, à notre connaissance, des épisodes de mortalité de coques causés par *V. aestuarianus cardii* n'ont été rapportés qu'en France.

### Structuration génomique en fonction de l'espèce-hôte chez *V. aestuarianus*

Comme nous l'avons expliqué en introduction de ce manuscrit de thèse, lorsque l'on s'intéresse à l'émergence et aux dynamiques évolutives de lignées bactériennes pathogènes, le niveau taxonomique de l'espèce n'est pas toujours adapté. En effet, des groupes ayant une niche écologique différente peuvent exister chez une même espèce bactérienne (Cohan, 2006; Cohan & Perry, 2007). Il est donc plus pertinent de s'intéresser aux groupes écologiques, ou écotypes.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à identifier et caractériser les écotypes chez *V. aestuarianus* ainsi que leurs niches écologiques et leurs modes de vie. Grâce aux études précédemment réalisées par Garnier et ses collaborateurs, et par Goudenège et ses collaborateurs (Garnier et al., 2008; Goudenège et al., 2015), les souches de *V. aestuarianus* pathogènes d'huîtres avaient été regroupées dans la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Au-delà de leur virulence envers les huîtres, ces souches se caractérisaient par une très faible diversité génétique, avec deux clades très proches comprenant des souches hautement similaires au niveau nucléotidique. Nous avons complété les connaissances sur la structure génétique de l'espèce, en identifiant une autre sous-espèce, *V. aestuarianus cardii*, au sein de laquelle se regroupent les souches pathogènes pour les coques *C. edule* (chapitre 1). Ainsi, chez *V. aestuarianus*, la virulence envers un hôte donné est spécifique à un groupe phylogénétique. Une structuration de la population en fonction de l'espèce hôte a été observé chez d'autres *Vibrio*. Par exemple, chez *V. vulnificus*, trois biotypes ont été décrits. Le biotype 1 contient la plupart des isolats cliniques associés à des infections humaines, le biotype 2 est considéré comme pathogène pour des espèces d'aquaculture, comme les anguilles (Sanjuán et al., 2011). Le

biotype 3 est associé à de graves épidémies d'infections de plaies chez les pisciculteurs et les consommateurs de tilapia cultivé en aquaculture (M. K. Jones & Oliver, 2009).

Nous avons montré qu'en plus d'avoir des spectres d'hôtes distincts, ces deux sous-espèces diffèrent par d'autres caractéristiques, notamment leur aire de répartition. En effet, alors que la maladie due à *V. aestuarianus francensis* impacte l'ostréiculture à l'échelle européenne, les mortalités de coques liées à *V. aestuarianus cardii* ne sont rapportées qu'en France (Tableau 7), et à une fréquence moindre. Il faut ajouter que les coques *C. edule* sont menacées par de nombreux stress et agents pathogènes, tels que le trématode *Gymnophallus choledochus* et le protozoaire *Marteilia cochillia* (Longshaw & Malham, 2013), et par une néoplasie transmissible (Carballal et al., 2015; Ujvari et al., 2017). Ainsi, la part des mortalités naturelles des bancs de coques imputables à *V. aestuarianus cardii* apparaît moindre en comparaison avec celles liées à *V. aestuarianus francensis* chez les huîtres (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques générales des deux sous-espèces pathogènes de *V. aestuarianus*

	<i>V. aestuarianus francensis</i>	<i>V. aestuarianus cardii</i>
Distribution géographique	Europe	France
Facteurs environnementaux	Température, salinité, & autres facteurs à identifier	Température, & autres facteurs à identifier
Impact de la recombinaison et des échanges génétiques sur l'évolution	-	+
Habitat (hiver)	Huîtres creuses (huîtres plates ?)	Coques (naissain ?)
Habitat (été)	Huîtres creuses (huîtres plates ?)	Coques, sédiment, huître, autres
Hôte sensible	Huîtres creuses, huîtres plates	Coques
Part de la mortalité des populations naturelles ou cultivées due à <i>V. aestuarianus</i>	++	-
Facteurs de virulence/adaptation	copA, cusRSABCF, ...	T1SS, ...

## V. aestuarianus francensis, une bactérie pathogène spécialisée envers les huîtres

Nous avons pu compléter les connaissances sur l'écologie de *V. aestuarianus francensis*, qui apparaît comme une bactérie pathogène spécialiste dont le spectre d'hôtes et l'habitat semblent limités aux huîtres creuses et aux huîtres plates. Les données génétiques et écologiques concernant cette sous-espèce bactérienne sont cohérentes avec cette hypothèse de spécialisation, mais également avec une population évoluant peu et de petite taille efficace (nombre d'individus qui transmettent leurs gènes). Chez les agents infectieux ayant un habitat restreint à une espèce hôte, la taille efficace de la population est petite, en raison de la dynamique de transmission. Chaque individu hôte infecté est colonisé par un inoculum, qui se multiplie, puis se transmet à d'autres individus. La taille efficace se limite donc aux bactéries qui vont réussir à infecter un nouvel individu. De plus, chez *V. aestuarianus francensis*, la transmission est saisonnière avec des mortalités de l'ordre de 30% survenant pendant les mois d'été (Garnier et al., 2007). Cela crée des goulots d'étranglement pendant la saison froide. La taille efficace de la population peut donc refléter le nombre d'hôtes infectés pendant la saison froide, qui seront les seuls individus à partir desquels de nouvelles épidémies pourront avoir lieu (Figure 33). Ainsi, une épidémie ayant lieu dans une ferme ostréicole est potentiellement liée à une seule population de *V. aestuarianus francensis* issue de quelques individus fondateurs, qui se sont multipliés dans des huîtres, les cellules résultant de cette multiplication se transmettant à de nouveaux individus et ainsi de suite.

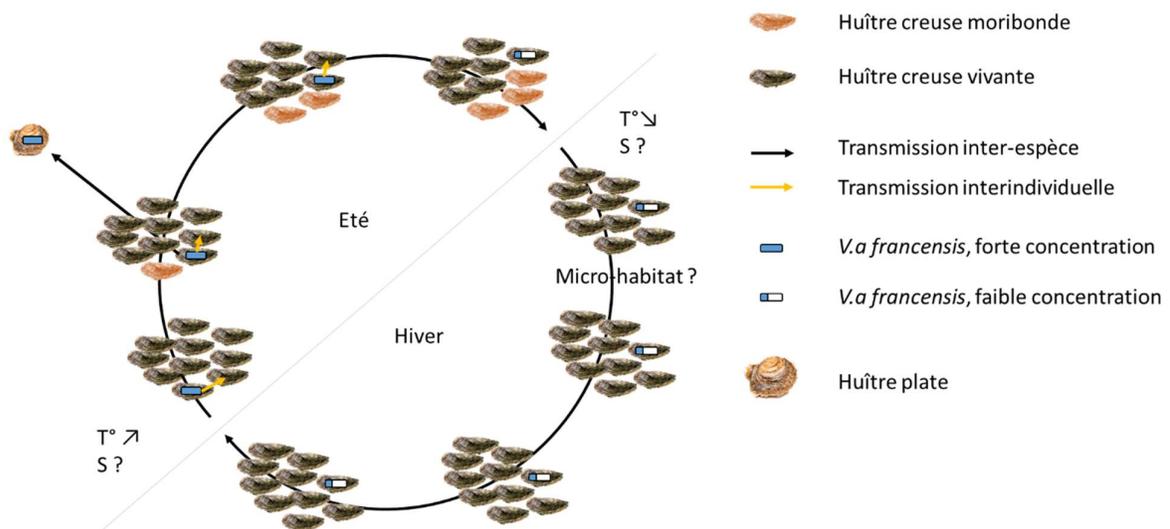


Figure 33 : Cycle proposé pour la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*.

La maladie apparaît en été avec une dynamique de transmission progressive aboutissant à des mortalités cumulées moyennes de 30% des animaux par élevage. Des transmissions inter-espèces sont possibles des huîtres creuses vers les huîtres plates. A la fin de l'été, quelques animaux porteurs de la bactérie en faible concentration survivent et conservent cet état pendant l'hiver. Le micro-habitat de la bactérie dans ces individus porteurs reste à déterminer. Puis au début de l'été, de nouvelles épidémies peuvent avoir lieu à partir de ces individus porteurs.

Nous avons montré que le taux de mutation (2,5 mutations par génome et par an) est faible dans les deux clades de *V. aestuarianus francensis*. Ce taux de mutation peut être expliqué par une pression de sélection purificatrice qui mènerait à la perte des allèles alternatifs dans les génomes. Celle-ci devrait alors s'appliquer à l'ensemble des génomes. Mais cela apparaît peu probable dans la mesure où nous avons détecté 500 pseudogènes en moyenne par génome. Ces loci ne codent pas de protéines fonctionnelles et ne sont donc probablement pas sous sélection. Malgré cela, ces loci sont peu polymorphes dans la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*, ce qui suggère que la faible diversité génétique dans cette sous-espèce n'est certainement pas la conséquence d'une pression de sélection purificatrice.

Une deuxième hypothèse pourrait relier ce taux de mutations à la cinétique des mortalités d'huîtres creuses liées à *V. aestuarianus francensis*. Ces mortalités progressent lentement dans les populations d'huîtres. Cette observation suggère que la bactérie se multiplie lentement en conditions naturelles, ce qui peut participer à maintenir un taux de mutation faible. Une autre hypothèse est l'existence d'une phase de latence dans le cycle de *V. aestuarianus francensis*. En effet, comme l'avaient montré Parizadeh et al. (2018), des huîtres porteuses de faibles concentrations de *V. aestuarianus francensis* peuvent être asymptomatiques dans des conditions non permissives au développement de la maladie, c'est-à-dire en hiver. Puis la modification d'un paramètre (comme une augmentation de la température de l'eau) peut « réveiller » la bactérie qui se multiplie et se propage dans les tissus de l'huître jusqu'à la mort de l'animal et sa transmission à un autre individu. Cette observation suggère qu'en dehors de la période permissive (période pendant laquelle la maladie s'exprime dans les élevages), *V. aestuarianus francensis* pourrait subsister dans les tissus de son hôte à l'état latent, ce qui serait cohérent avec un mode de vie spécialiste. Chez *M. tuberculosis*, qui peut également subsister à l'état latent chez son hôte humain, des taux de mutation significativement plus faibles sont observés pendant ces phases de latence (Colangeli et al., 2014). De même, chez *V. aestuarianus francensis*, pendant la phase de latence, les activités cellulaires pourraient être fortement réduites et le taux de réplication de la bactérie, très faible, de même que les erreurs accompagnent la réplication des génomes. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions, comme Colangeli et ses collaborateurs, effectuer des expériences d'évolution expérimentales pour évaluer l'effet de la durée de latence sur le taux de mutation (Colangeli et al., 2014), en jouant sur la durée de la phase de latence en laboratoire par le contrôle d'un paramètre connu pour influencer le développement de la maladie, comme la température. Nous pourrions alors appliquer différents rythmes de maladies à des populations d'huîtres et séquencer des génomes de *V. aestuarianus* après chaque phase permissive, pendant plusieurs générations.

Nous avons également montré que les taux de recombinaison ( $r/m$  dans le clade A et le clade B :  $0.36 \pm 0.22$  and  $0.28 \pm 0.09$ ) sont faibles chez *V. aestuarianus francensis* et que les échanges génétiques semblent rares, se traduisant par un pangénome fermé. Pour expliquer cela, nous avons proposé que des barrières écologiques limitent fortement la recombinaison et les flux de gènes avec les autres populations microbiennes. Selon notre hypothèse de pathogène spécialiste, *V. aestuarianus francensis* passe la quasi-totalité de son cycle à l'intérieur de son hôte, ce qui empêche les échanges avec les populations microbiennes environnementales. Cependant, les huîtres abritent de nombreux micro-organismes, constituant leur microbiote, notamment dans l'hémolymphe (Lokmer, Goedknegt, et al., 2016; Lokmer & Mathias Wegner, 2015), la glande digestive (Vezzulli et al., 2018), les branchies et le manteau (Lokmer, Kuenzel, et al., 2016). Pour que les échanges n'aient pas lieu avec ces populations microbiennes, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. (1) *V. aestuarianus francensis* peut occuper un micro-habitat stérile, et serait donc isolée des autres populations. Il est donc important de préciser la localisation tissulaire et les micro-habitats de *V. aestuarianus francensis* pendant la totalité de son cycle par des approches de biologie moléculaire. (2) Une autre hypothèse est l'existence de systèmes de défenses contre l'ADN exogène chez *V. aestuarianus francensis* (endonucléases, système de restriction-modification), qui pourront être recherchés dans le génomes des souches de cette sous-espèce (Jaskólska et al., 2022; Piel et al., 2022). (3) Enfin, les barrières sélectives pourraient agir : les bactéries recombinantes pourraient être contre-sélectionnées. Cette question de la recombinaison chez *V. aestuarianus francensis* implique de mieux comprendre la nature des interactions entre cette sous-espèce et le microbiote des huîtres. Pour cela, l'évolution de ce microbiote dans différents tissus pourrait être étudiée au cours de la pathogénèse par des approches de pathologie expérimentale et de métabarcoding. En effet, on peut supposer que *V. aestuarianus francensis* a des capacités de compétitions élevées face aux autres micro-organismes, ce qui lui permet de dominer le microbiote des huîtres au cours de la pathogénèse, mais limite également la possibilité de réaliser des échanges génétiques.

Selon le modèle de l'écotype de Cohan, les deux clades identifiés chez *V. aestuarianus francensis* pourraient correspondre à des populations écologiques différentes. En effet, la théorie écologique nous dit que les espèces ne peuvent coexister à long terme que si elles utilisent des ressources différentes ou prospèrent dans des conditions différentes (Chase & Leibold, 2009). Pour tester si les deux clades identifiés correspondent à des populations écologiques différentes, il reste à caractériser plus précisément les niches écologiques respectives de ces deux clades. Pour caractériser leur niche, leur micro-habitat (au sein de l'huître) doit être identifié, ce qui nécessite la mise au point d'outils diagnostics plus spécifiques à chaque sous-espèce. En effet, ceux utilisés actuellement (culture, qPCR) ne permettent de quantifier ni les sous-espèces de *V.*

*aestuarianus*, ni les clades au sein de ces sous-espèces. Nous pourrions alors tester l'hypothèse de micro-habitats différents comme chez *Staphylococcus pyogenes*, dont les deux écotypes montrent des tropismes tissulaires différents : la gorge pour l'écotype responsable de pharyngites et la peau pour l'écotype responsable de l'impetigo (Bessen, 2009).

Il est à noter que nos études visant à identifier des différences génétiques entre les deux clades n'ont pas été concluantes. Nous n'avons trouvé que quelques gènes spécifiques du clade B, dont les fonctions sont inconnues. Il s'agit probablement de gènes portés par un plasmide dont nous suspectons la présence parmi les souches de ce clade. En effet, des tests d'extraction avec un kit permettant de ne conserver que l'ADN plasmidique a permis d'observer une bande avec des souches du clade B (données non présentées). L'ADN issu de ces extractions a été séquencé. Des assemblages plasmidiques et l'étude du contenu en gènes seront réalisés ultérieurement.

Pour approfondir encore la caractérisation de la niche écologique de chaque clade, les études d'interactions avec leur hôte doivent être complétées. Jusqu'ici, les interactions entre *V. aestuarianus francensis* et les huîtres ont été étudiées en utilisant des souches du clade A. Les travaux réalisés avec la souche 01/032 ont montré qu'elle provoque une diminution de la capacité de phagocytose des hémocytes (cellules immunitaires des huîtres) des huîtres en même temps qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant la destruction de ces cellules (Labreuche, Lambert, et al., 2006b). Nous avons observé que la souche 12/016 se multiplie lorsqu'elle est injectée dans l'hémolymphe des huîtres et qu'à son contact, une réponse pro-inflammatoire, associée à une surexpression du gène codant la cytokine IL-17, est induite dans les hémocytes. Il serait intéressant d'étudier la pathogénèse et l'interaction avec les hémocytes en utilisant plus de souches du clade A et des souches du clade B, pour déterminer si les mécanismes identifiés sont conservés au sein de la sous-espèce ou spécifiques.

### Diversité d'habitats de *V. aestuarianus cardii*

La diversité génétique et phénotypique des souches appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* est plus importante que celle des souches appartenant à la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. En effet, nous avons identifié trois clades, présentant différents niveaux de virulence à l'égard des coques. Ces niveaux de virulence contrastés nous ont permis d'identifier par génomique comparative des gènes potentiellement impliqués dans la virulence (T1SS et T6SS). Leur fonction devra être validée grâce à l'étude de leur expression (RNAseq), et par invalidation fonctionnelle (mutagénèse). La dynamique évolutive dans la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* apparaît plus impactée par la recombinaison et les échanges génétiques que

celle de *V. aestuarianus francensis*. En effet, nos résultats suggèrent que les deux groupes virulents (HV) de *V. aestuarianus cardii* échangent du matériel génétique et partagent donc, au moins partiellement, leur niche écologique. Cette hypothèse est appuyée par la co-détection de ces deux clades à la même date et sur le même site (chapitre 3). Les modalités de coexistence de ces deux groupes sont encore inconnues. Les deux groupes peuvent coexister dans l'hôte et/ou dans son environnement. Il serait intéressant d'étudier les capacités d'échanges de matériel génétique entre ces souches et éventuelles recombinaisons dans différents environnements. Pour déterminer si des échanges génétiques peuvent avoir lieu entre les groupes identifiés dans la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, des suivis de prévalence des groupes lors de tests en mésocosme ou pendant un suivi sur le terrain, réalisés grâce à des approches de métabarcoding seront nécessaires.

### Dynamique des séquences d'insertion chez *V. aestuarianus*

Les facteurs influençant la dynamique des séquences d'insertion (IS) dans les génomes bactériens sont multiples. Des données génétiques et écologiques sont nécessaires pour identifier ces facteurs, et le mode de vie des bactéries en fait partie (Moran & Plague, 2004; Plague et al., 2008). Par exemple, un enrichissement en IS est observé dans les génomes des bactéries ayant récemment adopté un mode de vie restreint à l'hôte (Siguier et al., 2014). L'hypothèse de spécialisation de *V. aestuarianus francensis* peut donc expliquer l'expansion des IS observée dans les génomes des souches de cette sous-espèce. Ce processus évolutif correspond au « cliquet de Muller » (Muller, 1964), dans lequel, en l'absence de recombinaison, les mutations délétères ou faiblement délétères, et les insertions d'éléments transposables tels que les séquences d'insertion ne peuvent que s'accumuler dans une population isolée. Ce processus pourrait expliquer la perte de la capacité de *V. aestuarianus francensis* à se maintenir en dehors de son hôte. Selon cette hypothèse de spécialisation, une partie du génome de ces souches évolue de façon neutre : les gènes inutiles dans la niche. L'accumulation de mutations et / ou de séquences d'insertions a pu avoir lieu dans et à proximité de ces gènes (chapitre 2, article 2). La fonction des gènes perdus devrait être étudiée afin de déterminer leur rôle potentiel dans l'écologie de *V. aestuarianus* en dehors de son hôte.

Etonnamment, dans les génomes de *V. aestuarianus francensis*, qui ont été échantillonnés sur 20 années, les familles, les quantités et la localisation (données non présentées) des IS sont stables, suggérant que cette expansion est ancestrale. Il est observé que les taux de mutation ont tendance à diminuer dans les populations bien adaptées à leur environnement (Wielgoss et al., 2013). De la même manière, lors d'une évolution expérimentale menée sur des populations

d'*E. coli*, il a été observé qu'après une phase d'enrichissement spectaculaire en IS dans les génomes, une stabilisation avait lieu (Consuegra et al., 2021). Les auteurs avaient proposé que des mutations liées à des IS aient finalement réduit la tolérance des cellules à l'enrichissement en IS, limitant leur accumulation. De plus, des systèmes d'auto-régulation sont décrits pour certains IS, qui limitent l'activité de leur propre transposase (Sekine et al., 1999).

La gamme d'habitat de *V. aestuarianus cardii* semble moins restreinte que celle de *V. aestuarianus francensis* en été. Des bactéries appartenant à cette sous-espèce ont été isolées à partir d'échantillons de sédiment et de moules. Cela suggère que les souches de cette sous-espèce sont moins spécialisées envers leur hôte. Paradoxalement, nous avons observé un enrichissement en IS dans les génomes de quatre souches des groupes HV A et B (groupes les plus virulents) (Chapitre 2, article 2, Figure 4). Cette analyse nécessite de disposer de génomes assemblés à partir de données de séquençage en longs fragments et n'a pas pu être étendue à un plus grand nombre de génomes. Pour expliquer ce paradoxe, on peut envisager que les clades de la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* sont en cours de spécialisation. Cette hypothèse est difficile à tester actuellement mais une étude de la dynamique des IS et des pseudogènes ainsi que de la niche de *V. aestuarianus cardii* à plus long terme pourrait permettre de la vérifier, par exemple, en comparant des souches de 2012 et de 2021, issues d'un même clade.

