



HAL
open science

Élucidation des mécanismes moléculaires de colonisation d'organismes marins par le Pathogène *Vibrio Harveyi*

Amandine Morot

► **To cite this version:**

Amandine Morot. Élucidation des mécanismes moléculaires de colonisation d'organismes marins par le Pathogène *Vibrio Harveyi*. Bactériologie. Université de Bretagne Sud, 2023. Français. NNT : 2023LORIS657 . tel-04554601

HAL Id: tel-04554601

<https://theses.hal.science/tel-04554601>

Submitted on 22 Apr 2024

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BRETAGNE SUD

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

Par

Amandine MOROT

Élucidation des mécanismes moléculaires de colonisation d'organismes marins par le pathogène *Vibrio harveyi*

Thèse présentée et soutenue à Lorient, le 17 Mars 2023

Unité de recherche : Laboratoire des sciences de l'environnement marin, LEMAR – UMR 6539
Laboratoire de biotechnologie et chimie marines, LBCM – EMR 6076

Thèse N° : 657

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Agnès Travers Chercheur, IFREMER, IHPE, Université de Montpellier

Julien Verdon Maître de conférences, EBI, Université de Poitiers

Composition du Jury :

Examineurs :	Sylvie Rebuffat	Professeur des Universités, MNHN, CNRS, Paris
	Romain Briandet	Directeur de recherche, MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas
	Sophie Gaudriault	Directrice de Recherche, DGIMI, INRAE, Université de Montpellier

Directeur de thèse	Alain Dufour	Professeur des Universités, LBCM, Université de Bretagne Sud
Co-directeur de thèse	Christine Paillard	Directrice de Recherche, LEMAR, CNRS, Université de Bretagne Occidentale

Co-directeur de thèse	François Delavat	Maître de conférences, US2B, Nantes Université
-----------------------	------------------	--

Invitée

Sophie Rodrigues	Maître de conférences, LBCM, Université de Bretagne Sud
------------------	---

REMERCIEMENTS

Il convient dans un premier temps de remercier l'Université de Bretagne Sud et la Région Bretagne pour avoir financé ces travaux de thèse. Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer ces travaux. Merci à Marie-Agnès Travers et Julien Verdon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à Romain Briandet, Sophie Gaudriault et Sylvie Rebuffat d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse. Merci pour le temps consacré à l'examen de ce manuscrit.

J'adresse un immense merci à mes directeurs de thèse et encadrants pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions possibles, ainsi qu'à leur disponibilité, leur gentillesse, leur aide et leurs encouragements qu'ils ont pu me donner tout au long de ces travaux. J'adresse toute ma reconnaissance à Alain Dufour qui a dirigé cette thèse, pour sa patience, ses précieux conseils, son calme à toute épreuve ainsi que pour le partage de ses connaissances et qui auront permis de mener à bien ces travaux de thèse. Je remercie infiniment Christine Paillard qui a co-dirigé cette thèse, pour sa joie de vivre, son enthousiasme à l'égard de mes travaux, de m'avoir tant appris sur les ormeaux ainsi que pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir et le temps que tu as consacré à cette thèse. J'exprime toute ma gratitude à François Delavat, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ses travaux qui ont commencé lors de mon stage de Master 2. Je tiens aussi à le remercier pour les (très) nombreuses connaissances qu'il m'a transmises sur la génétique bactérienne, sa disponibilité sans égal même à plusieurs kilomètres de distances, pour le soutien qu'il a pu m'apporter et pour son dynamisme. Je remercie aussi particulièrement Sophie Rodrigues qui a rejoint l'aventure en cours de route mais qui a su m'apporter tant de bons conseils, qui a toujours su se rendre disponible et qui m'a tant appris sur l'univers des biofilms.

Merci à vous tous pour la qualité de l'encadrement qui a fait que ces travaux de thèse ont pu être menés à bout.

Je tiens à remercier tous les membres du LEMAR, à toute ces personnes avec qui j'ai pu échanger sur de nombreux sujets associés au monde marin. Je tiens particulièrement à remercier Adeline Bidault pour son aide sans faille, sa gentillesse, sa disponibilité, sans toi j'aurais bien eu du mal à mener à bien certaines expérimentations. Je tiens aussi à remercier Christophe Lambert, Nelly Le Goïc et Morgan Perennou pour avoir toujours su répondre présents pour me former et m'aider à mettre au point les expérimentations qui m'étaient totalement inconnues. Je tiens aussi à remercier Vianney Pichereau pour avoir su accorder de longues heures à mes travaux de recherches ainsi que pour ses précieux conseils.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du LBCM qui m'ont accueillie dans leur petite famille au cours de ma dernière année de thèse. Merci à Isabelle, Alexis, Fabrice, Fabienne, Karine, Mathieu, Laure, Gaël, Dalyal, Chrystèle et Pierre. Merci de m'avoir fait sentir comme à la maison dans une équipe qui m'était totalement inconnue. Un merci spécial à Clément pour ses nombreuses blagues, le bon café qu'il nous a fait et ses temps passés dans le bureau des « jeunes ».