## Rôles des facteurs anthropiques dans l'émergence et la propagation de lignées pathogènes chez *V. aestuarianus*

Dans le cadre de cette thèse, nous avons identifié l'un des événements ayant probablement favorisé l'émergence de lignées pathogènes pour les huîtres dans la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Il s'agit de l'acquisition d'un élément génétique mobile contenant des gènes codant des protéines impliquées dans l'export du cuivre. Comme nous l'avons vu, les huîtres sont capables de mobiliser le cuivre dissous dans leur hémolymphe en cas d'infection bactérienne ce qui rend la résistance au cuivre essentielle à la colonisation des tissus d'huîtres, comme montré chez l'espèce pathogène d'huître *V. tasmaniensis* (Vanhove et al., 2016). De fortes concentrations en cuivre environnemental auraient pu contribuer à la sélection du portage de ces gènes, et favoriser selon l'hypothèse de l'évolution fortuite (coincidental evolution), la capacité des *V. aestuarianus* à coloniser les huîtres. Cette hypothèse suggère que des facteurs de virulence résultent d'une adaptation à d'autres niches écologiques (Levin & Eden, 1990). En effet, l'enrichissement en cuivre dans les environnements littoraux en France peut être important localement, notamment en zones ostréicoles. Le cuivre est utilisé dans de nombreux domaines, générant une pollution en cuivre sur l'ensemble du littoral français (Figure 6). En raison de sa

persistance, les bivalves en général et de façon encore plus marquée les huîtres, qui filtrent l'eau de mer pour respirer et se nourrir, peuvent bioaccumuler cet élément métallique (Y. Liu et al., 2021). C'est ainsi que la concentration médiane en cuivre dans la chair des huîtres est de 206 mg/kg (<https://wwz.ifremer.fr/envlit/Outils-de-synthese/Les-contaminants-chimiques-dans-les-huîtres-et-les-moules-du-littoral-francais>) avec des teneurs particulièrement élevées dans le bassin d'Arcachon, une zone d'ostréiculture (quatre à six fois la médiane nationale). La concentration en cuivre dans cette zone a fortement augmenté entre 1979 et 1994, en raison, entre autres, de l'emploi des peintures anti-fouling sur les coques des bateaux (Claisse & Alzieu, 1993).

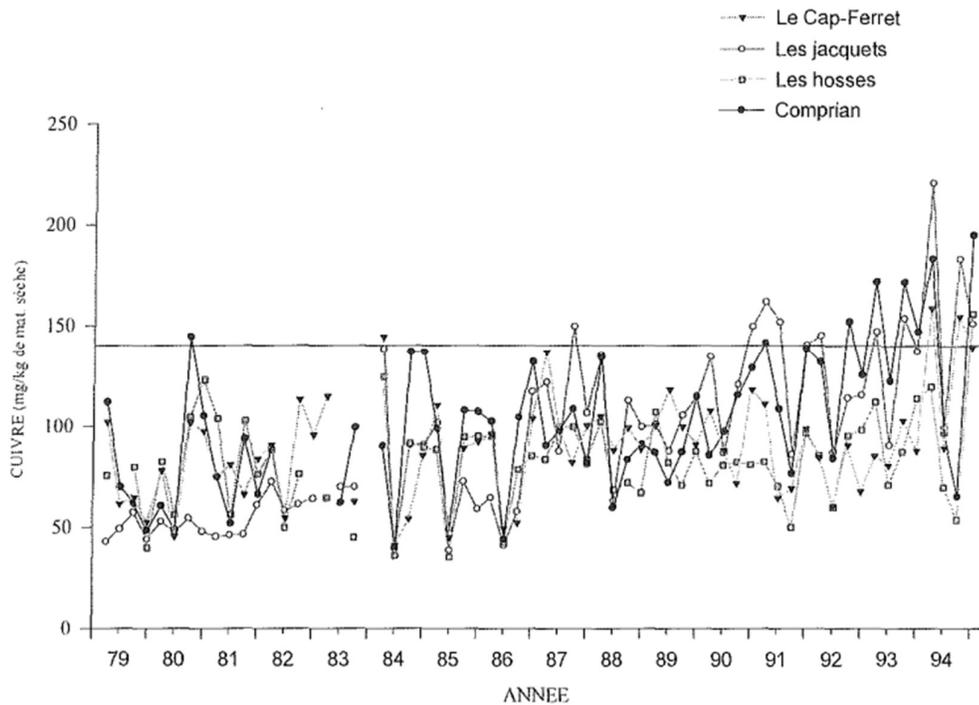


Figure 34 : Evolution de la teneur en cuivre moyenne dans plusieurs sites du bassin d'Arcachon entre 1979 et 1994. Les concentrations ont été mesurées dans la chair d'huîtres et sont exprimés en mg par kg de matière sèche (Cantin, 1996).

De même que le rejet d'eau contaminés par des antibiotiques dans l'environnement peut favoriser l'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques (Wellington et al., 2013), nous pouvons supposer que l'enrichissement du milieu en cuivre a favorisé l'émergence de lignées pathogènes résistantes au cuivre chez *V. aestuarianus*. Ce phénomène a pu être observé en agriculture en raison de l'utilisation massive de phytosanitaires à base de cuivre (I. Smith & British Crop Protection Council, 1985), particulièrement dans les genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas* (Richard et al., 2017).

Il est donc important de comprendre à quelle étape de son cycle *V. aestuarianus francensis* doit résister au cuivre. Nous pouvons supposer qu'une meilleure capacité à l'exporter de ces cellules, lui permet de demeurer plus longtemps dans un environnement riche en cuivre. En effet, des micro-organismes ne présentant pas cette résistance élevée, comme la souche 12/122 3T3, qui appartient à la sous-espèce *V. aestuarianus cardii*, sont tout de même capables de coloniser les huîtres, probablement de façon transitoire. Nous avons proposé que *V. aestuarianus francensis*, en tant qu'agent pathogène spécialiste, ne peut pas survivre longtemps en dehors de son hôte. Elle doit donc se maintenir dans son hôte, afin de pouvoir se multiplier lorsque les conditions le permettent, puis infecter un nouvel individu. Elle a donc besoin de résister au cuivre pendant toute la période non permissive au développement de la maladie. La résistance au cuivre fait probablement partie des caractéristiques de cette sous-espèce qui lui permettent de rester à l'état latent dans les huîtres. Pour tester cette hypothèse, la capacité de persistance à long terme dans les tissus des huîtres chez des souches mutées pour ces gènes pourrait être comparée à celle de souches sauvages.

Comme nous l'avons vu en introduction de cette thèse, l'ostréiculture a toujours été confrontée à des maladies infectieuses émergentes, en lien avec le modèle de production qui y est utilisé. Dans le cas de *V. aestuarianus francensis*, les facteurs d'émergence et de propagation détaillés en introduction pourraient avoir joué un rôle. En effet, nous savons que *V. aestuarianus francensis* se maintient peu de temps en dehors de son hôte (Lupo et al., 2020), une caractéristique cohérente avec notre hypothèse de spécialisation envers les huîtres (chapitre 2). Ainsi, le fait que l'ostréiculture soit pratiquée de manière intensive fournit à cet agent pathogène des conditions favorables à sa transmission inter-individuelle (fortes densités et faible diversité génétique d'hôtes) et donc à son maintien dans une population infectée. Concernant la dispersion géographique des lignées pathogènes d'huîtres, nous avons montré que deux lignées clonales de *V. aestuarianus francensis* circulent en Europe depuis au moins 20 ans. Or, les huîtres infectées par *V. aestuarianus francensis* peuvent être asymptomatique (Parizadeh et al., 2018). Encore une fois, cette caractéristique peut être liée à la spécialisation de cet agent pathogène. Ainsi, le transport d'animaux vivants, courant en ostréiculture (Legué & Prou, 2012; Pernet et al., 2016), est probablement à l'origine de la propagation à grande échelle de cette bactérie (C. J. Rodgers et al., 2011), des animaux asymptomatiques ayant pu être transportés au travers des régions et des pays. Les conséquences financières de *V. aestuarianus francensis* pour les ostréiculteurs sont dramatiques, avec une augmentation probable du coût de production d'une huître depuis son émergence et il conviendrait de prendre des mesures pour limiter cette propagation.

Au-delà des conséquences négatives de certaines pratiques culturelles sur la qualité sanitaire des élevages de *C. gigas*, on peut également supposer que sa culture intensive fait augmenter le risque infectieux pour *O. edulis* qui demeure une espèce largement sauvage (actuellement non cultivée) en France. En effet, les maladies émergentes peuvent également avoir de graves répercussions sur les populations sauvages (Harvell, 1999) et nous avons pu montrer que la souche 02/041 (*V. aestuarianus francensis*) peut infecter et tuer les huîtres plates lors d'expérimentations « écologiquement réalistes » (chapitre 1). De plus, des souches du clade B de *V. aestuarianus francensis* a été isolée de tissus d'huîtres plates pendant des mortalités en 2004 (souches 04/091 1T1 et 04/091 2T1, chapitre 2). Ainsi, l'ostréiculture intensive pourrait fournir une niche et un véhicule à ce pathogène. On peut supposer que *V. aestuarianus francensis* s'est répandue dans l'espace et s'est maintenue dans le temps grâce à l'ostréiculture intensive. En effet, ce que nous avons appris de cet agent pathogène montre que s'il n'y avait pas de transport d'animaux, sa faible capacité de survie dans l'environnement ne lui aurait pas permis de se transmettre de fermes ostréicoles en fermes ostréicoles, même sur des distances relativement courtes. Le problème est alors qu'une autre espèce de bivalve sensible à *V. aestuarianus francensis*, l'huître plate, vit à proximité des fermes ostréicoles ou des huîtres creuses échappées. Elle est alors soumise au risque d'infection par *V. aestuarianus francensis* sur l'ensemble de son aire de répartition. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'identifier des gisements d'huîtres plates situés à proximité de fermes ostréicoles et d'autres plus éloignés, puis de comparer la prévalence en *V. aestuarianus francensis* entre ces deux types de gisements.

### Les souches non-cliniques, réservoir de lignées pathogènes ?

Les différents arbres phylogénétiques de l'espèce *V. aestuarianus* présentés dans cette thèse ont permis d'étudier les relations de parenté entre les souches non cliniques et les souches des sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii*. Les souches non cliniques avaient initialement été regroupées dans une autre sous-espèce : *V. aestuarianus aestuarianus* (Garcia et al., 2021; Garnier et al., 2008). Mais la description de cette sous-espèce reposait plus sur des critères phénotypiques que génétiques. Ainsi, un arbre phylogénétique réalisé avec des souches de tous ces groupes ne soutient pas l'existence de cette sous-espèce comme un groupe monophylétique qui aurait émergé au même titre que les sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii*. En effet, dans une phylogénie, basée seulement sur les régions génomiques n'ayant pas été impacté dans des événements de recombinaison et enracinée avec une souche de l'espèce *V. anguillarum* comme outgroup (Figure 35), les souches non cliniques semblent constituer une population basale à partir de laquelle émergent les deux

sous-espèces pathogènes de bivalves. La sous-espèce *V. aestuarianus francensis* (en gris clair) apparaît proche de la souche U36 isolée en Italie en 2012, avec laquelle elle partage un ancêtre commun. La sous-espèce *V. aestuarianus cardii* (en gris foncé) est quant à elle plus proche de la souche U8, également isolée en Italie en 2012. De la même manière, les souches non virulentes de la sous-espèces *V. aestuarianus cardii* forment une population de fond, de laquelle les lignées pathogènes ont émergé.

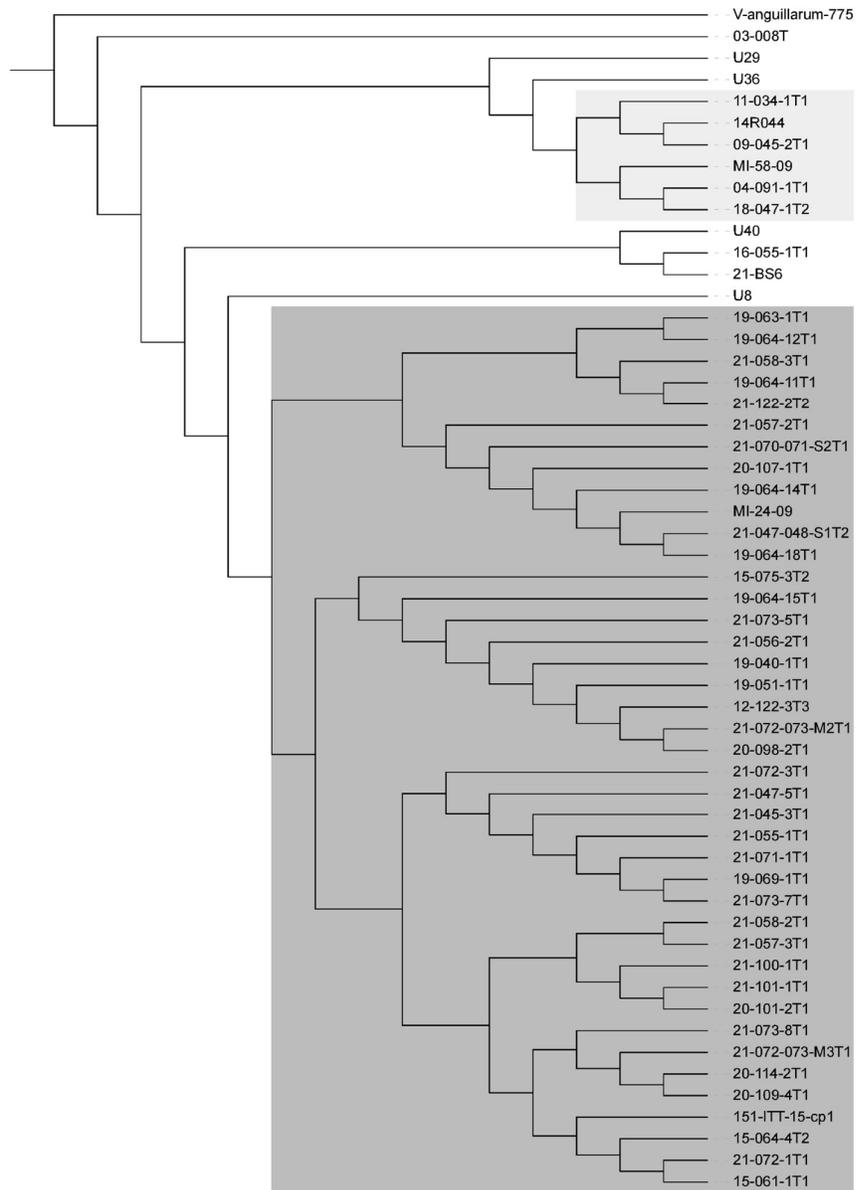


Figure 35 : Arbre phylogénétique de l'espèce *V. aestuarianus* calculé à partir de l'alignement des régions génomiques n'ayant pas été impactées par des événements de recombinaison. La souche *V. anguillarum* 775 a été utilisée comme outgroup pour enraciner l'arbre. La sous-espèce *V. aestuarianus francensis* est colorée en gris clair, la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* est colorée en gris foncé. Les souches non cliniques ne sont pas colorées.

Cette structure de population évoque une structure épidémique, comme définie par John Maynard Smith (J. M. Smith et al., 2000). Dans ce cas, la population de fond serait formée par des souches non cliniques, qui ont des préférences écologiques moins strictes que celles des souches cliniques. Les sous-espèces identifiées seraient des complexes clonaux en cours de spéciation, échangeant pas ou peu avec les autres populations bactériennes. Pour valider cette hypothèse, des connaissances supplémentaires sur les souches non cliniques sont nécessaires. Il serait intéressant d'utiliser des données de séquençage obtenues à partir d'échantillons prélevés en zone littorale, quel que soit le compartiment échantillonné (colonne d'eau, sédiment, faune sauvage, faune cultivée), puis de rechercher des séquences pouvant appartenir à *V. aestuarianus*. Cela permettrait de compléter les données génétiques, qui sont pour le moment, principalement obtenues pendant des épisodes de mortalité d'huîtres ou de coques, et donc biaisées au profit des sous-espèces *V. aestuarianus francensis* et *V. aestuarianus cardii*. En tant que réservoir de lignées pathogènes, les souches non cliniques pourraient avoir un potentiel adaptatif plus élevé que celui des souches pathogènes. Celui-ci pourrait être mesuré en évaluant la compétence de ces bactéries et en la comparant à celle des lignées pathogènes. De même, l'étude de leur capacité d'adaptation à un stress pourrait nous renseigner sur leur potentiel adaptatif.

### Lutter contre l'émergence et la propagation de maladies infectieuses en aquaculture : un défi dans les conditions d'ostréiculture actuelles

Les enjeux pour l'avenir sont de comprendre les risques infectieux liés à l'évolution des maladies afin de tenter de les prévenir. Notre objectif, dans le cadre de cette thèse, était donc d'apporter des connaissances sur des agents pathogènes qui impactent la conchyliculture, dans le but d'établir des mesures préventives ou des stratégies pour un meilleur contrôle et une meilleure gestion de la maladie.

A l'heure actuelle, la seule solution apportée face aux maladies qui touchent les huîtres est la sélection d'individus résistants aux maladies. Toutefois, les études réalisées par Azéma et ses collaborateurs montrent les limites de cette stratégie face à *V. aestuarianus francensis*. En effet, la résistance des huîtres à cet agent pathogène est peu héritable (Azéma et al., 2017). De plus, jusqu'ici, les résistances au virus OsHV-1, agent causal du POMS (Pacific Oyster Mortality Syndrome) et à *V. aestuarianus francensis* ne semblent pas pouvoir être concomitantes. Il semble donc illusoire de générer des familles d'huîtres résistantes aux deux maladies les plus prévalentes en élevage. De plus, une nouvelle réduction de la diversité génétique de la population

d'hôte pourrait être problématique en cas d'émergence d'un nouvel agent pathogène auquel ces individus, sélectionnés pour leur résistance à des agents pathogènes connus, seraient sensibles.

Une solution alternative, consisterait à développer des outils diagnostics et de surveillance plus sensibles, afin de mettre en évidence la présence d'individus porteurs asymptomatiques dans une population d'huîtres. Une pratique utilisée en laboratoire est le « choc chaud » qui consiste à placer les huîtres dans une eau à 26°C, provoquant la multiplication de *V. aestuarianus* et le développement de la maladie. Couplé à une détection par qPCR, le choc chaud serait une solution relativement simple à mettre en œuvre pour une meilleure détection de l'agent pathogène. De plus, la MPN-qPCR (MPN : most probable number), utilisée dans le cadre du suivi de *V. aestuarianus cardii* en Baie de Somme a également permis de détecter la bactérie en faible concentration dans les tissus des coques alors que la qPCR standard ne le permettait pas. Cette technique, qui met en œuvre un pré-enrichissement des populations bactériennes par culture en amont de la détection par qPCR, est couramment utilisée pour la détection des *Vibrio* (A. C. Wright et al., 2007).

Les analyses des données génétiques et écologiques que nous avons obtenues n'ont pas permis d'identifier ou de formuler de nouvelles hypothèses quant aux facteurs anthropiques et environnementaux qui auraient pu favoriser l'émergence de lignées pathogènes chez *V. aestuarianus cardii*. Cependant, que ce soit pour *V. aestuarianus francensis* ou *V. aestuarianus cardii*, la température gouverne l'apparition des maladies (chapitre 2 et 3). Les mortalités, quelle que soit la sous-espèce considérée, ont lieu en été. En effet, la température influence le taux de reproduction de base des agents pathogènes ( $R_0$ ). Un autre facteur, la salinité, influence le développement de la maladie liée à *V. aestuarianus francensis* avec une corrélation inverse entre les mortalités observées et la salinité (chapitre 2). Il convient donc d'ores et déjà de modéliser le risque épizootique dans le contexte global du réchauffement des eaux de surface. Afin de prédire si les changements climatiques mondiaux vont influencer la répartition spatiale et temporelle des lignées pathogènes de *V. aestuarianus*, les autres paramètres environnementaux influençant le développement des maladies doivent être identifiés, participant ainsi à mieux définir la niche de chaque écotype. Ces paramètres pourront ainsi alimenter des modèles incluant des données hydrodynamiques et climatiques, visant à estimer le risque spatial et temporel de la maladie (diffusion des agents pathogènes ou extension de la fenêtre de permissivité).