Bien évidemment j'adresse un immense merci à tous les amis que j'ai pu me faire au cours de ces trois dernières années. Vous tous savez qu'une thèse est emplie d'un sentiment de solitude qui a pu être surmonté par les relations que nous avons créées, les discussions que nous avons échangées et les moments que nous avons partagés. Merci à la petite Alex pour ton enthousiasme et les précieux conseils que tu as su me donner. Un grand merci à Gogo et Jenn pour tous ces moments et le soutien sans faille dont vous avez fait preuve que ce soit la semaine, le soir ou le week-end, ces années au LEMAR auraient été certainement bien plus ennuyantes

sans vous. Votre gentillesse, les longues discussions que nous avons partagées ainsi que votre humour vont manquer à mon quotidien ! Merci à Florette et à la petite Marie pour votre joie de vivre, votre gentillesse, votre disponibilité, votre soutien, désolée je n'ai pas assez de vocabulaire pour vous signifier toute ma gratitude mais vraiment, merci pour ces moments ! Merci aux petits potes, Caro, Juju (le chèvre mûre, bon dieu), Melvasse et Lelouan pour tous ces cafés, ces bières et ti-punch, ces parties de palets et de fléchettes et votre bonne humeur infinie. Merci aussi à Aïssata pour ton rire communicatif et pour les discussions que nous avons pu partager. Enfin, merci à tous mes amis du labo avec qui j'ai pu partager de bons moments et encore désolée pour mes karaokés. Alors merci à Clara, Rémi, Thotho, Mariana, petite Alex, Alex, Valentin, Lulu, Pietro, Sausau, Guigou, Guillaume et Coraline ainsi qu'aux tout jeunes doc Pioupiou et Cédric bonne chance pour vos thèses, en vrai on s'y fait.

Enfin, je remercie infiniment ma famille qui malgré la distance et l'incompréhension de ce que peut représenter un travail de thèse ont toujours su être à l'écoute et ont été d'un précieux soutien tout au long de cette thèse. Merci à mes parents, Papou et Mamou et à mes frères, Kiki et Nico. Une pensée va aussi évidemment à mes grands-parents, Maurice Lilie et Louisette qui ont toujours été là à m'écouter leur expliquer en quoi les bactéries peuvent être fascinantes et en quoi les petits billys peuvent être si drôles. Et pour finir je tiens aussi à remercier les Savoyards, les Bouchet, les Desrè et Marion. J'adresse aussi une pensée pour la petite nouvelle qui va bientôt venir agrandir ce clan Morot.

Merci à tous !

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. ECOLOGIE ET VIRULENCE DES <i>VIBRIO</i>	2
1.1 Biologie du genre <i>Vibrio</i>	2
1.1.1. Histoire des <i>Vibrio</i>	2
1.1.2. Mode de vie des <i>Vibrio</i>	3
1.1.3. Phylogénie du genre <i>Vibrio</i>	4
1.1.4. Caractéristiques phénotypiques	6
1.1.5. Caractéristiques génétiques.....	7
1.2 Pathogénicité du clade <i>Harveyi</i>	7
1.2.1. Pathogénicité : définition	7
1.2.2. Espèces pathogènes du clade <i>Harveyi</i>	9
1.3 Facteurs de virulence du clade <i>Harveyi</i>	14
1.3.1. Colonisation de l'organisme hôte	14
1.3.2. Multiplication, invasion et dommages chez l'hôte	20
1.3.3. Échappement au système immunitaire de l'hôte.....	26
1.3.4. Régulation des gènes de virulence : quorum sensing	27
2. BIOFILMS BACTERIENS	31
2.1 Définition	31
2.2 Formation de biofilm	32
2.2.1. Adhésion	33
2.2.2. Maturation du biofilm	35
2.2.3. Dispersion du biofilm.....	41
2.3 Biofilm et virulence	42
3. LA VIBRIOSE DE L'ORMEAU	44
3.1 Généralités sur l'hôte : <i>Haliotis</i> sp.	44
3.1.1. Anatomie.....	45
3.1.2. Reproduction	48
3.1.3. Système immunitaire	48
3.2 Vibrioses causées par le clade <i>Harveyi</i> chez les espèces de <i>Haliotis</i>	52
3.2.1. Vibrioses causées par <i>V. parahaemolyticus</i>	52
3.2.2. Vibrioses causées par <i>V. alginolyticus</i>	53
3.2.3. Vibrioses causées par <i>V. harveyi</i>	54
3.3 Étude du modèle <i>V. harveyi</i> – <i>H. tuberculata</i>	55

3.3.1.	Isolement de <i>V. harveyi</i> ORM4	55
3.3.2.	Cycle infectieux de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans l'ormeau européen <i>H. tuberculata</i> ..	56
3.3.3.	Facteurs influençant l'infection causée par <i>V. harveyi</i> ORM4	58

OBJECTIFS DE TRAVAIL

4.	OBJECTIFS DE TRAVAIL	65
-----------	-----------------------------------	-----------

MATERIELS ET METHODES

5.	CULTURE BACTERIENNE	67
5.1.	Conditions de culture.....	67
6.	CARACTERISATION PHENOTYPIQUE	67
6.1.	Caractérisation des temps de doublements.....	67
6.2.	Motilité	69
6.3.	Formation de biofilm	69
6.3.1.	Culture de biofilm en microplaque.....	69
6.3.2.	Culture de biofilm en chambre à flux.....	70
6.4.	Production de polysaccharides.....	73
7.	CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE <i>V. HARVEYI</i> ET <i>H. TUBERCULATA</i>	73
7.1.	Animaux.....	73
7.2.	Infections par balnéation.....	73
7.3.	Prélèvements.....	74
7.3.1.	Prélèvement de branchies	74
7.3.2.	Prélèvement de l'hémolymphe	74
7.4.	Étude de la colonisation de <i>H. tuberculata</i> par <i>V. harveyi</i>	74
7.5.	Étude de la réponse immunitaire de <i>H. tuberculata</i> après infection par <i>V. harveyi</i> ..	76
7.5.1.	Analyse cellulaire par cytométrie en flux.....	77
8.	BIOLOGIE MOLECULAIRE	78
8.1.	Extraction d'acides nucléiques	78
8.1.1.	Extraction d'ADN	78
8.1.2.	Extraction d'ARN et séquençage	79
8.2.	Réactions de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	84
8.3.	Transformations bactérienne	85
8.3.1.	Transformation par électroporation.....	85

8.3.2.	Transformation par choc thermique	86
8.3.3.	Transformation par conjugaison tri-parental.....	86
8.4.	Mutagenèse par double recombinaison homologue chez <i>V. harveyi</i> ORM4	87
8.5.	Complémentation	90
8.6.	Biorapporteurs	91
8.6.1.	Construction de biorapporteurs	91
8.6.2.	Microscopie a épifluorescence	91

CHAPITRE I : IDENTIFICATION DE FACTEURS IMPLIQUES DANS LA VIRULENCE DE *V. HARVEYI* ORM4 LORS D'UNE INFECTION DE L'ORMEAU EUROPEEN *H. TUBERCULATA*

9.	INTRODUCTION DE L'ETUDE.....	95
10.	IDENTIFICATION DE GENES IMPLIQUES DANS LA MODULATION DE LA VIRULENCE DE <i>V. HARVEYI</i> ORM4, PATHOGENE DE L'ORMEAU EUROPEEN <i>H. TUBERCULATA</i> , PAR UNE APPROCHE DE MUTAGENESE CIBLEE.....	96
10.1.	Résumé de l'article	96
11.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES	113
11.1.	Identification de gènes associés à la virulence chez <i>V. harveyi</i> ORM4.....	113
11.2.	Caractérisation d'autres souches mutantes de <i>V. harveyi</i> ORM4	116
11.2.1.	Autres gènes associés au quorum sensing.....	116
11.2.2.	AphB	118
11.2.3.	Protéine de la membrane externe : ompV.....	119
11.2.4.	Régulateur de la synthèse du flagelle polaire chez les <i>Vibrio</i> : FlaK.....	120
12.	CONCLUSION.....	123

CHAPITRE II : ETUDE DE LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPEEN PAR *V. HARVEYI* ORM4

13.	INTRODUCTION DE L'ETUDE.....	127
14.	ÉTUDE DE LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPEEN PAR UNE SOUCHE PATHOGENE ET UNE SOUCHE NON-PATHOGENE DE <i>V. HARVEYI</i>	129
14.1.	Colonisation des Branchies	130
14.2.	Colonisation de l'hémolymphe.....	131
14.3.	Effet de <i>V. harveyi</i> sur les paramètres hémodocytes.....	132
15.	IMPLICATION DU SYSTEME DE SECRETION TYPE III ET DU QUORUM SENSING DANS LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPEEN PAR <i>V. HARVEYI</i> ORM4.....	134

15.1.	Implication du système de sécrétion type III dans la colonisation de l'ormeau européen	134
15.1.1.	Colonisation des branchies	134
15.1.2.	Colonisation de l'hémolymphe	135
15.2.	Influence du système de sécrétion de type III sur la réponse hémoctaire	136
15.3.	Implication du quorum sensing dans la colonisation de l'ormeau européen	137
15.3.1.	Colonisation des branchies	137
15.3.2.	Colonisation de l'hémolymphe	138
15.4.	Influence du quorum sensing sur la réponse hémoctaire.....	139
16.	CONCLUSION.....	141

CHAPITRE III : ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

17.	INTRODUCTION DE L'ETUDE.....	149
17.1.	Expériences préliminaires	150
18.	FORMATION DE BIOFILMS CHEZ <i>V. HARVEYI</i> ORM4	151
18.1.	Observations microscopiques du biofilm formé par <i>V. harveyi</i> ORM4	151
18.1.1.	Structure.....	151
18.1.2.	Distribution des composants de la matrice.....	152
18.2.	Identification des gènes impliqués dans la formation de biofilm chez <i>V. harveyi</i> ORM4	154
18.2.1.	Observation globale.....	155
18.2.2.	Gènes intervenant dans la motilité et l'attachement.....	157
18.2.3.	Gènes impliqués dans le système de quorum sensing	159
18.2.4.	Gènes associés à la synthèse de protéines extracellulaires	160
18.2.5.	Expression de gènes associés à la production de polysaccharides	162
18.3.	Validation des résultats de séquençage par RT-qPCR	163
19.	INFLUENCE DU QUORUM SENSING SUR LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ <i>V. HARVEYI</i> ORM4	165
19.1.	Étude de la formation de biofilm chez <i>V. harveyi</i> ORM4 $\Delta luxO$	165
19.1.1.	Impact du quorum sensing dans l'adhésion de <i>V. harveyi</i> ORM4.....	165
19.1.2.	Impact de la délétion du gène <i>luxO</i> sur la production de biofilm par <i>V. harveyi</i> ORM4	166
19.1.3.	Impact de la délétion de gène <i>luxO</i> sur la production des composants de la matrice	168