## Références bibliographiques

- Achtman, M., & Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 431-440.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1872>
- Alam, A., LaRocque, R. C., Harris, J. B., Vanderspurt, C., Ryan, E. T., Qadri, F., & Calderwood, S. B. (2005). Hyperinfectivity of Human-Passaged *Vibrio cholerae* Can Be Modeled by Growth in the Infant Mouse. *Infection and Immunity*, 73(10), 6674-6679.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6674-6679.2005>
- Ali, A., Chen, Y., Johnson, J. A., Redden, E., Mayette, Y., Rashid, M. H., Stine, O. C., & Morris, J. G. (2011). Recent Clonal Origin of Cholera in Haiti. *Emerging Infectious Diseases*, 17(4), 699-701. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101973>
- Alizon, S. (2006). *Évolution de la virulence des parasites : Apports des modèles emboîtés* [Thèse de doctorat]. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).
- Almagro-Moreno, S., & Taylor, R. K. (2013). *Cholera : Environmental Reservoirs and Impact on Disease Transmission*. 12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0003-2012>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166-169.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants : Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(10), 535-544.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
- Anderson, R. M., & May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85(2), 411-426. <https://doi.org/10.1017/S0031182000055360>
- Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2010). *FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data*.
- Ansari, T. M., Marr, I. L., & Tariq, N. (2003). Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review. *Journal of Applied Sciences*, 4(1), 1-20.  
<https://doi.org/10.3923/jas.2004.1.20>
- Appleyard, S. A., & Ward, R. D. (2006). Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 254(1-4), 148-159.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.017>
- Armelagos, G. J., Goodman, A. H., & Jacobs, K. H. (1991). The origins of agriculture : Population growth during a period of declining health. *Population and Environment*, 13(1), 9-22. <https://doi.org/10.1007/BF01256568>
- Arthur, R., Phillips, M. J., Subasinghe, R. P., Reantaso, M. B., & MacRae, I. H. (2002). Primary aquatic animal health care in rural, small-scale, aquaculture development. *FAO Fisheries Technical Paper (FAO)*.
- Azandégbé, A., Garnier, M., Andrieux-Loyer, F., Kérouel, R., Philippon, X., & Nicolas, J. (2010). Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, 91(3), 213-221. <https://doi.org/10.3354/dao02253>
- Azéma, P., Lamy, J.-B., Boudry, P., Renault, T., Travers, M.-A., & Dégremont, L. (2017). Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the

- Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0297-2>
- Azéma, P., Travers, M.-A., Benabdelmouna, A., & Dégremont, L. (2016). Single or dual experimental infections with *Vibrio aestuarianus* and OsHV-1 in diploid and triploid *Crassostrea gigas* at the spat, juvenile and adult stages. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.002>
- Azéma, P., Travers, M.-A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., & Dégremont, L. (2015). Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Veterinary Research*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0282-0>
- Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., De Lorgeril, J., Garnier, J., & Romestand, B. (2004). Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates : The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews*, 198(1), 149-168. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00115.x>
- Bachère, E., Rosa, R. D., Schmitt, P., Poirier, A. C., Merou, N., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2015). The new insights into the oyster antimicrobial defense : Cellular, molecular and genetic view. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040>
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. Infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Taylor, N. G. H., Hartnell, R., Siitonen, A., & Martinez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3(1), 73-77. <https://doi.org/10.1038/nclimate1628>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes : A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., & Travers, M.-A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011>
- Barrett, R., Kuzawa, C. W., McDade, T., & Armelagos, G. J. (1998). Emerging and re-emerging infectious diseases : The Third Epidemiologic Transition. *Annual Review of Anthropology*, 27(1), 247-271. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.27.1.247>
- Bass, D., Stentiford, G. D., Wang, H.-C., Koskella, B., & Tyler, C. R. (2019). The Pathobiome in Animal and Plant Diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(11), 996-1008. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Batchelor, E., Walthers, D., Kenney, L. J., & Goulian, M. (2005). The *Escherichia coli* CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5723-5731. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5723-5731.2005>
- Baudart, J., & Paniel, N. (2014). *Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques*. 12. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(14\)72362-7](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(14)72362-7)
- Bebber, D. P. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, 3, 4. <https://doi.org/10.1038/nclimate1990>

- Bellamy, E., Lefebvre, A., Mahe, K., & de Rafelis, M. (2009). *Croissance de la coque (Cerastoderma edule) en baie de Somme : Morphométrie et Marquage*.
- Bender, M. A., Knutson, T. R., Tuleya, R. E., Sirutis, J. J., Vecchi, G. A., Garner, S. T., & Held, I. M. (2010). Modeled Impact of Anthropogenic Warming on the Frequency of Intense Atlantic Hurricanes. *Science*, 327(5964), 454-458. <https://doi.org/10.1126/science.1180568>
- Béné, C., Barange, M., Subasinghe, R., Pinstrop-Andersen, P., Merino, G., Hemre, G.-I., & Williams, M. (2015). Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. *Food Security*, 7(2), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0427-z>
- Bergstrom, C. T., McElhany, P., & Real, L. A. (1999). Transmission bottlenecks as determinants of virulence in rapidly evolving pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 5095-5100. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5095>
- Binder, S., Levitt, A. M., Sacks, J. J., & Hughes, J. M. (1999). Emerging Infectious Diseases : Public Health Issues for the 21st Century. *Science*, 284(5418), 1311-1313. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1311>
- Bobay, L.-M., & Ochman, H. (2017). The Evolution of Bacterial Genome Architecture. *Frontiers in Genetics*, 8, 72. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00072>
- Botelho, J., & Schulenburg, H. (2020). The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends in Microbiology*, S0966842X20301372. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.011>
- Brooks, D. R., Hoberg, E. P., Boeger, W. A., & Trivellone, V. (2022). Emerging infectious disease : An underappreciated area of strategic concern for food security. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 254-267. <https://doi.org/10.1111/tbed.14009>
- Brown, S. P., Cornforth, D. M., & Mideo, N. (2012). Evolution of virulence in opportunistic pathogens : Generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*, 20(7), 336-342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>
- Brüssow, H. (2007). Bacteria between protists and phages : From antipredation strategies to the evolution of pathogenicity: Bacteria between protists and phages. *Molecular Microbiology*, 65(3), 583-589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05826.x>
- Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivresse, S., Alunno-Bruscia, M., Polz, M. F., & Le Roux, F. (2017). *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal*, 11(4), 1043-1052. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.162>
- Bruto, M., Labreuche, Y., James, A., Piel, D., Chenivresse, S., Petton, B., Polz, M. F., & Le Roux, F. (2018). Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *The ISME Journal*, 12(12), 2954-2966. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0245-3>
- Burge, C. A., Mark Eakin, C., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., Petes, L. E., Prager, K. C., Weil, E., Willis, B. L., Ford, S. E., & Harvell, C. D. (2014). Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases : Implications for Management and Society. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 249-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>
- Butler, S. M., Nelson, E. J., Chowdhury, N., Faruque, S. M., Calderwood, S. B., & Camilli, A. (2006). Cholera stool bacteria repress chemotaxis to increase infectivity. *Molecular Microbiology*, 60(2), 417-426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05096.x>

- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture : A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1137-1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- Cantin, C. (1996). *Contamination du milieu marin par les micropolluants (résultats du RNO de 1979 à 1994). 2 : Le Bassin d'Arcachon.*
- Carballal, M. J., Barber, B. J., Iglesias, D., & Villalba, A. (2015). Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 83-106. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.004>
- Carroll, A. C., & Wong, A. (2018). Plasmid persistence : Costs, benefits, and the plasmid paradox. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(5), 293-304. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0609>
- Castillo, D., Christiansen, R. H., Dalsgaard, I., Madsen, L., & Middelboe, M. (2015). Bacteriophage resistance mechanisms in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* : Linking genomic mutations to changes in bacterial virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 1157-1167. <https://doi.org/10.1128/AEM.03699-14>
- Castillo, N., Saavedra, L. M., Vargas, C. A., Gallardo-Escárate, C., & Détrée, C. (2017). Ocean acidification and pathogen exposure modulate the immune response of the edible mussel *Mytilus chilensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 70, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.047>
- Caugant, D. A., Frøholm, L. O., Bøvre, K., Holten, E., Frøsch, C. E., Mocca, L. F., Zollinger, W. D., & Selander, R. K. (1986). Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13), 4927-4931. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4927>
- Chaloner, T. M., Gurr, S. J., & Bebbler, D. P. (2021). Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nature Climate Change*, 11(8), 710-715. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01104-8>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp : An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- Claisse, D., & Alzieu, C. (1993). Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Marine Pollution Bulletin*, 26(7), 395-397. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90188-P](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90188-P)
- Cleaveland, S., Laurenson, M. K., & Taylor, L. H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals : Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 991-999. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0889>
- Coffin, M. R. S., Clements, J. C., Comeau, L. A., Guyondet, T., Maillet, M., Steeves, L., Winterburn, K., Babarro, J. M. F., Mallet, M. A., Haché, R., Poirier, L. A., Deb, S., & Filgueira, R. (2021). The killer within : Endogenous bacteria accelerate oyster mortality during sustained anoxia. *Limnology and Oceanography*, 66(7), 2885-2900. <https://doi.org/10.1002/lno.11798>
- Cohan, F. M. (1994). Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(5), 175-180. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90081-7)

- Cohan, F. M. (2002a). Sexual isolation and speciation in bacteria. In W. J. Etges & M. A. F. Noor (Éds.), *Genetics of Mate Choice : From Sexual Selection to Sexual Isolation* (Vol. 9, p. 359-370). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0265-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0265-3_17)
- Cohan, F. M. (2002b). What are Bacterial Species? *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 457-487. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160634>
- Cohan, F. M. (2006). Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1985-1996. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1918>
- Cohan, F. M., & Perry, E. B. (2007). A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*, 17(10), R373-R386. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.032>
- Colangeli, R., Arcus, V. L., Cursons, R. T., Ruthe, A., Karalus, N., Coley, K., Manning, S. D., Kim, S., Marchiano, E., & Alland, D. (2014). Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans. *PLoS ONE*, 9(3), e91024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091024>
- Collier, R. J., & Mekalanos, J. J. (1980). ADP-ribosylating exotoxins. *Multifunctional proteins*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 261-291.
- Comps, M., & Duthoit, J. (1979). *Infections virales chez les huîtres*.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008). Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/619832>
- Consuegra, J., Gaffé, J., Lenski, R. E., Hindré, T., Barrick, J. E., Tenailon, O., & Schneider, D. (2021). Insertion-sequence-mediated mutations both promote and constrain evolvability during a long-term experiment with bacteria. *Nature Communications*, 12(1), 980. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21210-7>
- Cooley, S. R., Lucey, N., Kite-Powell, H., & Doney, S. C. (2012). Nutrition and income from molluscs today imply vulnerability to ocean acidification tomorrow : Global mollusc harvests and ocean acidification. *Fish and Fisheries*, 13(2), 182-215. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2011.00424.x>
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legroumellec, M., & Grimont, P. (1998). Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164(1-4), 297-309. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00195-1)
- Crawford, D. C., Bhangale, T., Li, N., Hellenthal, G., Rieder, M. J., Nickerson, D. A., & Stephens, M. (2004). Evidence for substantial fine-scale variation in recombination rates across the human genome. *Nature Genetics*, 36(7), 700-706. <https://doi.org/10.1038/ng1376>
- Croucher, N. J., Mostowy, R., Wymant, C., Turner, P., Bentley, S. D., & Fraser, C. (2016). Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. *PLoS Biology*, 14(3), e1002394. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002394>
- Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*, 43(3), e15-e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife—Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287(5452), 443-449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

- Davidson, S. K., Koropatnick, T. A., Kossmehl, R., Sycuro, L., & McFall-Ngai, M. J. (2004). NO means « yes » in the squid-vibrio symbiosis : Nitric oxide (NO) during the initial stages of a beneficial association. *Cellular Microbiology*, 6(12), 1139-1151. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00429.x>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davis, B. (2003). Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 35-42. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00005-X)
- De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S., & Boudry, P. (2011). Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2), 179-191. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.003>
- Debnath, I., Norton, J. P., Barber, A. E., Ott, E. M., Dhakal, B. K., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2013). The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 81(5), 1450-1459. <https://doi.org/10.1128/IAI.01213-12>
- Debré, P. (2020). Épidémies : Leçons d'Histoire. *médecine/sciences*, 36(6-7), 642-646. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020111>
- de Jong, M. F., & Alto, N. M. (2018). Cooperative Immune Suppression by *Escherichia coli* and Shigella Effector Proteins. *Infection and Immunity*, 86(4), e00560-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00560-17>
- Denamur, E., & Picard, B. (1995). De la génétique des populations bactériennes à l'épidémiologie des maladies infectieuses. *médecine/sciences*, 11(10), 1399. <https://doi.org/10.4267/10608/2321>
- Desprez, M., Rybarczyk, H., Wilson, J. G., Ducrotoy, J. P., Sueur, F., Olivesi, R., & Elkaim, B. (1992). Biological impact of eutrophication in the bay of somme and the induction and impact of anoxia. *Netherlands Journal of Sea Research*, 30, 149-159. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(92\)90054-I](https://doi.org/10.1016/0077-7579(92)90054-I)
- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (1995). *Marine benthic hypoxia : A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna*. 60.
- Didelot, X., & Falush, D. (2007). Inference of Bacterial Microevolution Using Multilocus Sequence Data. *Genetics*, 175(3), 1251-1266. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.063305>
- Didelot, X., Pang, B., Zhou, Z., McCann, A., Ni, P., Li, D., Achtman, M., & Kan, B. (2015). The Role of China in the Global Spread of the Current Cholera Pandemic. *PLOS Genetics*, 11(3), e1005072. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005072>
- Didelot, X., & Wilson, D. J. (2015). ClonalFrameML : Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes. *PLOS Computational Biology*, 11(2), e1004041. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004041>
- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J., & Scharsack, J. P. (2014). Heat and immunity : An experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Animal Ecology*, 83(4), 744-757. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12175>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR : Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2016). Ocean acidification : The other CO<sub>2</sub> problem. *Wash. J. Env'tl. L. & Pol'y*, 6, 213.
- Dos Vultos, T., Mestre, O., Rauzier, J., Golec, M., Rastogi, N., Rasolofo, V., Tonjum, T., Sola, C., Matic, I., & Gicquel, B. (2008). Evolution and Diversity of Clonal Bacteria : The Paradigm of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, 3(2), e1538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001538>
- Drummond, A. J., Pybus, O. G., Rambaut, A., Forsberg, R., & Rodrigo, A. G. (2003). Measurably evolving populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(9), 481-488. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00216-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00216-7)
- Ducrotoy, J., Rybarczyk, H., Souprayen, J., Bachelet, G., Beukema, J., Desprez, M., Dörjes, J., Essink, K., Guillou, J., & Michaelis, H. (1991). A comparison of the population dynamics of the cockle (*Cerastoderma edule*) in north-western Europe. *Estuaries and coasts: spatial and temporal intercomparisons*, 173-184.
- Dufour, B. (2017). Les causes de l'émergence des maladies infectieuses. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 201(7-9), 1189-1195. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30410-8](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30410-8)
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Nielsen, S. S., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Gortazar Schmidt, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. A., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H. C., Spoolder, H., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., ... Alvarez, J. (2021). Assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials : Cattle. *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6955>
- Eisenstein, M. (2021). Overlooked and underfunded : Neglected diseases exert a toll. *Nature*, 598(7882), S20-S22. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02912-w>
- Engering, A., Hogerwerf, L., & Slingenbergh, J. (2013). Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes & Infections*, 2(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.5>
- Enright, M. C., Spratt, B. G., Kalia, A., Cross, J. H., & Bessen, D. E. (2001). Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus pyogenes* and the Relationships between *emm* Type and Clone. *Infection and Immunity*, 69(4), 2416-2427. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2416-2427.2001>
- Epstein, P. (1993). Marine ecosystems. *The Lancet*, 342(8881), 1216-1219. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92191-U](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92191-U)
- European Environment Agency. (2019). *Contaminants in Europe's seas : Moving towards a clean, non toxic marine environment*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2800/511375>
- Evans, A. S. (1976). Causation and Disease : The Henle-Koch Postulates Revisited'. *CAUSATION AND DISEASE*, 21.
- Fabioux, C. (2004). *Origine et développement des cellules germinales chez l'huître Crassostrea gigas : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion* [Thèse de doctorat]. Université de Bretagne occidentale.
- Falush, D., Kraft, C., Taylor, N. S., Correa, P., Fox, J. G., Achtman, M., & Suerbaum, S. (2001). Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori* : Estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15056-15061. <https://doi.org/10.1073/pnas.251396098>
- FAO Fisheries and Aquaculture Department. (2010). *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture—2010*.

- FAO Fisheries and Aquaculture Department. (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture—2012*. 230.
- Feil, E. J., & Spratt, B. G. (2001). Recombination and the Population Structures of Bacterial Pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 561-590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.561>
- Finlay, B. J., & Esteban, G. F. (2001). Exploring Leeuwenhoek's legacy : The abundance and diversity of protozoa. *International Microbiology*, 4(3), 125-133. <https://doi.org/10.1007/s10123-001-0027-y>
- Fisher, R. A. (1958). *The genetical theory of natural selection*. <https://books.google.fr/books?id=WPfvAgAAQBAJ>
- Fleming, A. (1929). *On the antibacterial action of cultures of penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. 13.
- Foulon, V., Le Roux, F., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., & Paul-Pont, I. (2016). Colonization of Polystyrene Microparticles by *Vibrio crassostreae* : Light and Electron Microscopic Investigation. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 10988-10996. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02720>
- François, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Lupo, C., Travers, M.-A., Pépin, J.-F., Hatt, P.-J., Arzul, I., Omnes, E., Tourbiez, D., Faury, N., Haffner, P., Huchet, E., Dubreuil, C., Chollet, B., & Renault, T. (2013). *Bilan 2012 du réseau Repamo—Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins*. 65.
- Fredericks, D. N., & Relman, D. A. (1996). Sequence-based identification of microbial pathogens : A reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1), 18-33. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.1.18>
- Froehlich, H. E., Runge, C. A., Gentry, R. R., Gaines, S. D., & Halpern, B. S. (2018). Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 5295-5300. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801692115>
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., & Gilbert, C. (2015). Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *Journal of bacteriology*, 197(3), 563-571. <https://doi.org/10.1128/JB.02164-14>
- Fuhrman, J. A., & Noble, R. T. (1995). Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, 40(7), 1236-1242. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1236>
- Gam, M., de Montaudouin, X., & Bazairi, H. (2010). Population dynamics and secondary production of the cockle *Cerastoderma edule* : A comparison between Merja Zerga (Moroccan Atlantic Coast) and Arcachon Bay (French Atlantic Coast). *Journal of Sea Research*, 63(3-4), 191-201. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.01.003>
- Garcia, C., Mesnil, A., Tourbiez, D., Moussa, M., Dubreuil, C., Gonçalves de Sa, A., Chollet, B., Godfrin, Y., Dégremont, L., Serpin, D., & Travers, M.-A. (2021). *Vibrio aestuarianus* subsp. *Cardii* subsp. Nov., pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *Aestuarianus* subsp. Nov. And *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis* subsp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(2). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004654>
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., & Nicolas, J.-L. (2007). Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*, 53(2), 187-196. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9>

- Garnier, M., Labreuche, Y., & Nicolas, J.-L. (2008). Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis* subsp. Nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003>
- Gavin, H. E., & Satchell, K. J. F. (2015). MARTX toxins as effector delivery platforms. *Pathogens and Disease*, ftv092. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv092>
- Ghose, C. (2013). *Clostridium difficile* infection in the twenty-first century. *Emerging Microbes & Infections*, 2(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.62>
- Gill, D. M., & Meren, R. (1978). ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin : Basis of the activation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(7), 3050-3054. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.7.3050>
- Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., Decker, S. de, Saulnier, D., & Roux, F. le. (2006). Molecular epidemiology of *Vibrio nigripulchritudo*, a pathogen of cultured penaeid shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) in New Caledonia. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(7), 570-580. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.005>
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0>
- Gotoh, K., Kodama, T., Hiyoshi, H., Izutsu, K., Park, K.-S., Dryselius, R., Akeda, Y., Honda, T., & Iida, T. (2010). Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants. *PLoS ONE*, 5(10), e13365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013365>
- Goudenège, D., Labreuche, Y., Krin, E., Ansquer, D., Mangenot, S., Calteau, A., Médigue, C., Mazel, D., Polz, M. F., & Le Roux, F. (2013). Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. *The ISME Journal*, 7(10), 1985-1996. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.90>
- Goudenège, D., Travers, M. A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., Tourbiez, D., Mangenot, S., Calteau, A., Mazel, D., Nicolas, J. L., Jacq, A., & Le roux, F. (2015). A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters : Comparative genomics of *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4189-4199. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12699>
- Gouy, M., & Gautier, C. (1982). Codon usage in bacteria : Correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research*, 10(22), 7055-7074. <https://doi.org/10.1093/nar/10.22.7055>
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*, 27(2), 113-159. <https://doi.org/10.1017/S0022172400031879>
- Grimes, D. J., Johnson, C. N., Dillon, K. S., Flowers, A. R., III, N. F. N., & Berutti, T. (2009). What Genomic Sequence Information Has Revealed about *Vibrio* Ecology in the Ocean—A Review. *Microbial Ecology*, 58(3), 447-460.
- Guérin-Faubleé, V., Rosso, L., Vigneulle, M., & Flandrois, J.-P. (1995). The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* -related organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 621-629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03108.x>
- Haldane, J. B. (1932). *The causes of evolution* (Vol. 5). Princeton University Press.
- Harper, K., & Armelagos, G. (2010). The Changing Disease-Scape in the Third Epidemiological Transition. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(2), 675-697. <https://doi.org/10.3390/ijerph7020675>

- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *The Lancet*, 379(9835), 2466-2476. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60436-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60436-X)
- Harrison, E., & Brockhurst, M. A. (2017). Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage : What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger. *BioEssays*, 39(12), 1700112. <https://doi.org/10.1002/bies.201700112>
- Harvell, C. D. (1999). Emerging Marine Diseases—Climate Links and Anthropogenic Factors. *Science*, 285(5433), 1505-1510. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1505>
- Harvell, C. D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *Science*, 296(5576), 2158-2162. <https://doi.org/10.1126/science.1063699>
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D., Lind, E., & Häse, C. (2009). Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85, 123-131. <https://doi.org/10.3354/dao02070>
- Hauck, S., & Maiden, M. C. (2018). Clonally evolving pathogenic bacteria. In *Molecular mechanisms of microbial evolution* (p. 307-325). Springer.
- Haure, J., Papin, M., Palvadeau, H., Sauriau, P.-G., Nourry, M., Penisson, C., Dupuy, B., & Martin, J.-L. (2004). *Estimation du stock de coques (Cerastoderma edule) élevé dans le Traict du Croisic en 2001*.
- Hazen, T. H., Pan, L., Gu, J.-D., & Sobecky, P. A. (2010). The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of *Vibrios* : *Vibrio* HGT. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 485-499. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00937.x>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition : Surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(1), 15-25. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Coelho, L. P., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2017). Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2115-2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., von Mering, C., & Bork, P. (2016). eggNOG 4.5 : A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D286-D293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1248>
- Hutchinson, G. E. (1957). Concluding Remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22(0), 415-427. <https://doi.org/10.1101/SQB.1957.022.01.039>
- Hutchinson, G. E. (1968). When are species necessary? *Population biology and evolution*, 177-186.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., & Boudry, P. (2010). Reproductive effort of Pacific oysters : A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture*, 304(1-4), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.022>
- Huxley, J. (1942). Evolution. The modern synthesis. *Evolution. The Modern Synthesis*.
- Ikemura, T. (1985). Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040335>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>

- James, A. (2018). *Ecology, evolution and virulence of environmental vibrios* [Thèse de doctorat]. Sorbonne.
- Jaskólska, M., Adams, D. W., & Blokesch, M. (2022). Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae*. *Nature*, *604*(7905), 323-329. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04546-y>
- Jiang, S. C., & Fu, W. (2001). Seasonal Abundance and Distribution of *Vibrio cholerae* in Coastal Waters Quantified by a 16S-23S Intergenic Spacer Probe. *Microbial Ecology*, *42*(4), 540-548. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0029-5>
- Jiang, S., Jia, Z., Xin, L., Sun, Y., Zhang, R., Wang, W., Wang, L., & Song, L. (2016). The cytochemical and ultrastructural characteristics of phagocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, *55*, 490-498. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.024>
- Joly, S., Bryant, D., & Lockhart, P. J. (2015). Flexible methods for estimating genetic distances from single nucleotide polymorphisms. *Methods in Ecology and Evolution*, *6*(8), 938-948. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12343>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990-993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jones, M. K., & Oliver, J. D. (2009). *Vibrio vulnificus* : Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, *77*(5), 1723-1733. <https://doi.org/10.1128/IAI.01046-08>
- Kater, B., Geurts van Kessel, A., & Baars, J. (2006). Distribution of cockles *Cerastoderma edule* in the Eastern Scheldt : Habitat mapping with abiotic variables. *Marine Ecology Progress Series*, *318*, 221-227. <https://doi.org/10.3354/meps318221>
- Kennish, M. J. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental conservation*, *29*(1), 78-107.
- Kiaune, L., & Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal Copper (I) Oxide : Environmental Fate and Aquatic Toxicity. In D. M. Whitacre (Éd.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213* (Vol. 213, p. 1-26). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_1)
- Kim, Y., Lee, S., Hwang, I., & Yoon, K. (2012). Effect of Temperature on Growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Flounder, Salmon Sashimi and Oyster Meat. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *9*(12), 4662-4675. <https://doi.org/10.3390/ijerph9124662>
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (1<sup>re</sup> éd.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623486>
- Koeppel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., Rooney, A. P., Brambilla, E., Connor, N., Ratcliff, R. M., Nevo, E., & Cohan, F. M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity : A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(7), 2504-2509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712205105>
- Kohn, G. C. (2007). *Encyclopedia of plague and pestilence : From ancient times to the present*. Infobase Publishing.
- Kuo, C.-H., Moran, N. A., & Ochman, H. (2009). The consequences of genetic drift for bacterial genome complexity. *Genome Research*, *19*(8), 1450-1454. <https://doi.org/10.1101/gr.091785.109>
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., & Nicolas, J.-L. (2006a). Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following

- bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*, 8(12-13), 2715-2724. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., & 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 and Infection*, 8(12-13), 2715-2724. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.020>
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D., & Nicolas, J.-L. (2010). *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5), 753-758. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.007>
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., & Nicolas, J. (2006). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(4), 367-379. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003>
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M., & Poulet, S. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 139-145. <https://doi.org/10.3354/dao046139>
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S. K., Cueff, A., & Poulet, S. A. (2001). Stress and Stress-Induced Neuroendocrine Changes Increase the Susceptibility of Juvenile Oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2304-2309. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2304-2309.2001>
- Lavers, J. L., & Bond, A. L. (2017). Exceptional and rapid accumulation of anthropogenic debris on one of the world's most remote and pristine islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), 6052-6055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619818114>
- Le Roux, F., & Blokesch, M. (2018). Eco-evolutionary Dynamics Linked to Horizontal Gene Transfer in Vibrios. *Annual Review of Microbiology*, 72(1), 89-110. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062148>
- Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B. M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D., & Waldor, M. K. (2011). Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environmental Microbiology*, 13(2), 296-306. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02329.x>
- Le Roux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., Ritchie, J. M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C. C., Strauch, E., Kirschner, A., & Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe : Ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>
- Legué, P., & Prou, J. (2012). L'huître, un coquillage nomade sans tête ni jambe mais avec un pied. *Techniques & culture*, 59, 284-305. <https://doi.org/10.4000/tc.6717>
- Lemire, A., Goudenège, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., & Le Roux, F. (2015). Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME Journal*, 9(7), 1523-1531. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.233>
- Lenski, R. E., & Bouma, J. E. (1987). Effects of segregation and selection on instability of plasmid pACYC184 in *Escherichia coli* B. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 5314-5316. <https://doi.org/10.1128/jb.169.11.5314-5316.1987>

- Lenski, R. E., Simpson, S. C., & Nguyen, T. T. (1994). Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness. *Journal of Bacteriology*, 176(11), 3140-3147. <https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3140-3147.1994>
- León, M., & Bastías, R. (2015). Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 06. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00343>
- Lesueur, M. (2014). Pêche côtière et gouvernance (France). Le cas des pêcheurs à pied professionnels de la baie de Somme. Rapport d'étude. *Les publications du Pôle halieutique AGROCAMPUS OUEST*, 24, 44.
- Levin, B., & Eden, C. S. (1990). Selection and evolution of virulence in bacteria : An ecumenical excursion and modest suggestion. *Parasitology*, 100(S1), S103-S115.
- Li, H., Lin, L., Ye, S., Li, H., & Fan, J. (2017). Assessment of nutrient and heavy metal contamination in the seawater and sediment of Yalujiang Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1-2), 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.069>
- Li, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Xiang, Z., Tong, Y., Qu, F., & Yu, Z. (2014). Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(2), 455-465. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.026>
- Lipart, C., & Renault, T. (2002). Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods*, 101(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00413-X)
- Liu, X., Gutacker, M. M., Musser, J. M., & Fu, Y.-X. (2006). Evidence for Recombination in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8169-8177. <https://doi.org/10.1128/JB.01062-06>
- Liu, Y., Xu, J., Wang, Y., & Yang, S. (2021). Trace metal bioaccumulation in oysters (*Crassostrea gigas*) from Liaodong Bay (Bohai Sea, China). *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 20682-20689. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11968-6>
- Lodge, D. M. (1993). Biological invasions : Lessons for ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 133-137. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90025-K](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90025-K)
- Loiseau, C., & Sorci, G. (2022). Can microplastics facilitate the emergence of infectious diseases? *Science of The Total Environment*, 823, 153694. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153694>
- Lokmer, A., Goedknecht, M. A., Thielges, D. W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J. F., & Wegner, K. M. (2016). Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01367>
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J. F., & Wegner, K. M. (2016). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters : Microbiota and oyster establishment. *Environmental Microbiology*, 18(3), 970-987. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13163>
- Lokmer, A., & Mathias Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*, 9(3), 670-682. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160>
- Longshaw, M., & Malham, S. K. (2013). A review of the infectious agents, parasites, pathogens and commensals of European cockles ( *Cerastoderma edule* and *C. glaucum* ). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(1), 227-247. <https://doi.org/10.1017/S0025315412000537>

- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lupo, C., Dutta, B., Petton, S., Ezanno, P., Tourbiez, D., Travers, M., Pernet, F., & Bacher, C. (2020). Spatial epidemiological modelling of infection by *Vibrio aestuarianus* shows that connectivity and temperature control oyster mortality. *Aquaculture Environment Interactions*, 12, 511-527. <https://doi.org/10.3354/aei00379>
- Luu, K., Bazin, E., & Blum, M. G. B. (2017). *pcadapt*: An R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 67-77. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>
- Lv, Z., Guo, M., Zhao, X., Shao, Y., Zhang, W., & Li, C. (2022). IL-17/IL-17 Receptor Pathway-Mediated Inflammatory Response in *Apostichopus japonicus* Supports the Conserved Functions of Cytokines in Invertebrates. *The Journal of Immunology*, 208(2), 464-479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100047>
- MacIntyre, D. L., Miyata, S. T., Kitaoka, M., & Pukatzki, S. (2010). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), 19520-19524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012931107>
- Mahoney, J. C., Gerding, M. J., Jones, S. H., & Whistler, C. A. (2010). Comparison of the Pathogenic Potentials of Environmental and Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Strains Indicates a Role for Temperature Regulation in Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7459-7465. <https://doi.org/10.1128/AEM.01450-10>
- Maia, F., Barroso, C. M., & Gaspar, M. B. (2021). Biology of the common cockle *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) in Ria de Aveiro (NW Portugal): Implications for fisheries management. *Journal of Sea Research*, 171, 102024. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2021.102024>
- Malham, S. K., Hutchinson, T. H., & Longshaw, M. (2012). A review of the biology of European cockles ( *Cerastoderma* spp.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(7), 1563-1577. <https://doi.org/10.1017/S0025315412000355>
- Manabe, S., & Bryan, K. (1969). Climate calculations with a combined ocean-atmosphere model. *J. Atmos. Sci*, 26(4), 786-789.
- Manchester, K. (1984). Tuberculosis and leprosy in antiquity : An interpretation. *Medical history*, 28(2), 162-173.
- Marsden, A. E., Grudzinski, K., Ondrey, J. M., DeLoney-Marino, C. R., & Visick, K. L. (2017). Impact of Salt and Nutrient Content on Biofilm Formation by *Vibrio fischeri*. *PLOS ONE*, 12(1), e0169521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169521>
- Martenot, C., Oden, E., Travaille, E., Malas, J.-P., & Houssin, M. (2011). Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research*, 160(1-2), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.012>
- Martinez, J. L. (1991). Do bacteria have sex? *Nature*, 352(6333), 288-288.
- Matear, R. J., & Hirst, A. C. (2003). Long-term changes in dissolved oxygen concentrations in the ocean caused by protracted global warming. *Global Biogeochemical Cycles*, 17(4), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1029/2002GB001997>
- Matozzo, V., Monari, M., Foschi, J., Papi, T., Cattani, O., & Marin, M. G. (2005). Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325(2), 163-174. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.04.030>
- Mayer, J. D. (2000). Geography, ecology and emerging infectious diseases. *Social Science*, 16.

- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press.
- McDougald, D., Srinivasan, S., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2003). Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species. *Microbiology*, *149*(7), 1923-1933. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26321-0>
- McFall-Ngai, M., Nyholm, S. V., & Castillo, M. G. (2010). The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes*–*Vibrio fischeri* symbiosis. *Seminars in Immunology*, *22*(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.11.003>
- Meistertzheim, A.-L., Arnaud-Haond, S., Boudry, P., & Thebault, M.-T. (2013). Genetic structure of wild European populations of the invasive Pacific oyster *Crassostrea gigas* due to aquaculture practices. *Mar Biol*, *11*.
- Mekalanos, J. J. (1983). Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. *Cell*, *35*(1), 253-263. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90228-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90228-3)
- Meron, D., Atias, E., Iasur Kruh, L., Elifantz, H., Minz, D., Fine, M., & Banin, E. (2011). The impact of reduced pH on the microbial community of the coral *Acropora eurystoma*. *The ISME Journal*, *5*(1), 51-60. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.102>
- Merrell, D. S., Hava, D. L., & Camilli, A. (2002). Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1471-1491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02857.x>
- Miles, D. W., Ross, T., Olley, J., & McMeekin, T. A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, *38*(2-3), 133-142. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00100-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00100-1)
- Milgroom, M. G. (2015). *Population biology of plant pathogens : Genetics, ecology, and evolution*. APS Press, The American Phytopathological Society.
- Milkman, R., & Bridges, M. M. (1993). Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. IV. Sequence comparisons. *Genetics*, *133*(3), 455-468. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.455>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *55*(1), 165-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mira, A., Ochman, H., & Moran, N. A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in Genetics*, *17*(10), 589-596. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02447-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02447-7)
- Mitra, A., Palaniyandi, S., Herren, C. D., Zhu, X., & Mukhopadhyay, S. (2013). Pleiotropic Roles of uvrY on Biofilm Formation, Motility and Virulence in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *PLoS ONE*, *8*(2), e55492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055492>
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A. H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I., & Kaberdin, V. R. (2019). Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Scientific Reports*, *9*(1), 289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36483-0>
- Moran, N. A., & Plague, G. R. (2004). Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*, *14*(6), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.09.003>
- Moran, N. A., & Wernegreen, J. J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria : Insights from genomics. *Trends in Ecology & Evolution*, *15*(8), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01902-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01902-9)

- Morse, S. S. (1995). Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1), 9.
- Motes, M. L., Depaola, A., Cook, D. W., Veazey, J. E., Hunsucker, J. C., Garthright, W. E., Blodgett, R. J., & Chirtel, S. J. (1998). Influence of Water Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast Oysters (*Crassostrea virginica*). *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 64, 7.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2-9. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(64\)90047-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(64)90047-8)
- Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method : Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31(3), 274-295. <https://doi.org/10.1007/s00357-014-9161-z>
- Navarro-Garcia, F., Ruiz-Perez, F., Cataldi, Á., & Larzábal, M. (2019). Type VI Secretion System in Pathogenic *Escherichia coli* : Structure, Role in Virulence, and Acquisition. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040410>
- Nguyen, A. N., Disconzi, E., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzón, D., Bouloc, P., Le Roux, F., & Jacq, A. (2018). *CsrB* Gene Duplication Drives the Evolution of Redundant Regulatory Pathways Controlling Expression of the Major Toxic Secreted Metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *MSphere*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00582-18>
- Nicolle, C. (1937). *Destin des maladies infectieuses* (Presses universitaires de France).
- Nordström, K., Molin, S., & Light, J. (1984). *Control of replication of bacterial plasmids : Genetics, molecular biology, and physiology of the plasmid R1 system*. Plasmid. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(84\)90054-4](https://doi.org/10.1016/0147-619X(84)90054-4)
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids : Vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1527), 2275-2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>
- Norman, R. A., Crumlish, M., & Stetkiewicz, S. (2019). The importance of fisheries and aquaculture production for nutrition and food security : -EN- -FR- L'importance de la production halieutique et aquacole pour la sécurité nutritionnelle et alimentaire -ES- Importancia de la pesca y la producción acuícola para la seguridad nutricional y alimentaria. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 38(2), 395-407. <https://doi.org/10.20506/rst.38.2.2994>
- Nottage, A. S., & Birkbeck, T. H. (1987). Purification of a proteinase produced by the bivalve pathogen *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339. *Journal of Fish Diseases*, 10(3), 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb01063.x>
- Nyholm, S. V., Deplancke, B., Gaskins, H. R., Apicella, M. A., & McFall-Ngai, M. J. (2002). Roles of *Vibrio fischeri* and Nonsymbiotic Bacteria in the Dynamics of Mucus Secretion during Symbiont Colonization of the *Euprymna scolopes* Light Organ. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5113-5122. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5113-5122.2002>
- Nyholm, S. V., & McFall-Ngai, M. (2004). The winnowing : Establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 632-642. <https://doi.org/10.1038/nrmicro957>
- Ó Gráda, C. (2007). 2. Ireland's Great Famine. An overview. In R. Paping, E. Vanhaute, & C. O Grada (Éds.), *When the Potato Failed. Causes and Effects of the Last European*

- Subsistence Crisis, 1845-1850* (Vol. 9, p. 43-57). Brepols Publishers.  
<https://doi.org/10.1484/M.CORN-EB.4.00018>
- O'Gorman, E. J., Ólafsson, Ó. P., Demars, B. O. L., Friberg, N., Guðbergsson, G., Hannesdóttir, E. R., Jackson, M. C., Johansson, L. S., McLaughlin, Ó. B., Ólafsson, J. S., Woodward, G., & Gíslason, G. M. (2016). Temperature effects on fish production across a natural thermal gradient. *Global Change Biology*, 22(9), 3206-3220.  
<https://doi.org/10.1111/gcb.13233>
- Ohta, T. (1992). *The Nearly Neutral Theory of Molecular Evolution*. 25.
- Oidtmann, B., Peeler, E., Lyngstad, T., Brun, E., Bang Jensen, B., & Stärk, K. D. C. (2013). Risk-based methods for fish and terrestrial animal disease surveillance. *Preventive Veterinary Medicine*, 112(1-2), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.07.008>
- Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., & Honda, T. (2005). Vibrios commonly possess two chromosomes. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 752-757.  
<https://doi.org/10.1128/JB.187.2.752-757.2005>
- Omran, A. R. (2005). The Epidemiologic Transition : A Theory of the Epidemiology of Population Change: *The Epidemiologic Transition*. *Milbank Quarterly*, 83(4), 731-757.  
<https://doi.org/10.1111/j.1468-0009.2005.00398.x>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally : Final report and recommendations*.
- Oyanedel, D., Labreuche, Y., Bruto, M., Amraoui, H., Robino, E., Haffner, P., Rubio, T., Charrière, G. M., Le Roux, F., & Destoumieux-Garzón, D. (2020). *Vibrio splendidus* O-antigen structure : A trade-off between virulence to oysters and resistance to grazers. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4264-4278. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14996>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary : Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Palaniyandi, S., Mitra, A., Herren, C. D., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Zhu, X., & Mukhopadhyay, S. (2012). BarA-UvrY Two-Component System Regulates Virulence of Uropathogenic *E. coli* CFT073. *PLoS ONE*, 7(2), e31348.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031348>
- Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S. R., Wernegreen, J. J., Werren, J. H., & Bourtzis, K. (2006). Toward a Wolbachia Multilocus Sequence Typing System : Discrimination of Wolbachia Strains Present in Drosophila Species. *Current Microbiology*, 53(5), 388-395.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-006-0054-1>
- Parizadeh, L., Tourbiez, D., Garcia, C., Haffner, P., Dégremont, L., Le Roux, F., & Travers, M.-A. (2018). Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus* : A new model to study *V. aestuarianus* pathogenesis. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350>
- Pasteur, L. (1861). Sur les corpuscules organizes qui existent dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées.(Legon professée á la Societé chimique de Paris, le 19 mai). Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées (Extrait). *Compt. rend*, 52(1), 1142-1143.
- Pedersen, T. L. (2017). Hierarchical Sets : Analyzing Pangenome Structure through Scalable Set Visualizations. *Bioinformatics*, btx034. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx034>

- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J., & Keck, N. (2012). Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions*, 2(3), 215-237. <https://doi.org/10.3354/aei00041>
- Pernet, F., Lupo, C., Bacher, C., & Whittington, R. J. (2016). Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1689), 20150213. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0213>
- Pernthaler, J. (2005). Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology*, 3(7), 537-546. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1180>
- Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., & Le Roux, F. (2015). *Crassostrea gigas* mortality in France : The usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686>
- Piel, D., Bruto, M., Labreuche, Y., Blanquart, F., Goudenège, D., Barcia-Cruz, R., Chenivesse, S., Le Panse, S., James, A., & Dubert, J. (2022). Phage–host coevolution in natural populations. *Nature Microbiology*, 1-12.
- Plague, G. R., Dunbar, H. E., Tran, P. L., & Moran, N. A. (2008). Extensive Proliferation of Transposable Elements in Heritable Bacterial Symbionts. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 777-779. <https://doi.org/10.1128/JB.01082-07>
- Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same : The causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 32-42.
- Polz, M. F., Alm, E. J., & Hanage, W. P. (2013). Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends in Genetics*, 29(3), 170-175. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.006>
- Posada, D. (2008). jModelTest : Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Preheim, S. P., Boucher, Y., Wildschutte, H., David, L. A., Veneziano, D., Alm, E. J., & Polz, M. F. (2011). Metapopulation structure of *Vibrionaceae* among coastal marine invertebrates : *Vibrionaceae* population structure among invertebrates. *Environmental Microbiology*, 13(1), 265-275. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02328.x>
- Price, M. N., Arkin, A. P., & Alm, E. J. (2006). The Life-Cycle of Operons. *PLoS Genetics*, 2(6), e96. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020096>
- Qiu, L., Song, L., Yu, Y., Zhao, J., Wang, L., & Zhang, Q. (2009). Identification and expression of TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) gene in Zhikong Scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(3), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.010>
- R Core Team. (2021). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. <https://www.R-project.org/>
- Randremanana, R., Andrianaivoarimanana, V., Nikolay, B., Ramasindrazana, B., Paireau, J., ten Bosch, Q. A., Rakotondramanga, J. M., Rahajandraibe, S., Rahelinirina, S., Rakotomanana, F., Rakotoarimanana, F. M., Randriamampionona, L. B., Razafimbiana, V., De Dieu Randria, M. J., Raberahona, M., Mikaty, G., Le Guern, A.-S., Rakotonjanabelo, L. A., Ndiaye, C. F., ... Rajerison, M. (2019). Epidemiological characteristics of an urban plague epidemic in Madagascar, August–November, 2017 : An outbreak report. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(5), 537-545. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30730-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30730-8)

- Reen, F. J., Almagro-Moreno, S., Ussery, D., & Boyd, E. F. (2006). The genomic code : Inferring Vibrionaceae niche specialization. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 697-704. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1476>
- Renault, T., Deuff, R. M. L., Cochennec, N., & Maffart, P. (1994). *Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, Crassostrea gigas, in France · Comparative study*. 8.
- Richard, D., Ravigné, V., Rieux, A., Facon, B., Boyer, C., Boyer, K., Grygiel, P., Javegny, S., Terville, M., Canteros, B. I., Robène, I., Vernière, C., Chabirand, A., Pruvost, O., & Lefeuvre, P. (2017). Adaptation of genetically monomorphic bacteria : Evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements. *Molecular Ecology*, 26(7), 2131-2149. <https://doi.org/10.1111/mec.14007>
- Robert, R., Sánchez, J. L., Pérez-Parallé, L., Ponis, E., Kamermans, P., & O'Mahoney, M. (2013). *A glimpse on the mollusc industry in Europe*. 12.
- Robino, E., Poirier, A. C., Amraoui, H., Le Bissonnais, S., Perret, A., Lopez-Joven, C., Auguet, J., Rubio, T. P., Cazevielle, C., Rolland, J., Héchard, Y., Destoumieux-Garzón, D., & Charrière, G. M. (2019). Resistance of the oyster pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 against grazing by *Vannella* sp. Marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.14770. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14770>
- Rocha, E. P. C. (2018). Neutral Theory, Microbial Practice : Challenges in Bacterial Population Genetics. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1338-1347. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy078>
- Rodgers, C., Arzul, I., Carrasco, N., & Furones Nozal, D. (2019). A literature review as an aid to identify strategies for mitigating ostreid herpesvirus 1 in *Crassostrea gigas* hatchery and nursery systems. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 565-585. <https://doi.org/10.1111/raq.12246>
- Rodgers, C. J., Mohan, C. V., & Peeler, E. J. (2011). The spread of pathogens through trade in aquatic animals and their products : -EN- -FR- La dissémination d'agents pathogènes lors des échanges internationaux d'animaux aquatiques et de leurs produits -ES- Propagación de agentes patógenos por el comercio de animales acuáticos y sus derivados. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 30(1), 241-256. <https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2034>
- Rojas, M., Monsalve, D. M., Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Ramírez-Santana, C., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., & Anaya, J.-M. (2020). Ebola virus disease : An emerging and re-emerging viral threat. *Journal of Autoimmunity*, 106, 102375. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102375>
- Rosas-Magallanes, V., Deschavanne, P., Quintana-Murci, L., Brosch, R., Gicquel, B., & Neyrolles, O. (2006). Horizontal transfer of a virulence operon to the ancestor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Biology and Evolution*, 23(6), 1129-1135. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj120>
- Rozas, M., & Enríquez, R. (2014). Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish : A review. *Journal of Fish Diseases*, 37(3), 163-188. <https://doi.org/10.1111/jfd.12211>
- Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., Chaparro, C., Torres, M., de Lorgeril, J., Haffner, P., Vidal-Dupiol, J., Lagorce, A., Petton, B., Mitta, G., Jacq, A., Le Roux, F., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2019). Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(28), 14238-14247. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116>

- Salomon, D., Klimko, J. A., Trudgian, D. C., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Mirzaei, H., & Orth, K. (2015). Type VI Secretion System Toxins Horizontally Shared between Marine Bacteria. *PLOS Pathogens*, *11*(8), e1005128. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005128>
- Sanjuán, E., González-Candelas, F., & Amaro, C. (2011). Polyphyletic origin of *Vibrio vulnificus* biotype 2 as revealed by sequence-based analysis. *Applied and environmental microbiology*, *77*(2), 688-695.
- Satchell, K. J. F. (2015). Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of *Vibrios*. *Microbiology Spectrum*, *3*(3), 3.3.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014>
- Saulnier, D., De Decker, S., & 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. *Journal of Microbiological Methods*, *77*(2), 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.021>
- Saulnier, D., De Decker, S., Tourbiez, D., & Travers, M. A. (2017). Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus* -related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. *Journal of Microbiological Methods*, *140*, 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.07.002>
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., & Thompson, F. L. (2007). Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology*, *189*(21), 7932-7936. <https://doi.org/10.1128/JB.00693-07>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn : Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, *27*(4), 592-593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., & 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. *Frontiers in Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160>
- Scott, J. R. (1984). Regulation of Plasmid Replication. *MICROBIOL. REV.*, *48*, 23.
- Seemann, T. (2014). Prokka : Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, *30*(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., & 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 Research*, *153*(1), 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>
- Sekine, Y., Aihara, K., & Ohtsubo, E. (1999). Linearization and transposition of circular molecules of insertion sequence IS3. *Journal of Molecular Biology*, *294*(1), 21-34. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3181>
- Shapiro, B. J. (2016). How clonal are bacteria over time? *Current Opinion in Microbiology*, *31*, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.013>
- Sharp, P. M., Bailes, E., Grocock, R. J., Peden, J. F., & Sockett, R. E. (2005). Variation in the strength of selected codon usage bias among bacteria. *Nucleic Acids Research*, *33*(4), 1141-1153. <https://doi.org/10.1093/nar/gki242>
- Shen, X., Li, J., Fan, M., Xia, L., Li, W., State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing, China, & General Center for Disease Control and Prevention of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Mongolia Autonomous Region, China. (2020). A Reemergent Case of Bubonic Plague- Inner Mongolia Autonomous Region, China, July, 2020. *China CDC Weekly*, *2*(29), 549-550. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.145>

- Sheppard, S. K., Guttman, D. S., & Fitzgerald, J. R. (2018). Population genomics of bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 19(9), 549-565. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0032-z>
- Shore-Maggio, A., Aeby, G., & Callahan, S. (2018). Influence of salinity and sedimentation on *Vibrio* infection of the Hawaiian coral *Montipora capitata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(1), 63-71. <https://doi.org/10.3354/dao03213>
- Siguier, P., Gourbeyre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences : Their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 865-891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Simons, A. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data*.
- Smith, I., & British Crop Protection Council, L. (1985). *Fungicides for crop protection : 100 years of progress. Proceedings*.
- Smith, J. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34(2). <https://doi.org/10.1007/BF00182389>
- Smith, J. M., Feil, E. J., & Smith, N. H. (2000). Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *BioEssays*, 22(12), 1115-1122. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200012\)22:12<1115::AID-BIES9>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200012)22:12<1115::AID-BIES9>3.0.CO;2-R)
- Smith, J. M., & Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23(1), 23-35.
- Smith, N. H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J. R., Gordon, S. V., van Soolingen, D., Glyn Hewinson, R., & Maynard Smith, J. (2006). Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Theoretical Biology*, 239(2), 220-225. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.08.036>
- Smith, T. (1904). Some Problems in the Life History of Pathogenic Microorganisms. *Science*, 20(520), 817-832. <https://doi.org/10.1126/science.20.520.817>
- Sneath, P. H. A., Sackin, M. J., & Ambler, R. P. (1975). Detecting Evolutionary Incompatibilities From Protein Sequences. *Systematic Biology*, 24(3), 311-332. <https://doi.org/10.1093/sysbio/24.3.311>
- Springmann, M., Godfray, H. C. J., Rayner, M., & Scarborough, P. (2015). Analysis and valuation of the health and climate change cobenefits of dietary change. *MEDICAL SCIENCES*, 6.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8 : A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stentiford, G. D., Neil, D. M., Peeler, E. J., Shields, J. D., Small, H. J., Flegel, T. W., Vlak, J. M., Jones, B., Morado, F., Moss, S., Lotz, J., Bartholomay, L., Behringer, D. C., Hauton, C., & Lightner, D. V. (2012). Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(2), 141-157. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.013>
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J., & Mohrholz, V. (2008). Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans. *Science*, 320(5876), 655-658. <https://doi.org/10.1126/science.1153847>
- Suerbaum, S., & Josenhans, C. (2007). *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology*, 5(6), 441-452. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1658>

- Sundberg, L.-R., Ketola, T., Laanto, E., Kinnula, H., Bamford, J. K. H., Penttinen, R., & Mappes, J. (2016). Intensive aquaculture selects for increased virulence and interference competition in bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1826), 20153069. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3069>
- Sussman, M., Mieog, J. C., Doyle, J., Victor, S., Willis, B. L., & Bourne, D. G. (2009). Vibrio Zinc-Metalloprotease Causes Photoinactivation of Coral Endosymbionts and Coral Tissue Lesions. *PLoS ONE*, 4(2), e4511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004511>
- Tamm, L., Thuerig, B., Apostolov, S., Blogg, H., Borgo, E., Corneo, P. E., Fittje, S., de Palma, M., Donko, A., Experton, C., Alcázar Marín, É., Morell Pérez, Á., Pertot, I., Rasmussen, A., Steinshamn, H., Vetemaa, A., Willer, H., & Herforth-Rahmé, J. (2022). Use of Copper-Based Fungicides in Organic Agriculture in Twelve European Countries. *Agronomy*, 12(3), 673. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030673>
- Tax, S. (2017). Evolution and the Ills of Mankind Steven Polgar. In *Horizons of Anthropology* (p. 200-211). Routledge.
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A. L., Durkin, A. S., DeBoy, R. T., Davidsen, T. M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J. D., Hauser, C. R., Sundaram, J. P., Nelson, W. C., ... Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae* : Implications for the microbial « pan-genome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13950-13955. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102>
- Thilsted, S. H., Thorne-Lyman, A., Webb, P., Bogard, J. R., Subasinghe, R., Phillips, M. J., & Allison, E. H. (2016). Sustaining healthy diets : The role of capture fisheries and aquaculture for improving nutrition in the post-2015 era. *Food Policy*, 61, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2016.02.005>
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711-721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- Thomas, S. R., & Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.01.006>
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (2015). How clonal are *Neisseria* species? The epidemic clonality model revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(29), 8909-8913. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502900112>
- Tisdell, C. (2003). Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity : Analysis and assessment. *Ecological Economics*, 45(3), 365-376. [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(03\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(03)00091-0)
- Tison, D. L., & Seidler, R. J. (1983). *Vibrio aestuarianus* : A New Species from Estuarine Waters and Shellfish. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(4), 699-702. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-699>
- Toft, C., & Andersson, S. G. E. (2010). Evolutionary microbial genomics : Insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), 465-475. <https://doi.org/10.1038/nrg2798>
- Tornero, V., & Hanke, G. (2016). Chemical contaminants entering the marine environment from sea-based sources : A review with a focus on European seas. *Marine Pollution Bulletin*, 112(1-2), 17-38. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.091>

- Tout, J., Siboni, N., Messer, L. F., Garren, M., Stocker, R., Webster, N. S., Ralph, P. J., & Seymour, J. R. (2015). Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00432>
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 11-31. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.010>
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2014). *The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes*. 15.
- Troost, K. (2010). Causes and effects of a highly successful marine invasion : Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *Journal of Sea Research*, 64(3), 145-165. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.02.004>
- Tsou, A. M., Liu, Z., Cai, T., & Zhu, J. (2011). The VarS/VarA two-component system modulates the activity of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing transcriptional regulator HapR. *Microbiology*, 157(6), 1620-1628. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046235-0>
- Ujvari, B., Gatenby, R. A., & Thomas, F. (2017). Transmissible Cancer : The Evolution of Interindividual Metastasis. In *Ecology and Evolution of Cancer* (p. 167-179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804310-3.00012-0>
- Valenzuela, L. M., Hidalgo, A. A., Rodríguez, L., Urrutia, I. M., Ortega, A. P., Villagra, N. A., Paredes-Sabja, D., Calderón, I. L., Gil, F., Saavedra, C. P., Mora, G. C., & Fuentes, J. A. (2015). Pseudogenization of *sopA* and *sopE2* is functionally linked and contributes to virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.04.021>
- Van Beneden, P.-J. (1878). *Les commensaux et les parasites dans le règne animal* (Vol. 9). Baillière.
- Vanhove, A. S., Rubio, T. P., Nguyen, A. N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., Vergnes, A., Poirier, A. C., Disconzi, E., Bachère, E., Le Roux, F., Jacq, A., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2016). Copper homeostasis at the host vibrio interface : Lessons from intracellular vibrio transcriptomics: Copper homeostasis at the host vibrio interface. *Environmental Microbiology*, 18(3), 875-888. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13083>
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Stauder, M., Stagnaro, L., Venier, P., & Pruzzo, C. (2015). Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus* : Ecology of *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 1065-1080. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12484>
- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., & Pruzzo, C. (2018). Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial Ecology*, 75(2), 495-504. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6>
- Vieira-Silva, S., & Rocha, E. P. C. (2010). The Systemic Imprint of Growth and Its Uses in Ecological (Meta)Genomics. *PLoS Genetics*, 6(1), e1000808. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000808>
- Vos, M. (2009). Why do bacteria engage in homologous recombination? *Trends in Microbiology*, 17(6), 226-232. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.03.001>
- Vouga, M., & Greub, G. (2016). Emerging bacterial pathogens : The past and beyond. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(1), 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.010>

- Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.-L., Marissal, É., & Berthe, F. (2002). Caractérisation de bactéries pathogènes de naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Comptes Rendus Biologies*, 325(3), 231-238. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(02\)01428-2](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01428-2)
- Wayne, L., Brenner, D., Colwell, R., Grimont, P., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, L., Moore, W., Murray, Rge., & Stackebrandt, E. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 463-464.
- Wellington, E. M., Boxall, A. B., Cross, P., Feil, E. J., Gaze, W. H., Hawkey, P. M., Johnson-Rollings, A. S., Jones, D. L., Lee, N. M., & Otten, W. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 13(2), 155-165.
- Wiedenbeck, J., & Cohan, F. M. (2011). Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 957-976. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x>
- Wielgoss, S., Barrick, J. E., Tenailon, O., Wisner, M. J., Dittmar, W. J., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Médigue, C., Lenski, R. E., & Schneider, D. (2013). Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 222-227.
- Wirth, T., Bergot, M., Rasigade, J.-P., Pichon, B., Barbier, M., Martins-Simoes, P., Jacob, L., Pike, R., Tissieres, P., Picaud, J.-C., Kearns, A., Supply, P., Butin, M., Laurent, F., the International Consortium for Staphylococcus capitis neonatal sepsis, Adamkova, V., Barkham, T., Becker, K., Bennett, D., ... Aymerich, C. P. (2020). Niche specialization and spread of *Staphylococcus capitis* involved in neonatal sepsis. *Nature Microbiology*, 5(5), 735-745. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0676-2>
- Woodham-Smith, C. (1962). The Great Hunger : Ireland 1845-9. *The Great Hunger: Ireland 1845-9*.
- Woolhouse, M., & Gaunt, E. (2007). Ecological Origins of Novel Human Pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 231-242. <https://doi.org/10.1080/10408410701647560>
- World Health Organization. (2022). *World health statistics 2022 : Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/356584>
- Wright, A. C., Garrido, V., Debuex, G., Farrell-Evans, M., Mudbidri, A. A., & Otwell, W. S. (2007). Evaluation of Postharvest-Processed Oysters by Using PCR-Based Most-Probable-Number Enumeration of *Vibrio vulnificus* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7477-7481. <https://doi.org/10.1128/AEM.01118-07>
- Wright, R. M., Aglyamova, G. V., Meyer, E., & Matz, M. V. (2015). Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus*. *BMC Genomics*, 16(1), 371. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1540-2>
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16(2), 97.
- Yung, C.-M., Ward, C. S., Davis, K. M., Johnson, Z. I., & Hunt, D. E. (2016). Insensitivity of Diverse and Temporally Variable Particle-Associated Microbial Communities to Bulk Seawater Environmental Parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(11), 3431-3437. <https://doi.org/10.1128/AEM.00395-16>
- Zere, T. R., Vakulskas, C. A., Leng, Y., Pannuri, A., Potts, A. H., Dias, R., Tang, D., Kolaczowski, B., Georgellis, D., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Genomic Targets and Features of BarA-UvrY (-SirA) Signal Transduction Systems. *PLOS ONE*, 10(12), e0145035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145035>

- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7137-7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418), 49-54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>
- Zhang, Y., He, X., & Yu, Z. (2011). Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (I $\kappa$ B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(6), 1354-1361. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.008>
- Zhao, W., Caro, F., Robins, W., & Mekalanos, J. J. (2018). Antagonism toward the intestinal microbiota and its effect on *Vibrio cholerae* virulence. *Science*, 359(6372), 210-213. <https://doi.org/10.1126/science.aap8775>



## Annexes

Annexe 1 : Données supplémentaires à l'article 1

Annexe 2 : Données supplémentaires à l'article 2

Annexe 3 : Données supplémentaires à l'article 3



## Annexe 1 : Données supplémentaires de l'article 1

**Table S1.** Sampling sites of *Cerastoderma edule* along the English Channel coast of France, mortality rate estimation and diagnostic analyses performed.

Year	Month	Site	Mean mortality rate (%)	Number of individuals	Assays performed			
					Histology	Bacteriology	<i>V. aestuarianus</i> real time PCR	OsHV-1 real time PCR
2012	August	Baie de Somme	89	15 <sup>a</sup>	15	5	15	15
2012	June	Baie des Veys	80	15 <sup>a</sup>	14	nd	15	15
2015	July	Baie de Somme	49	15 <sup>a</sup>	15	5	15	15
2015	July	Binic	35	35 <sup>b</sup>	20	5	15	15
2015	June	Baie des Veys	33	35 <sup>b</sup>	20	5	15	15

<sup>a</sup> All analyses performed on the same individuals.

<sup>b</sup> Histology analyses performed on different individuals.  
nd: not done

**Table S2.** Histological, bacteriology and PCR results obtained for *Cerastoderma edule* samples for each location and year included in the present study.