19.2.	Identification de gènes dérégulés chez <i>V. harveyi</i> ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm	170
19.2.1.	Implication du quorum sensing dans l'expression des gènes liés à la motilité et l'attachement	170
19.2.2.	Étude de la régulation de gènes associés à la synthèse et la sécrétion protéique par le quorum sensing au cours de la formation de biofilm	172
19.2.3.	Étude de la régulation de gènes associés à la production de polysaccharides par le quorum sensing lors de la formation de biofilm	174
20.	CONCLUSION.....	176
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	184
	ANNEXES.....	224

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNe	ADN extracellulaire
AI-2	Auto-inducteur 2
Amp	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNs	Petits ARN
Cm	Chloramphénicol
COG	Clusters of Orthologous Genes
<i>cps</i>	capsular polysaccharides
CqsA	Cholerae Quorum Sensing Auto-inducteur
DAP	Acide diaminopimélique
DCF	Dichlorofluorescéine
DCFH-DA	2', 7'-dichlorofluorescein diacetate
EMSF	Eau de mer stérile filtrée
FC	Fold-Change
FDR	False Discovery Rate
GFP	Green Fluorescent Protein
Glc	Glucose
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAI-1	<i>harveyi</i> auto-inducer 1
Km	Kanamycine
L-ara	L-arabinose
LB	Lysogeny Broth
LBS	Lysogeny Broth Salt
MAP-kinases	Mitogen-activated kinases
MCBL	Microscopie confocal à balayage laser
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis
MSHA	Hémagglutinine sensible au mannose
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NGS	Séquençage nouvelle génération
O ₂ -	Ion superoxide

OMP	Protéines de la membrane externe
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaînes
PRR	Pattern Recognition Receptors
qPCR	PCR quantitative
<i>rbm</i>	rugosity and biofilm structure modulators
RNASeq	Séquençage de l'ARN
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SMEL	Synergie Mer et Littoral
SOD	Super-oxyde dismutase
SOEing PCR	Splicing by Overlap Extension PCR
ST36	Multilocus sequence type 36
<i>syp</i>	Symbiosis polysaccharides
T2SS	Système de sécrétion type II
T3SS	Système de sécrétion type III
T4P	Pilus de type IV
T4SS	Système de sécrétion type IV
T6SS	Système de sécrétion type VI
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-sucrose
TDH	Hémolysine thermostable directe
THL	Hémolysine thermolabile
TLR	Toll-like receptors
TRH	Hémolysine liée à la TDH
Trim	Triméthoprim
U.A	Unités arbitraires
UFC	Unité Formant Colonies
<i>vps</i>	Vibrio polysaccharide synthesis

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Phylogénie du genre <i>Vibrio</i>	5
Figure 2 : Postulats de Koch permettant de démontrer qu'un microorganisme est responsable d'une pathologie, auquel se sont ajoutés les postulats de Falkow en 1988 et de Casadevall et Pirofski en 2003.....	9
Figure 3 : Propagation mondiale des souches <i>V. cholerae</i> El Tor et <i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6.....	12
Figure 4 : Double système flagellaire retrouvé chez certaines bactéries appartenant au genre <i>Vibrio</i> . 15	
Figure 5 : Hiérarchisation de la transcription des gènes flagellaires chez <i>V. parahaemolyticus</i>	16
Figure 6 : Architecture des pili associés à l'adhésion chez les bactéries à Gram négatifs. Représentation schématique des pili synthétisés par la voie des chaperone-usher.	18
Figure 7 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III de <i>V. parahaemolyticus</i> (A) et des voies de régulations des T3SS1 (B) et T3SS2 (C) (d'après Calder <i>et al.</i> , 2014).....	24
Figure 8 : Représentation des trois voies de signalisation du quorum sensing chez <i>V. campbellii</i> , partagées par les espèces appartenant au clade <i>Harveyi</i>	29
Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien.....	33
Figure 10 : Mécanismes généraux de l'adhésion des microorganismes aux surfaces.....	34
Figure 11 : Organisation des clusters de gènes codant les protéines responsables de la production des polysaccharides VPS et du cluster <i>rbm</i> codant les protéines de la matrice chez <i>V. cholerae</i>	37
Figure 12 : Représentations schématiques du cluster <i>syp</i> et du modèle de régulation chez <i>V. fischeri</i>	38
Figure 13 : Anatomie de l'ormeau. Photographies d'une coquille de <i>H. tuberculata</i> en vue ventrale (A) et dorsale (B).....	45
Figure 14 : Zones géographiques touchées par les mortalités d'ormeaux européens <i>H. tuberculata</i> entre 1997 et 1999 (d'après Nicolas <i>et al.</i> , 2002).....	55
Figure 15 : Observations au microscope à épifluorescence de <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP dans les tissus et l'hémolymphe d'ormeaux Européen <i>H. tuberculata</i> après 48h d'infection.....	57
Figure 16 : Influence de la température de l'eau de mer sur les mortalités d'ormeaux européens <i>H. tuberculata</i> , en réponse à une infection par balnéation avec <i>V. harveyi</i> ORM4 (d'après Travers <i>et al.</i> , 2009a).....	59
Figure 17 : Schéma général du cycle infectieux de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans l'ormeau européen <i>H. tuberculata</i> (adapté de Travers <i>et al.</i> , 2008a ; Cardinaud <i>et al.</i> , 2014).	62
Figure 18 : Système de chambres à flux pour la formation de biofilms en conditions dynamique (Weiss Nielsen <i>et al.</i> , 2011).	71

Figure 19 : Schéma du design expérimental utilisé pour déterminer l'influence de différentes souches de <i>V. harveyi</i> sur les paramètres hématocytaires.	76
Figure 20 : Schéma du design expérimental utilisé pour déterminer les gènes associés à la virulence de <i>V. harveyi</i> ORM4 et ceux associés à la production de biofilm.....	80
Figure 21 : Schéma de la construction du plasmide suicide dérivé du pLP12, utilisé pour la mutagenèse dirigée.....	87
Figure 22 : Principe du clonage à l'aide du kit NEBuilder HiFi DNA Assembly.	88
Figure 23 : Principe de la mutagenèse par double recombinaison homologue entre le plasmide suicide dérivé du pLP12 et le chromosome de <i>V. harveyi</i> ORM4.....	89
Figure 24 : Étude des phénotypes impactés par la délétion du gène <i>flaK</i> chez <i>V. harveyi</i> ORM4.....	122
Figure 25 : Concentrations bactériennes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> LMG 7890 transformées avec le pFD085 dans les branchies d' <i>H. tuberculata</i> après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation.....	130
Figure 26 : Concentrations bactériennes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> LMG 7890 transformées avec pFD085 dans l'hémolymphe d' <i>H. tuberculata</i> , après 24 h(A) et 48 h (B) d'infection par balnéation	131
Figure 27 : Variations des paramètres hématocytaires mesurés en cytométrie en flux après 24 et 48 h d'infection de <i>H. tuberculata</i> avec deux souches de <i>V. harveyi</i>	132
Figure 28 : Concentrations bactériennes des souches <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>exsA</i> transformées par pFD085 dans les branchies d' <i>H. tuberculata</i> , après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation.....	135
Figure 29 : Concentrations bactériennes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>exsA</i> transformées par pFD085 dans l'hémolymphe d' <i>H. tuberculata</i> après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Notez la différence d'échelle entre les différents panels.	136
Figure 30 : Variations des paramètres cellulaires des hémocytes mesurés à partir d'hémolymphe d'ormeaux européens après 24 et 48 h d'infection par balnéations avec <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> Δ <i>exsA</i> transformées par pFD085.....	137
Figure 31 : Concentrations bactériennes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> Δ <i>luxO</i> transformées par pFD085 dans les branchies d' <i>H. tuberculata</i> , après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation....	138
Figure 32 : Concentrations bactériennes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>luxO</i> transformées par pFD085 dans l'hémolymphe d' <i>H. tuberculata</i> après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation.. ..	139
Figure 33 : Fluctuations des paramètres cellulaires des hémocytes mesurés à partir d'hémolymphe d'ormeaux européens après de 24 h et 48 h d'infection par balnéations avec <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>luxO</i> transformées par pFD085.. ..	140

Figure 34 : Observation en microscopie confocal à balayage laser du biofilm formé par <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP après 24 h de cultures à 20°C.....	152
Figure 35 : Composants de la matrice d'un biofilm de 24 h de <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP marqués au CalcoFluor White (polysaccharides β 1-3 et β 1-4), SyproRuby (protéines) ou DDAO (ADNe).....	153
Figure 36 : Distribution des gènes différentiellement exprimés chez <i>V. harveyi</i> ORM4 en condition biofilm par classes fonctionnelles (COG) (A) et pourcentage de gènes sur- et sous-exprimés pour chaque classe COG (B) en condition biofilm comparé à la condition planctonique, utilisée comme référence.	156
Figure 37 : Heatmap de l'analyse du transcriptome de <i>V. harveyi</i> ORM4 en conditions biofilm et planctonique sur une sélection de 64 gènes associés à la motilité et l'adhésion (p-value ajustée < 0,05).	158
Figure 38 : Validation par RT-qPCR des valeurs d'expression différentielle de 8 gènes. Corrélation des valeurs de \log_2 fold change (\log_2 FC) d'expression de gènes obtenues en qRT-PCR et RNASeq.....	164
Figure 39 : Capacité d'adhésion de <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ luxO-GFP après deux heures d'adhésion sur lamelle de verre en chambre à flux.	166
Figure 40 : Formation de biofilm par <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ luxO-GFP, après 24 heures de culture en chambre à flux à 20°C en présence d'un flux constant de LBS (2,5mL/h).....	167
Figure 41 : Composants de la matrice extracellulaire des biofilms de 24 h de <i>V. harveyi</i> ORM4-GFP et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ luxO-GFP.....	169
Figure 42 : Heatmap de l'analyse des transcriptomes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ luxO planctoniques sur une sélection de 55 gènes associés à la motilité et l'adhésion (p-value ajustée < 0,05).....	171
Figure 43 : Heatmap de l'analyse des transcriptomes de <i>V. harveyi</i> ORM4 et <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ luxO formant du biofilm sur une sélection de 125 gènes associés à la production et sécrétion protéique (p-value ajustée < 0,05).....	173