Area		Baie de Somme		Baie des Veys		Binic
Year		2012	2015	2012	2015	2015
Histology n (%) infected individuals	Bacteria	15 (100)	12 (80)	7 (50)	18 (90)	15 (75)
	Rickettsia-like organism	0	0	3 (21)	2 (10)	15 (75)
	Trematod sporocysts	1 (7)	8 (53)	6 (43)	6 (30)	1 (5)
	Trematod metacercaria	3 (20)	2 (13)	0	3 (15)	5 (25)
	Turbellarian-like organism	0	0	3 (21)	1 (5)	1 (5)
	Gregarine spores	9 (60)	4 (27)	8 (57)	11 (55)	15 (75)
	<i>Haplosporidium</i> or <i>Minchinia</i> -like	0	0	0	0	1 (5)
	Ciliates	0	1 (7)	6 (43)	3 (15)	0
	Necrosis	15 (100)	13 (87)	7 (50)	19 (95)	15 (75)
	Haemocytic infiltration	0	13 (87)	6 (43)	20 (100)	9 (60)
	Neoplasia	0	1 (7)	0	1 (5)	0
Real time PCR, n (%) infected individuals	OsHV-1	0	0	0	0	0
	<i>Vibrio aestuarianus</i>	11 (73)	15 (100)	4 (29)	15 (100)	13 (87)
Bacteria culture, n (%) infected individuals	<i>Vibrio aestuarianus</i>	5 (100)	2 (40)	nd	5 (100)	3 (60)
	<i>Splendidus</i> clade	2 (40)	4 (80)	nd	0	2 (40)

Abbreviation: nd not done

**Table S3:** Bacterial strains used and their sources

Strains	Source and date of isolation	References
12/122 1T1	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	Goudenège et al 2015
12/122 1T3	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	This study
12/122 2T3	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	This study
12/122 3T3	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	This study
12/122 4T3	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	This study
12/122 5T3	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, August 2012	This study
15/061 1T1	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2015	This study
15/061 2T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2015	This study
15/061 3T1	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2015	This study
15/061 3T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2016	This study
15/061 4T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2015	This study
15/061 4T4	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2016	This study
15/061 5T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Brévands, France, June 2015	This study
15/064 3T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Binic, France, July 2015	This study
15/064 4T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Binic, France, July 2015	This study
15/075 1T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, July 2015	This study
15/075 3T2	Diseased cockles, ( <i>Ceratomyxa edule</i> ), Baie de Somme, France, July 2015	This study
01/032	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Argenton, June 2001	Garnier et al 2008
01/151	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), La Trinité sur Mer, July 2001	Garnier et al 2008
01/308	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Normandie, August 2001	Garnier et al 2008
02/041	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Argenton, June 2002	Garnier et al 2008
02/093	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Bouin, July 2002	Garnier et al 2008
07/115	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Bretagne, 2007	Goudenège et al 2015
08/041 2T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/042 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/055 3T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/056 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/081 5T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/090 3T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/093 3T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/110 4T5	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
08/132 3T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Vendée, 2008	Goudenège et al 2015
08/162 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2008	Goudenège et al 2015
09/006 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2009	Goudenège et al 2015
10/027 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2010	Goudenège et al 2015
10/075 3T2	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2010	Goudenège et al 2015
11/009 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/010 2T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/010 3T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/025 5b	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/026 3a	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/035 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
11/051 11MT1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Gironde, 2011	Goudenège et al 2015
11/142 10T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2011	Goudenège et al 2015
12/016 1T1	Diseased oysters ( <i>Crassostrea gigas</i> ), Charente-Maritime, 2012	Goudenège et al 2015
LMG 7909T	<i>V. aestuarianus</i> type strain	Tison et al 1983
15/064 1T2	<i>V. splendidus</i> -related	This study
LMG 13544T	<i>V. ordalii</i>	Schiewe et al. 1982
LMG 7910T	<i>V. furnisii</i>	Brenner et al. 1983

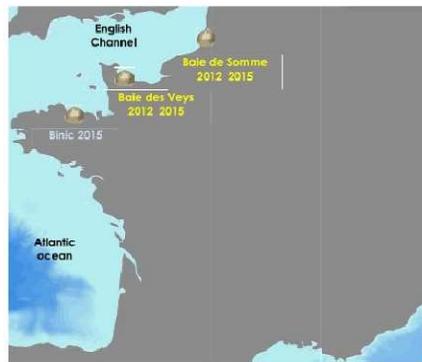
**Table S4:** Genbank accession numbers

Strains	Accession number ( <i>ldh</i> gene)	Accession number ( <i>16s</i> gene)	Accession number ( <i>gyrB</i> gene)
12/122 1T1 (LMG 31437=DSM 109724)	MK315023	MK307681	MK315006
12/122 1T3	MK315024	MK307682	MK315007
12/122 2T3	MK315025	MK307683	MK315008
12/122 3T3 (LMG 31436=DSM 109723)	MK315026	MK307684	MK315009
12/122 4T3	MK315027	MK307685	MK315010
12/122 5T3	MK315028	MK307686	MK315011
15/061 1T1	MK315029	MK307687	MK315012
15/061 2T2	MK315030	MK307688	MK315013
15/061 3T1	MK315031	MK307689	MK315014
15/061 3T2	MK315032	MK307690	MK315015
15/061 4T2 (LMG 31438=DSM 109725)	MK315033	MK307691	MK315016
15/061 4T4	MK315034	MK307692	MK315017
15/061 5T2	MK315035	MK307693	MK315018
15/064 3T2 (LMG 31439=DSM 109719)	MK315036	MK307694	MK315019
15/064 4T2	MK315037	MK307695	MK315020
15/075 1T2	MK315038	MK307696	MK315021
15/075 3T2 (LMG 31440=DSM 109720)	MK315039	MK307697	MK315022

**Table S5:** Comparison of the genomic sequences of 11 *Vibrio aestuarianus* strains based on ANI values obtained with *in silico* methods

		<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> subsp. nov.	<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> subsp. nov.					<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>francensis</i> subsp. nov.				
		LMG 7909T	12/122_3T3	15/061_1T1	15/064_3T2	15/064_4T2	15/075_3T2	01/032	02/041	07/115	01/151	01/308
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> subsp. nov.	LMG 7909T	/										
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> subsp. nov.	12/122_3T3	97.06	/									
	15/061_1T1	97.28	97.99	/								
	15/064_3T2	97.75	97.97	99.7	/							
	15/064_4T2	97.32	97.9	99.25	99.99	/						
	15/075_32	97.13	98.84	97.89	97.88	98.01	/					
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>francensis</i> subsp. nov.	01/032	97.04	97.56	97.48	97.48	97.7	97.58	/				
	02/041	97.52	97.72	97.68	97.63	97.7	97.8	99.98	/			
	07/115	96.96	97.64	97.52	97.48	97.7	97.51	99.99	99.98	/		
	01/151	96.83	97.5	97.53	97.51	97.71	97.34	99.94	99.99	99.87	/	
	01/308	96.86	97.37	97.37	97.37	97.88	97.36	99.6	99.21	99.59	99.51	/

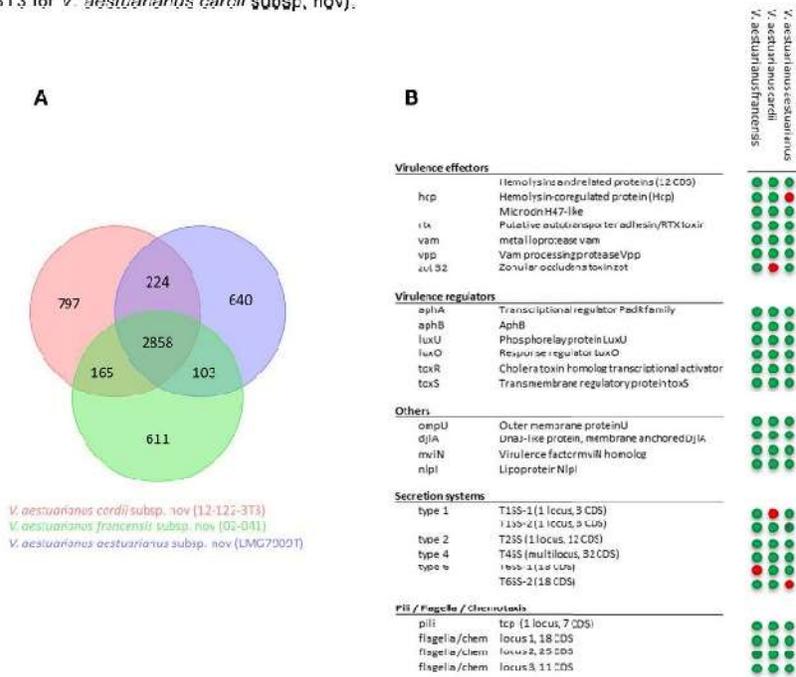
**Figure S1.** Map of the French English Channel coast affected by cockles mortality



**Figure S2.** Culture aspect on Zobell, Chromagar and TCBS after 48h at 20°C of *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii* subsp. nov.



**Figure S3.** Core genome, specific genome and virulome comparisons. (A) Venn diagram indicating common and variable genome proportion for each genome, (B) Presence (green) or absence (red) of predicted CDS encoding putative virulence factors in the 3 representative genomes (LMG7909T for *V. aestuarianus aestuarianus* subsp. nov, 02-041 for *V. aestuarianus francensis* subsp. nov and 12-122-3T3 for *V. aestuarianus cardii* subsp. nov).



## Annexe 2 : Données supplémentaires de l'article 2

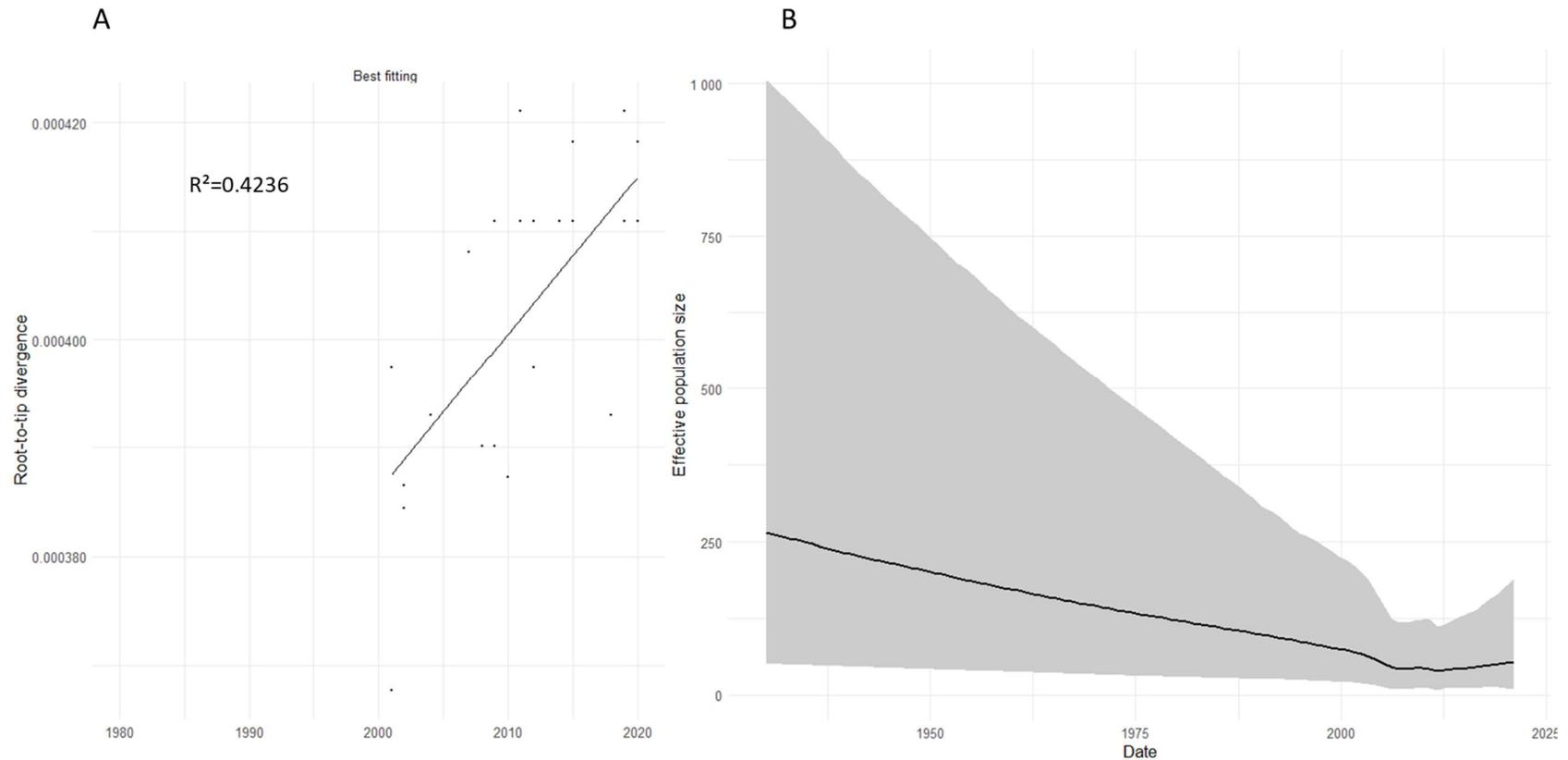


Figure S1: **Temporal signal and reconstructed demographic history of *V. aestuarianus francensis***. A) Hierarchical root-to-tip analyses performed on the *V. aestuarianus francensis* data set, using TempEst (2007). B) GMRF Bayesian skyline plot indicating variation over time of the median of the effective population size of *V. aestuarianus francensis*. The estimated variations and the 95% confidence intervals are represented by black line and grey area respectively.

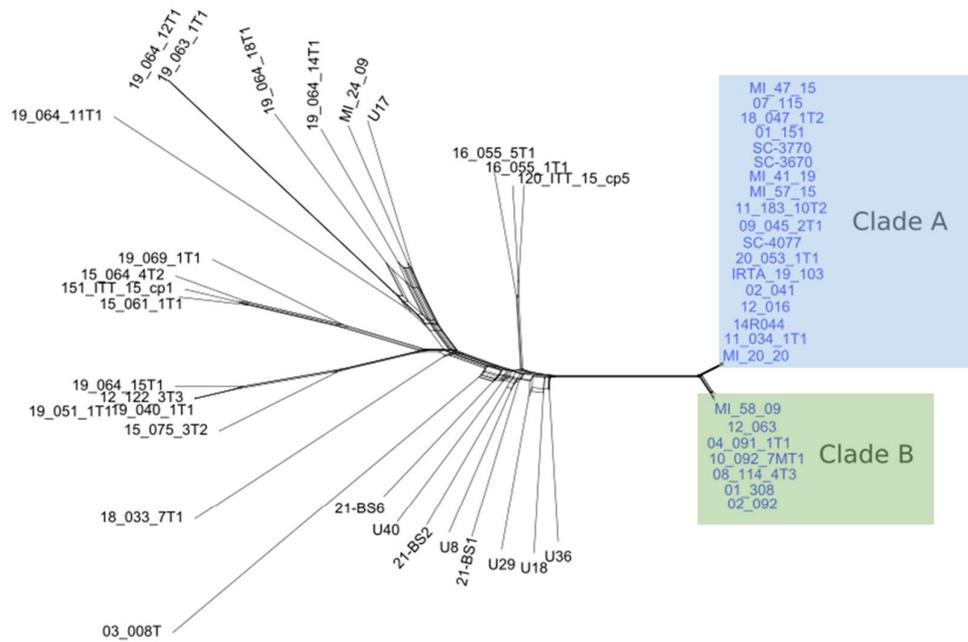


Figure S2: **NeighborNet graph** estimated from distance matrix calculated from the complete alignment. *Va. francensis* lineages A and B are indicated in blue and green respectively

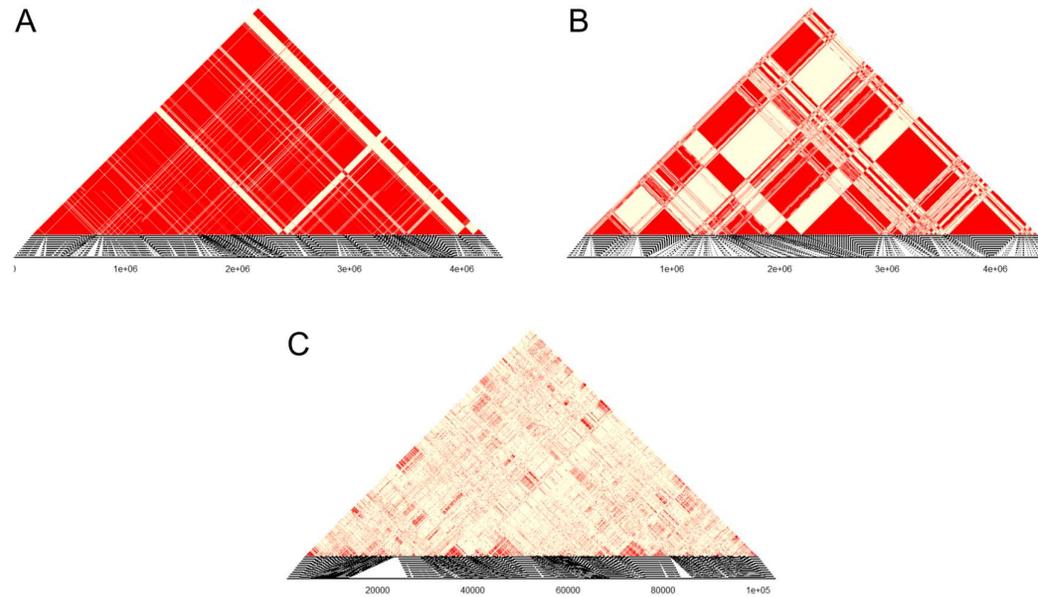


Figure S3: **Association map between SNP** in A) *Va francensis*, lineage A (n=17, all SNP); B) *Va francensis*, lineage B (n = 8, all SNP) and C) No francensis strains (n = 29, 5000 first SNP), obtained thanks to the LDscan and LDmap functions of the package *pegas* (R). The horizontal axis indicates the position of the loci on the chromosome. The linkage coefficients ( $r^2$ ) between each pair of loci are indicated as coloured squares: the squares at the bottom of the triangle are for nearby loci, whereas the square at the top is for the two most distant loci. The stronger the association between two loci (*i.e.* found in all the sequences), the redder the square.

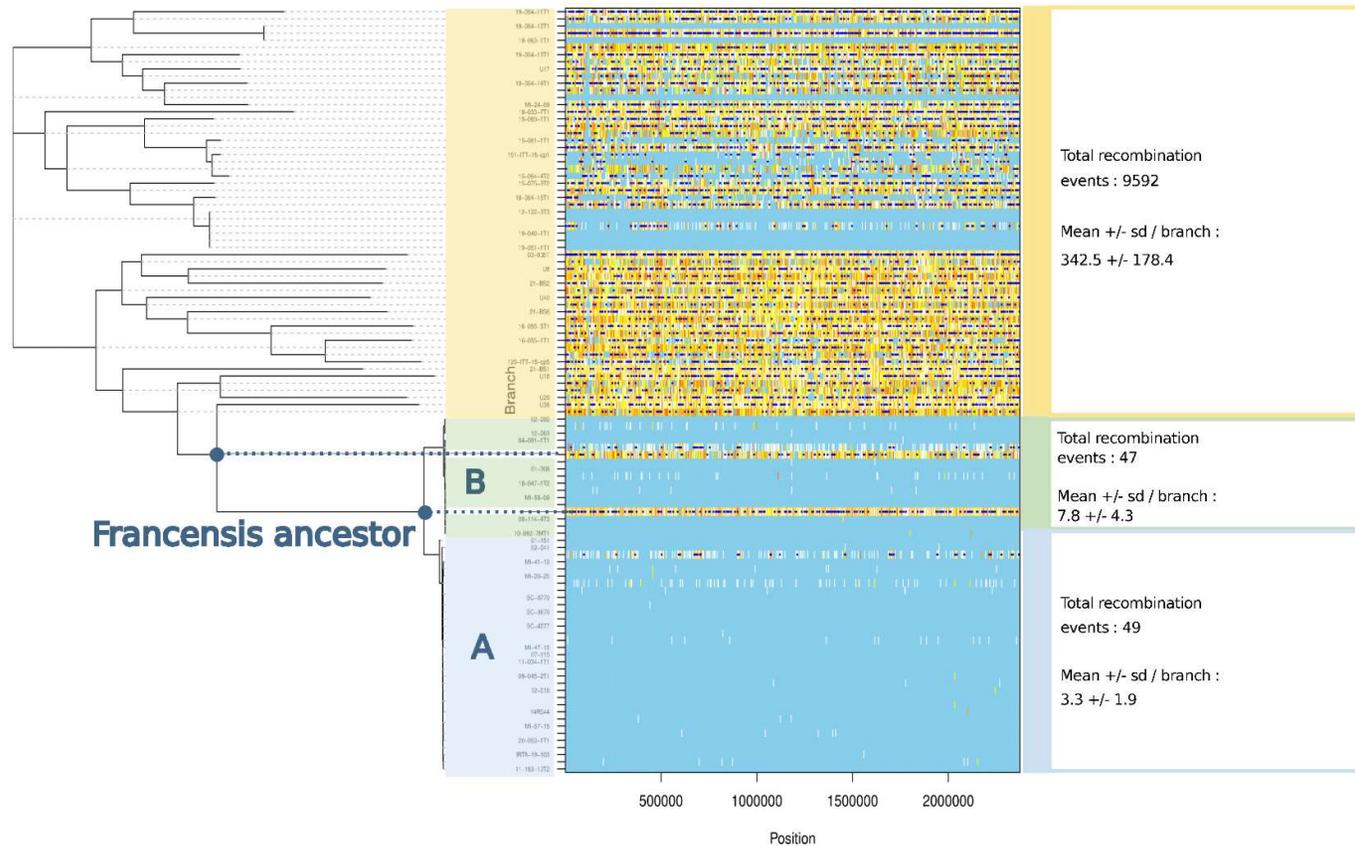


Figure S4: **A limited number of recombination events occurred in *Va francensis* genomes after their expansion.** Detected recombination events are shown by dark blue horizontal bars. For a given branch, light blue sites indicate no substitution. All other colors (from white to red) indicate a substitution. White represents a nonhomoplasic substitution. An increasing level of redness means an increasing degree of homoplasy. *Va francensis* lineages A and B are represented in blue and green, respectively, and the other strains are shown in yellow. For improved readability, some nodes of the tree as well as the row of the recombination events matrix related to these nodes are indicated with points and dashed lines.