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Facteurs de virulence retrouvés chez les espèces de <i>Vibrio</i> appartenant au clade <i>Harveyi</i> associés à la multiplication, l'invasion et aux dommages provoqués chez l'hôte.	25
Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette thèse.....	68
Tableau 3: Fluorochromes utilisés au cours de cette thèse pour l'observation au MCBL.	72
Tableau 4 : Plasmides utilisés au cours de cette étude.	79
Tableau 5 : Identification de gènes dans le génome de <i>V. harveyi</i> ORM4 par comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique de ceux associés à la multiplication, invasion et aux dommages provoqués chez l'hôte par les espèces de <i>Vibrio</i> appartenant au clade <i>Harveyi</i>	114
Tableau 6 : Gènes identifiés chez <i>V. harveyi</i> ORM4 appartenant au système du quorum sensing et pourcentages d'identité nucléotidique partagés avec ceux retrouvés chez <i>V. campbellii</i> BB120.	118
Tableau 7 : Expressions des gènes impliqués dans la synthèse du T3SS lorsque <i>V. harveyi</i> ORM4 forme du biofilm.....	160
Tableau 8 : Expression des gènes impliqués dans la synthèse du T2SS lorsque <i>V. harveyi</i> ORM4 forme du biofilm.....	162
Tableau 9 : Expression des gènes appartenant au cluster <i>syp</i> chez <i>V. harveyi</i> ORM4 formant du biofilm.	163
Tableau 10 : Expression des gènes associés à la production de polysaccharides chez <i>V. harveyi</i> ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm.	175

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Les secteurs de la pêche et de l'aquaculture participent d'une façon non négligeable à la nutrition humaine. En 2020, la production aquacole mondiale a atteint une valeur de 214 millions de tonnes d'organismes aquatiques élevés dans un but d'alimentation, une valeur 60 % supérieure à la moyenne dans les années 1990. Ces produits alimentaires d'origine aquatique participent de ce fait à la sécurité alimentaire en apportant une source de protéines et d'acides gras oméga 3 essentiels (FAO, 2022).

Néanmoins, la dégradation des écosystèmes et la crise climatique menace la sécurité alimentaire en impactant les secteurs de la pêche et de l'aquaculture (Froehlich *et al.*, 2018). En effet, le réchauffement océanique observé au cours de ce dernier siècle, qui se traduit par l'augmentation des températures à la surface des océans, va favoriser la prolifération de microorganismes dans l'environnement aquatique. C'est notamment le cas pour certaines espèces bactériennes appartenant au genre *Vibrio* qui sont capables de causer des infections chez un grand nombre d'organismes aquatiques, aboutissant parfois à des épisodes de mortalités importants à travers le monde (Sampaio *et al.*, 2022). Leur prolifération est directement dépendante de la température et elles vont se développer préférentiellement à des températures supérieures à 15°C, représentant une menace sanitaire actuelle et qui sera accrue dans le futur (Vezzulli *et al.*, 2015). De plus, la consommation d'organismes aquatiques infectés par les *Vibrio* entraînent des zoonoses touchant l'Homme (Froehlich and Daines, 2020). C'est pourquoi il est nécessaire aujourd'hui d'étudier et de comprendre les dynamiques d'infections causées par les espèces appartenant au genre *Vibrio*, dans ce contexte de réchauffement océanique.

1. ECOLOGIE ET VIRULENCE DES *VIBRIO*

1.1 BIOLOGIE DU GENRE *VIBRIO*

1.1.1. HISTOIRE DES *VIBRIO*

En 1854, l'anatomiste italien Fillippo Pacini isola à partir de patients l'agent pathogène responsable du choléra, *Vibrio cholerae*. Il lui attribua le terme de « *Vibrio* » à cause du caractère vibratoire du bacille observé. Cette découverte sera confirmée 30 ans plus tard par les travaux de Robert Koch, qui remarqua la présence constante d'un bacille dans les tissus intestinaux de patients atteints de choléra. Cette découverte fut la première description d'une bactérie du genre *Vibrio*. Par la suite, les analyses biochimiques ont amené à l'identification de nombreuses nouvelles espèces appartenant au genre *Vibrio* (Davis and Park, 1962). À ce jour, 191 espèces se rattachant à ce genre ont pu être décrites (Figure 1) (Jiang *et al.*, 2021). Les bactéries faisant partie du genre *Vibrio* sont prédominantes dans le milieu marin et sont retrouvées sous forme planctonique ou liées à d'autres bactéries et/ou des surfaces au sein de biofilms (Thompson *et al.*, 2006 ; Yildiz and Visick, 2009 ; Osuolale and Okoh, 2018 ; Sampaio *et al.*, 2022). Grâce à leurs capacités à produire une grande variété d'enzymes, leur permettant d'utiliser une diversité importante de substrats, ces bactéries apparaissent comme étant essentielles au recyclage de la matière organique dans les environnements aquatiques (Takemura *et al.*, 2014). Cependant, elles sont considérées comme l'un des agents pathogènes le plus important puisqu'elles peuvent menacer aussi bien la santé des organismes marins que la santé humaine. Parmi les espèces de *Vibrio*, 12 sont reconnues comme étant pathogènes de l'Homme (Sampaio *et al.*, 2022). Les *Vibrio* sont également responsables de mortalité touchant les organismes marins, infectant les vertébrés comme les invertébrés et de ce fait, provoquent de fortes pertes économiques dans le monde aquacole (Austin and Zhang, 2006 ; Austin, 2010). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* représentent les espèces pathogènes les plus connues et étudiées. De plus, l'augmentation de la température des océans

favorise l'émergence de nouvelles vibrioses et c'est pourquoi de nombreuses études s'intéressent aux bactéries pathogènes appartenant à ce genre (Sampaio *et al.*, 2022).

1.1.2. MODE DE VIE DES *VIBRIO*

Les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont ubiquitaires de l'environnement aquatique. Elles peuvent être retrouvées dans les estuaires, les eaux marines côtières, les sédiments, ainsi que dans les infrastructures aquacoles, sous forme libre ou alors associées à des organismes marins (Thompson *et al.*, 2004). Une des raisons de leur omniprésence dans l'environnement marin peut s'expliquer par leurs interactions avec les microalgues. En effet, il a été montré qu'une libération importante de nutriments, résultants des blooms de microalgues pendant la saison estivale, provoque une augmentation de la charge en *Vibrio* au sein de l'environnement marin (Hsieh *et al.*, 2007). De plus, cela offre à ces bactéries un grand nombre de particules sur lesquelles adhérer, contribuant ainsi à une diversification de niches biologiques, qui vont donner lieu à des associations bactéries-hôtes couvrant différents niveaux trophiques (Sampaio *et al.*, 2022). Les *Vibrio* peuvent ainsi former des relations symbiotiques avec une large gamme d'organismes aquatiques telle que les poissons, mollusques, éponges, crevettes, coraux, ainsi que le zooplancton (Thompson *et al.*, 2004). L'une des associations symbiotiques les plus étudiées est celle de *V. fischeri* avec le calmar *Euprymna scolopes*, qui a notamment amené à la découverte du système de quorum sensing de type LuxR-LuxI (Fuqua *et al.*, 1994). L'hôte prodigue alors à la bactérie un habitat riche en nutriments et la luminescence produite par *V. fischeri* permet d'attirer les proies et de protéger l'animal des prédateurs (Tischler *et al.*, 2019). Cependant, une partie des bactéries appartenant au genre *Vibrio* peut aussi être responsable de pathologies touchant l'Homme et/ou les organismes marins principalement pendant les périodes estivales (Austin, 2010). L'élévation de température durant la période estivale favorise le développement de ces bactéries mais est aussi associée à une susceptibilité des organismes

marins et c'est pourquoi de nombreuses vibrioses sont corrélées à des températures d'eau élevées (Vezzulli *et al.*, 2015 ; Travers *et al.*, 2009a ; Ben-Haim *et al.*, 2003 ; Staehli *et al.*, 2009 ; Paillard *et al.*, 2004). L'anthropisation favorise aussi la dissémination des *Vibrio* leur permettant d'infecter des organismes à travers le monde. C'est le cas des réservoirs d'eaux provenant des ballasts de navires, qui représentent des vecteurs d'organismes aquatiques. L'eau retrouvée au sein de ces ballasts a entraîné une propagation, parfois mondiale, de certaines espèces de *Vibrio* pathogènes comme *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, leur permettant de trouver de nouvelles niches écologiques à coloniser et favorisant la propagation d'infections (Vezzulli *et al.*, 2010 ; Rivera *et al.*, 2013 ; Ng *et al.*, 2018).

1.1.3. PHYLOGÉNIE DU GENRE *VIBRIO*

La classification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* s'est d'abord appuyée sur l'étude des caractéristiques phénotypiques (Davis and Park, 1962). Les espèces étaient regroupées en clusters en fonction de leur capacité à utiliser différentes sources de carbone, de leurs activités enzymatiques et de la spécificité de leur croissance en présence de différents composés et des conditions de culture (Thompson *et al.*, 2006). Mais, au vue des variabilités phénotypiques présentes, l'apparition de nouvelles méthodes moléculaires a permis d'améliorer les connaissances phylogénétiques du genre *Vibrio* et de mettre en évidence des erreurs de classement (Thompson *et al.*, 2006 ; Sawabe *et al.*, 2007b). En plus de l'identification via des critères phénotypiques, des méthodes génétiques telles que l'hybridation ADN-ADN ainsi que le séquençage du gène codant l'ARNr 16S se sont révélées nécessaires et ont permis la reclassification de certaines espèces du genre *Vibrio*. L'étude de l'ARNr 16S a longtemps été l'outil le plus couramment utilisé pour évaluer la position phylogénétique des espèces (Sentausa and Fournier, 2013). Néanmoins, les séquences de l'ARNr 16S restent fortement conservées chez les procaryotes et ne permettent parfois que la distinction de l'espèce *V. cholerae* parmi

En parallèle, le développement des techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) les rendant moins coûteuses et ainsi accessibles à un grand nombre de laboratoires, a permis d'obtenir en routine les séquences des génomes complets des bactéries étudiées (Sentausa and Fournier, 2013). Les analyses de ces séquences couplées aux indices de similarités des génomes (identité nucléotidique et hybridation ADN-ADN) ont permis de révéler des erreurs dans les classifications obtenues à partir des méthodes de MLSA et de l'étude de l'ARNr 16S, devenant ainsi la méthode la plus sûre à ce jour pour l'étude phylogénétique (Ashok Kumar *et al.*, 2020).