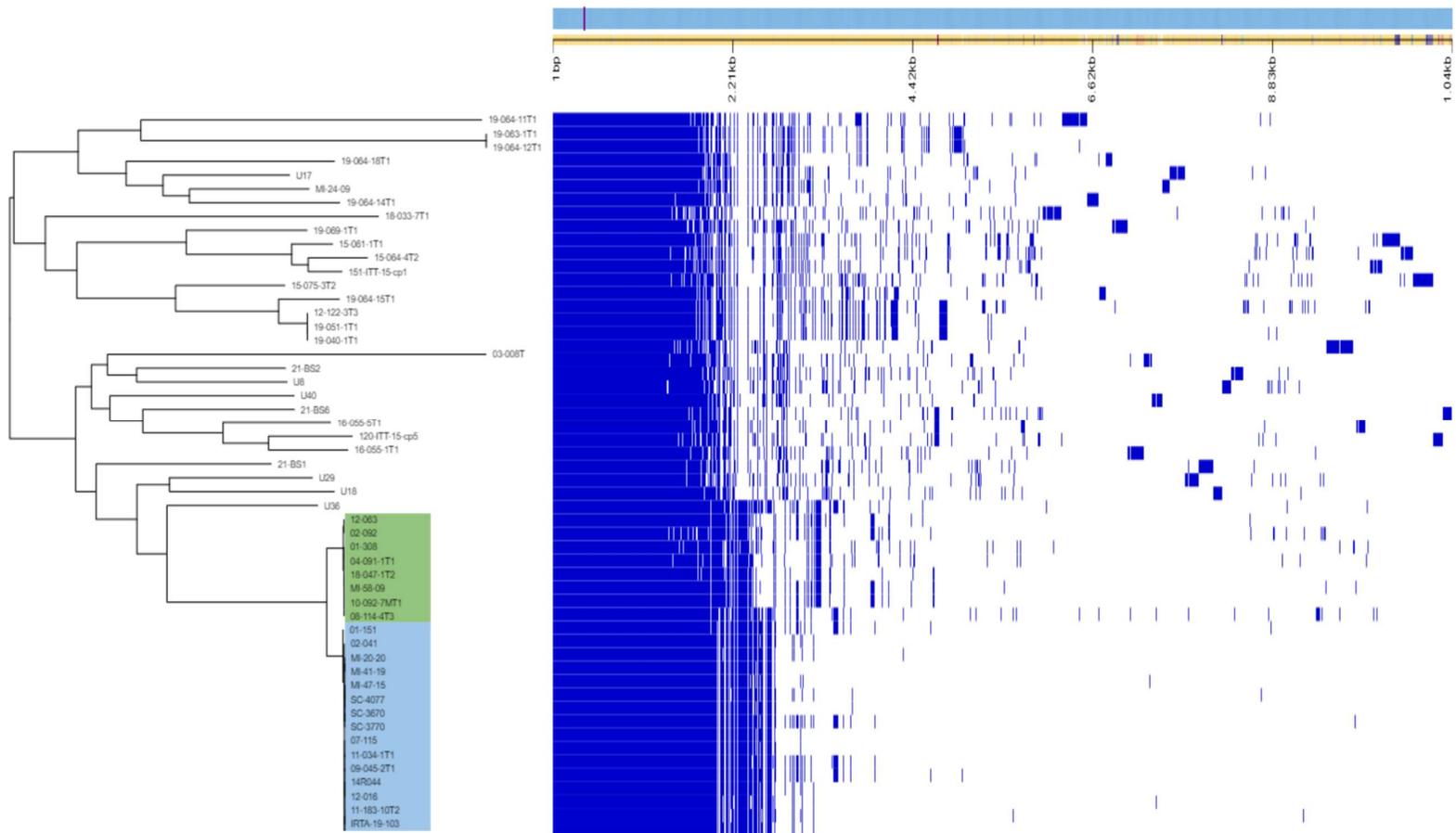


Figure S5: **Phandango plot of Roary gene presence and absence.** Genes are shown as light blue bricks along the top and are sorted left to right by the proportion of isolates they are observed in and might not represent the genome order. Presence (blue) and absence (white) of genes is plotted with respect to each isolate phylogenetic placement. *Va francensis* lineages A and B are represented respectively in blue and green color areas.

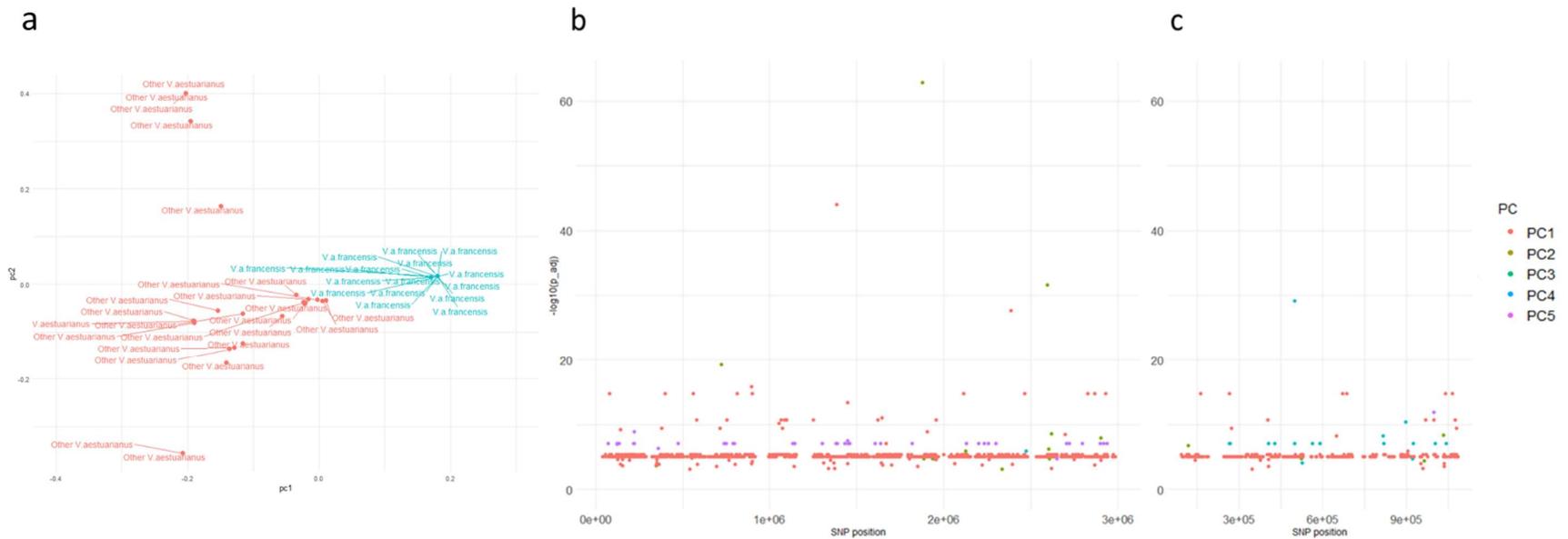
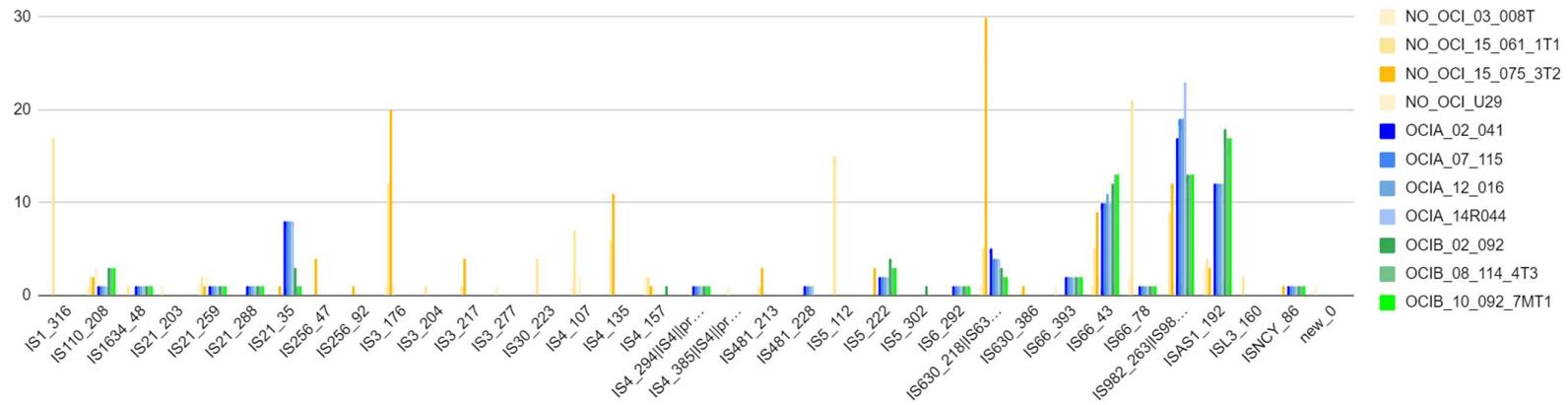


Figure S6: **Genome scan analysis of *V. aestuarianus* strains for detecting SNPs involved in adaptation.** A) Plot of the first two principal components (PC). The 54 *Vibrio aestuarianus* strains are represented by points and colorized according they belong to *Va francensis* (blue) or not (pink). B) and C) Manhattan plot respectively for chromosome 1 and 2, representing the 2925 SNPs and  $-\log_{10}(\text{p.value})$ . The SNPs are colorized according to the principal component to which they correlate most (PC1: pink, PC2: brown, PC3: green, PC4: blue, PC5: purple).

### Chromosome A



### Chromosome B

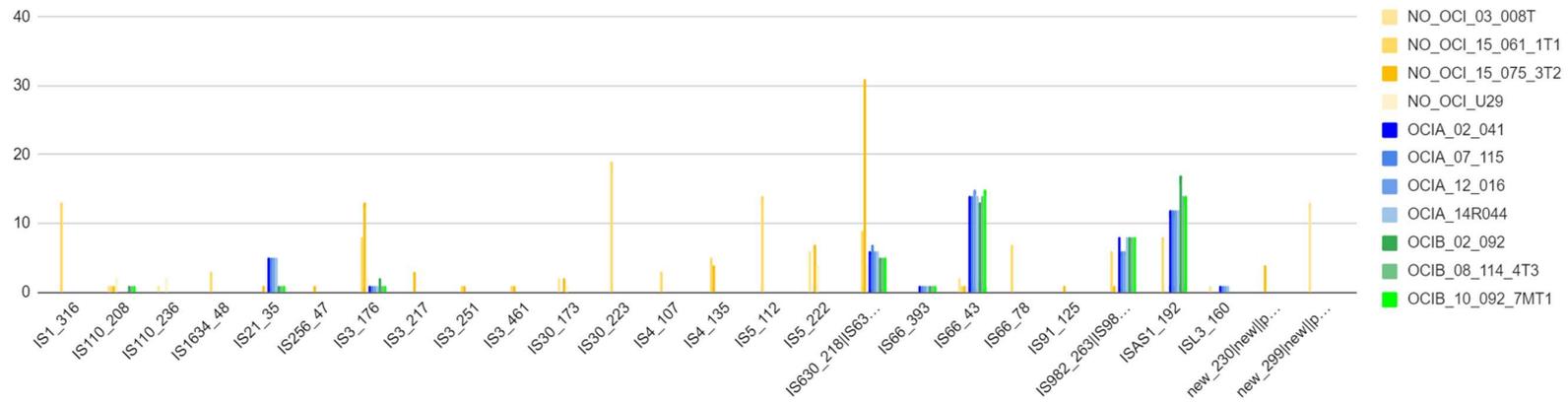


Figure S7: IS number and subgroups on each *Vibrio aestuarianus* chromosome (A and B) for 11 strains other than *Va francensis* (N=4), *Va francensis*, lineage A (N = 4) and B (N=3).

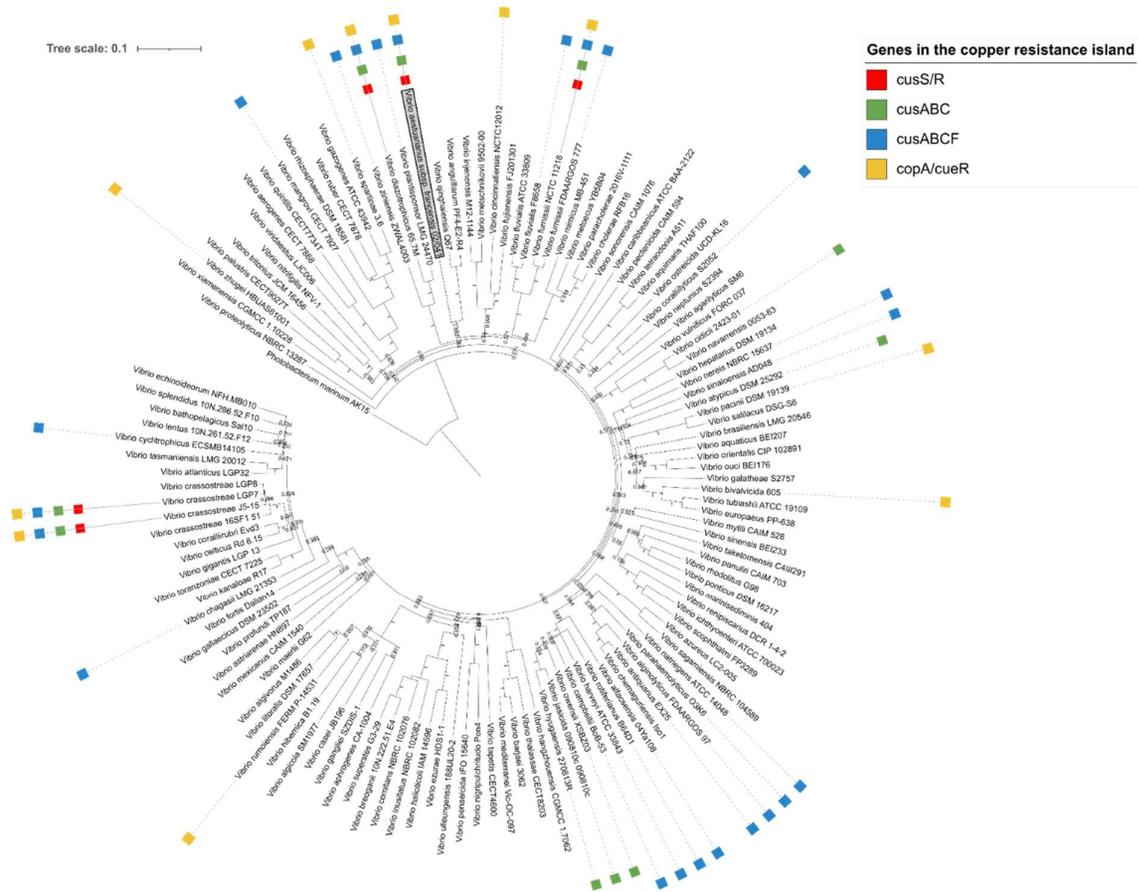


Figure S8: Genes of the copper resistance island occurrence in a same genomic region in 128 vibrio strains. *Va francensis* strain 02\_041 is highlighted.

Les tableaux supplémentaires sont disponibles dans un document en ligne, à l'adresse suivante :

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1LsP2QPjiRrcZ3yEAJZIIQrUB71TEHBwy6FsLvER9WI/edit?usp=sharing>



### Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 3

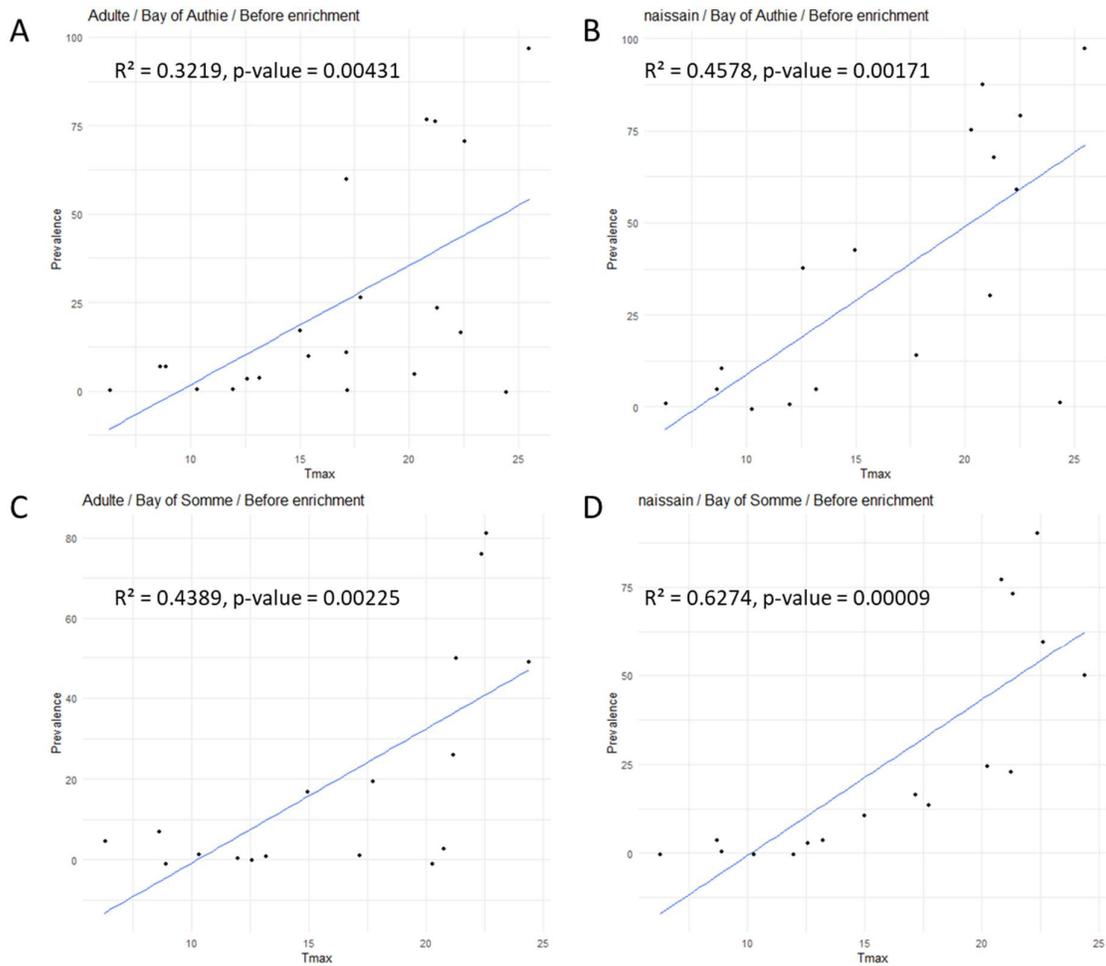


Figure S1: **Linear regression between the prevalence in adult cockles (A and C) and in spat (B and D) and the maximum air temperature, in Bay of Authie (A and B) and Bay of Somme (C and D).**

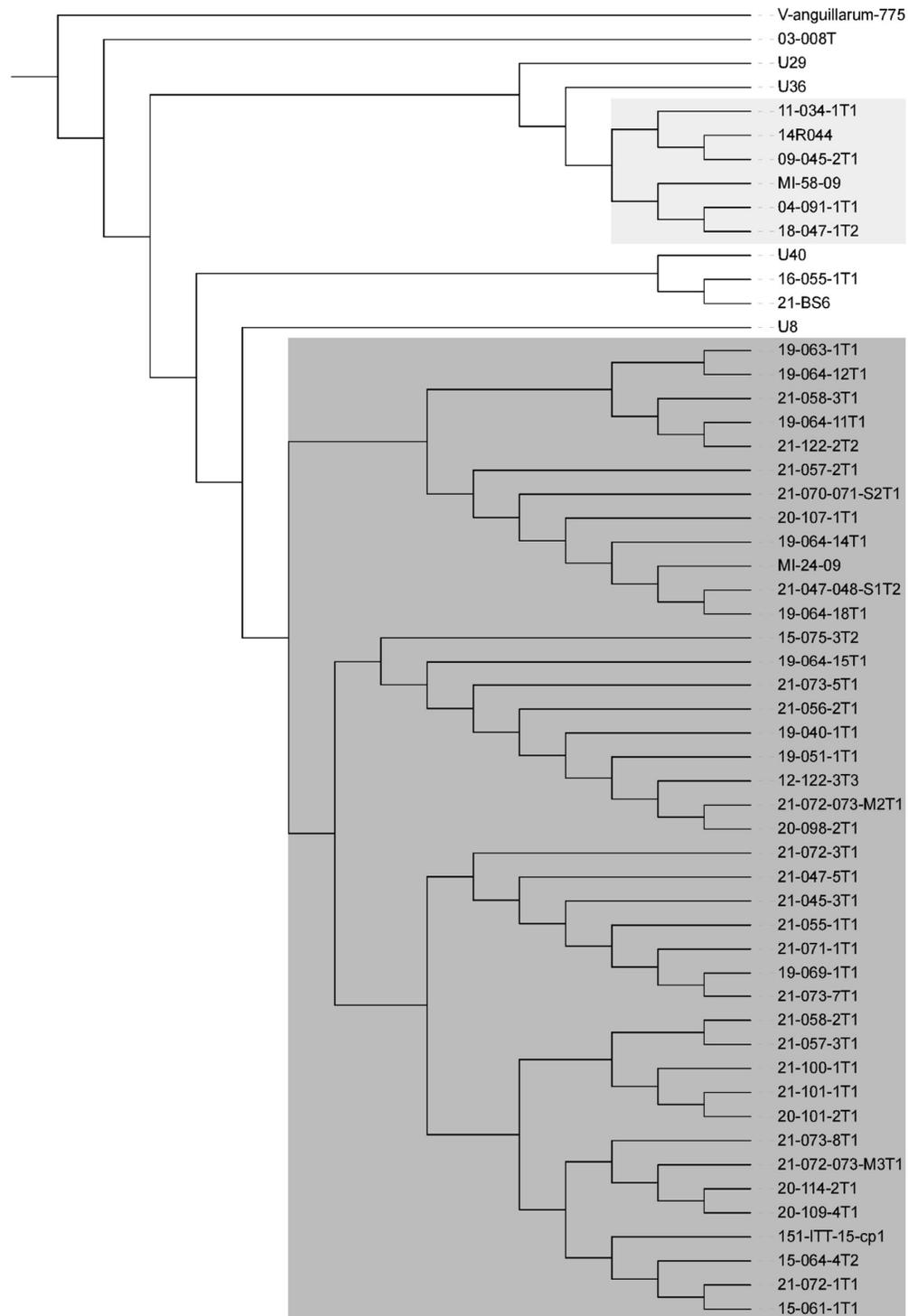


Figure S2 : **Phylogenetic tree of *V. aestuarianus* species** calculated with RAxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014). According to Bayesian information criterion (BIC), the best-fit model was TVM (4 transversion rates, 1 transition rate), as determined by JmodelTest (Posada, 2008). *V. anguillarum* strain 775 was used as outgroup to root the tree. Core genome alignment generated using ParSNP (Treangen et al., 2014) was filtered from recombinant segments using ClonalFrameML (Didelot & Wilson, 2015). Oyster isolates (*V. aestuarianus francensis*) are highlighted in light grey. Cockles isolates (*V. aestuarianus cardii*) are highlighted in dark grey.

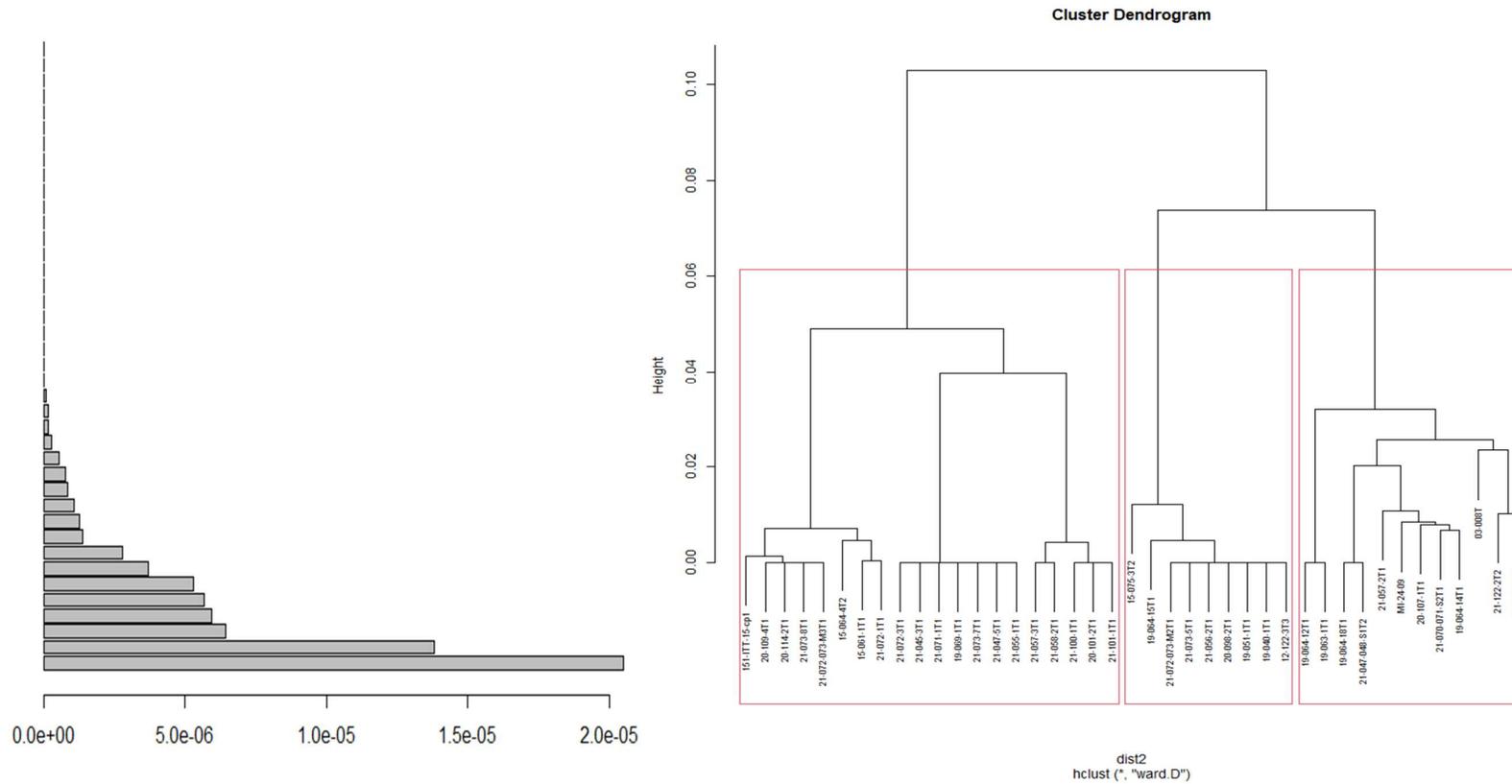


Figure S3 : Cluster analysis of samples by genetic distance performed via Ward-linkage allowed to define three groups in *V. aestuarianus cardii* population.

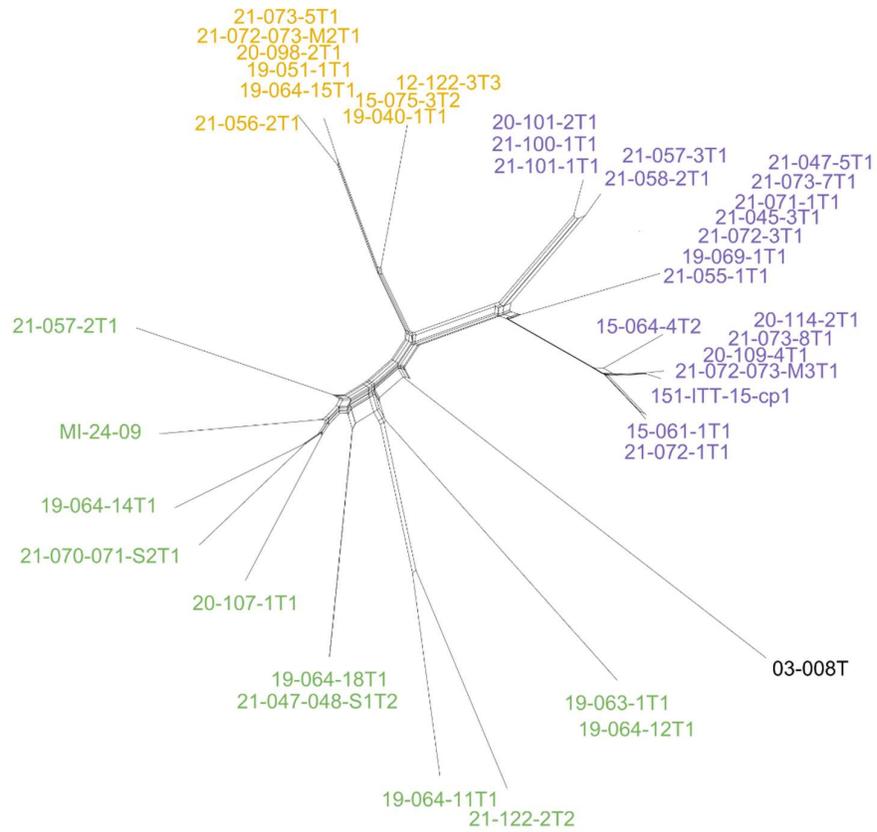
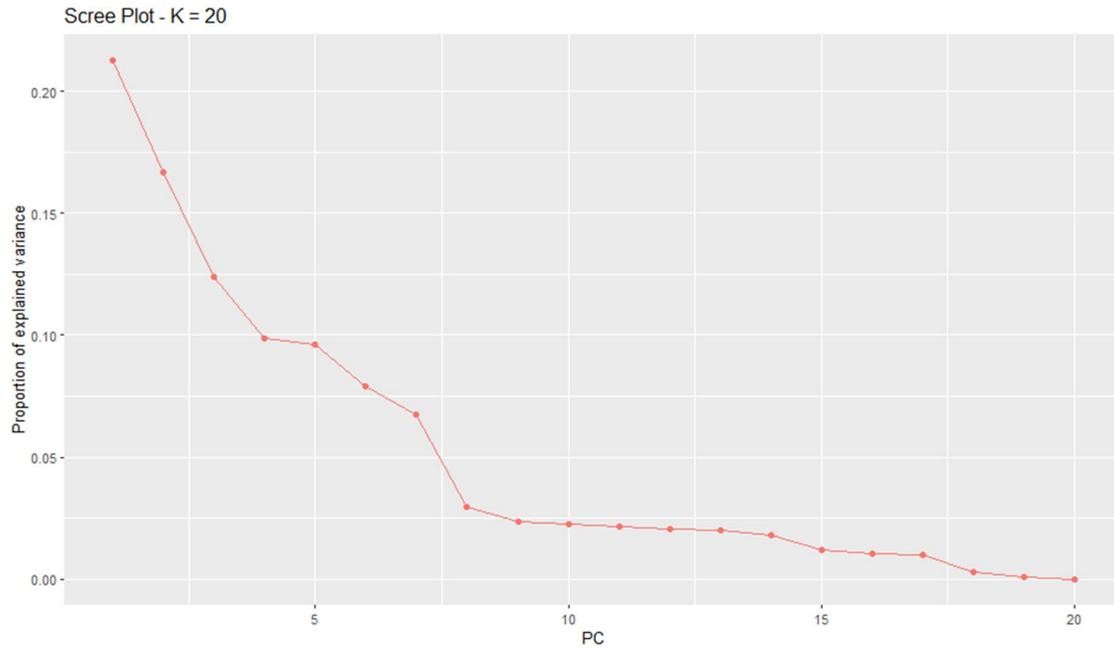


Figure S4: **Impact of homologous recombination on *V. aestuarianus cardii* genomes** shown by the presence of alternative pathways in the phylogenetic network constructed from core genome alignment. Strains assigned to group A, B and C have their labels colored in yellow, blue and green respectively.

A



B

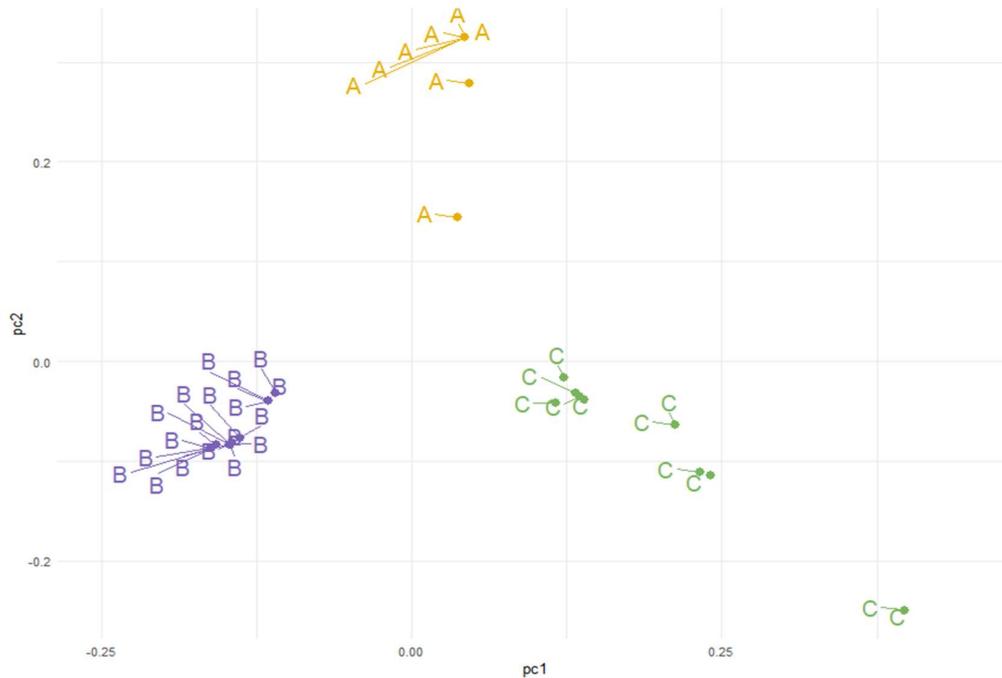


Figure S5 : **Genome scan analysis of *V. aestuarianus cardii* strains for detecting SNPs involved in population structure.** A) "Scree-plot" diagram established between the number of PCA dimensions and the eigenvalues. B) plot of the first two principal components (PC). The 40 *V. aestuarianus cardii* strains are represented by points and colored according to the group they belong to : group A in yellow, group B in blue and group C in green.

Les tableaux supplémentaires sont disponibles dans un document en ligne, à l'adresse suivante :

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1RfeS0O8VsNAO5R025ZcvpQz4H5JH4rnFleM7TcygyMg/edit?usp=sharing>

## **Émergence, dynamique évolutive et écologie de lignées pathogènes de bivalves marins au sein de l'espèce bactérienne *Vibrio aestuarianus***

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est l'espèce de bivalve la plus cultivée dans le monde et est confrontée à des maladies infectieuses impliquant des bactéries du genre *Vibrio*. Parmi ces *Vibrio*, l'espèce *V. aestuarianus*, initialement décrite en 1983 comme bactérie des environnements estuariens, est associée à des mortalités d'huîtres creuses adultes en Europe depuis 2001. En 2012, des mortalités de coques adultes *Cerastoderma edule* associées à cette espèce ont également été rapportées. Cependant, les processus ayant mené à l'émergence des lignées pathogènes de bivalves sont restés inconnus. Au cours de cette thèse, nous avons cherché à préciser (1) la structure des populations de *V. aestuarianus* et leurs déterminants génomiques ; (2) les événements évolutifs ayant participé à l'émergence et l'évolution des sous-espèces, et (3) les habitats, cycles et espèces sensibles à *V. aestuarianus*. Nous avons montré que les souches de *V. aestuarianus* pathogènes se répartissent dans deux sous-espèces aux histoires évolutives différentes. *V. aestuarianus francensis*, décrite en 2008, regroupe les souches pathogènes d'huîtres alors que *V. aestuarianus cardii* regroupe les souches pathogènes de coques. Les deux sous-espèces provoquent des maladies dans leurs populations d'hôtes en été, et la température a été identifiée comme un facteur favorable au développement des maladies. *V. aestuarianus francensis* impacte l'ostréiculture et nous montrons que deux lignées distinctes se sont propagées à l'échelle de l'Europe depuis au moins 20 ans. Cette sous-espèce se caractérise par une faible diversité génétique et une évolution essentiellement clonale. Les souches de *V. aestuarianus francensis* ont un mode de vie de spécialiste, avec un habitat restreint aux huîtres. L'un des événements ayant favorisé son émergence pourrait être l'acquisition et l'intégration génomique d'un élément génétique mobile contenant des gènes codant des protéines impliquées dans l'export du cuivre. Actuellement, la sous-espèce *V. aestuarianus cardii* impacte les coques uniquement en France. La diversité phénotypique et génétique dans cette sous-espèce est plus importante que dans la sous-espèce *V. aestuarianus francensis*. Plusieurs groupes génétiques présentant des niveaux de virulence différents envers les coques ont pu être identifiées et la comparaison des génomes entre ces groupes a permis d'identifier des facteurs de virulence potentiels.

## **Emergence, evolutionary dynamics and ecology of pathogenic lineages of marine bivalves within the bacterial species *Vibrio aestuarianus***

The oyster *Crassostrea gigas* is the most cultured species of bivalve in the world and is confronted with infectious diseases involving bacteria of the genus *Vibrio*. Among these *Vibrio*, the species *V. aestuarianus*, initially described in 1983 as a bacterium of estuarine environments, has been associated with mortality of adult oysters in Europe since 2001. In 2012, mortality of adult cockles *Cerastoderma edule* associated with this species have also been reported. However, the processes leading to the emergence of pathogenic bivalve lineages have remained unknown. During this thesis, we sought to clarify (1) the population structure of *V. aestuarianus* and their genomic determinants, (2) the evolutionary events that participated in the emergence and evolution of the subspecies, and (3) the habitats, cycles and species sensitive to *V. aestuarianus*. We have shown that pathogenic *V. aestuarianus* strains fall into two subspecies with different evolutionary histories. *V. aestuarianus francensis*, described in 2008, includes pathogenic oyster strains while *V. aestuarianus cardii* includes pathogenic cockle strains. Both subspecies cause disease in their host populations in summer, and temperature has been identified as a favorable factor for disease development. *V. aestuarianus francensis* impacts oyster farming and we show that two distinct lineages have spread across Europe for at least 20 years. This subspecies is characterized by low genetic diversity and essentially clonal evolution. Strains of *V. aestuarianus francensis* have a specialist lifestyle, with a habitat restricted to oysters. One of the events that favored its emergence could be the acquisition and genomic integration of a mobile genetic element containing genes coding for proteins involved in copper export. Currently, the subspecies *V. aestuarianus cardii* impacts cockles only in France. The phenotypic and genetic diversity in this subspecies is greater than in the subspecies *V. aestuarianus francensis*. Several genetic groups with different levels of virulence towards cockles could be identified and the comparison of genomes between these groups made it possible to identify potential virulence factors.