1.1.4. CARACTÉRISTIQUES PHÉNOTYPIQUES

Les vibrions ont largement été décrits par des microbiologistes marins, qui les retrouvaient associés à des poissons et crustacés. Ceci a conduit à la première description de pathogènes d'organismes marins comme *V. anguillarum* et *V. parahaemolyticus*. Les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif de formes fréquemment incurvées, possédant au moins un flagelle polaire leur permettant d'être motiles. La majorité est halophile et requiert la présence de sel pour croître, raison pour laquelle une grande partie des espèces a été isolée à partir d'environnements marins (Thompson *et al.*, 2004). Ce sont des bactéries adaptées à de grandes variations de température, allant de 5°C à plus de 40°C (Sampaio *et al.*, 2022). La majorité se multiplie lors des saisons chaudes, lorsque la température de l'eau est supérieure à 18°C, expliquant les fortes densités enregistrées en période estivale à travers le monde (Vezzulli *et al.*, 2015). La température détermine ainsi la concentration des *Vibrio* au sein du milieu aquatique.

Initialement, la classification des espèces de *Vibrio* s'est axée sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (températures de croissance, tolérance au sel, motilité, utilisation de différentes sources de carbone, tests enzymatiques et susceptibilité à l'agent vibriostatique O129) (Colwell, 1970). Divers milieux de cultures ont ainsi été

développés afin d'isoler ou différencier les espèces de *Vibrio*. Le milieu TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salt-sucrose agar) est le plus couramment utilisé, permettant l'isolement des *Vibrio* à partir de diverses sources environnementales ou cliniques (Thompson *et al.*, 2006).

1.1.5. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES

La plupart des vibrions possèdent deux chromosomes circulaires (Okada *et al.*, 2005). Diverses hypothèses ont été émises sur l'évolution du génome des *Vibrio* et notamment sur la présence de ces deux chromosomes. Le chromosome 2, le plus petit, pourrait résulter de l'acquisition d'un megaplasmide provenant d'un ancêtre des *Vibrio* ou serait apparu suite à une excision à partir d'un génome ancestral. Il est admis que cette particularité permettrait une réplication plus rapide de l'ADN (Thompson *et al.*, 2006 ; Kemter *et al.*, 2018).

L'analyse du génome de plusieurs espèces du genre *Vibrio* a montré que les gènes composant le chromosome 1 sont principalement liés à des fonctions essentielles (croissance et viabilité cellulaire) contrairement au chromosome 2, qui possède des gènes codant des fonctions secondaires nécessaires à l'adaptation de la cellule aux changements environnementaux (Thompson *et al.*, 2006). Une étude menée chez *V. cholerae* a révélé que les gènes associés au chromosome 1 présentent des niveaux d'expressions plus élevés, mais que des conditions de stress (absence de nutriments et anaérobiose) induisent l'expression de nombreux gènes associés au chromosome 2 (Xu *et al.*, 2003).

1.2 PATHOGÉNICITÉ DU CLADE *HARVEYI*

1.2.1. PATHOGÉNICITÉ : DÉFINITION

La définition de pathogénicité a évolué au cours des années, devenant parfois confuse. Le terme de pathogénicité est utilisé pour définir de manière large la capacité d'un agent biologique à induire une maladie chez un hôte. Il est donc important de définir la notion de pathogénicité

avant de présenter les infections causées par les *Vibrio*. Une première définition apportée par les postulats de Koch, publiés en 1890, a permis d'introduire les bases de la pathogénicité d'un agent infectieux (Figure 2). Ces postulats ont été remis en question au cours du XIX^{ème} siècle, notamment par Koch lui-même, après l'observation d'organismes porteurs sains de l'agent infectieux. En 1988, Stanley Falkow proposa d'autres postulats ajoutant la notion de facteurs de virulence ainsi qu'une dimension moléculaire aux postulats de Koch (Falkow, 1988) (Figure 2). Ces facteurs, produits au cours du cycle infectieux par l'agent pathogène, provoquent des dommages auprès de l'organisme hôte, mais la suppression de ces facteurs altère seulement le pouvoir pathogène et non la viabilité du microorganisme infectieux. À cela, sont venus s'ajouter de nouveaux postulats proposés par Casadevall et Pirofski en 2003 incluant l'interaction hôte-microorganisme qui peut être bénéfique ou délétère pour l'une des deux parties (Casadevall and Pirofski, 2003) (Figure 2). La pathogénicité d'un agent infectieux est donc la résultante des interactions entre le microorganisme et l'hôte qu'il infecte, impliquant aussi les facteurs de virulence exprimés par ce même agent. Les agents pathogènes ne sont ainsi plus considérés comme seul acteur de l'infection, mais sont compris dans un ensemble. De plus, certaines infections ne sont plus causées par un seul microorganisme mais peuvent provenir de la contribution de différentes espèces pathogènes agissant comme une communauté d'agents pathogènes introduisant la notion de pathobionte. Le concept de pathobiome intègre ainsi les interactions entre l'hôte et son microbiote, les microorganismes et l'environnement (Vayssier-Taussat *et al.*, 2014).

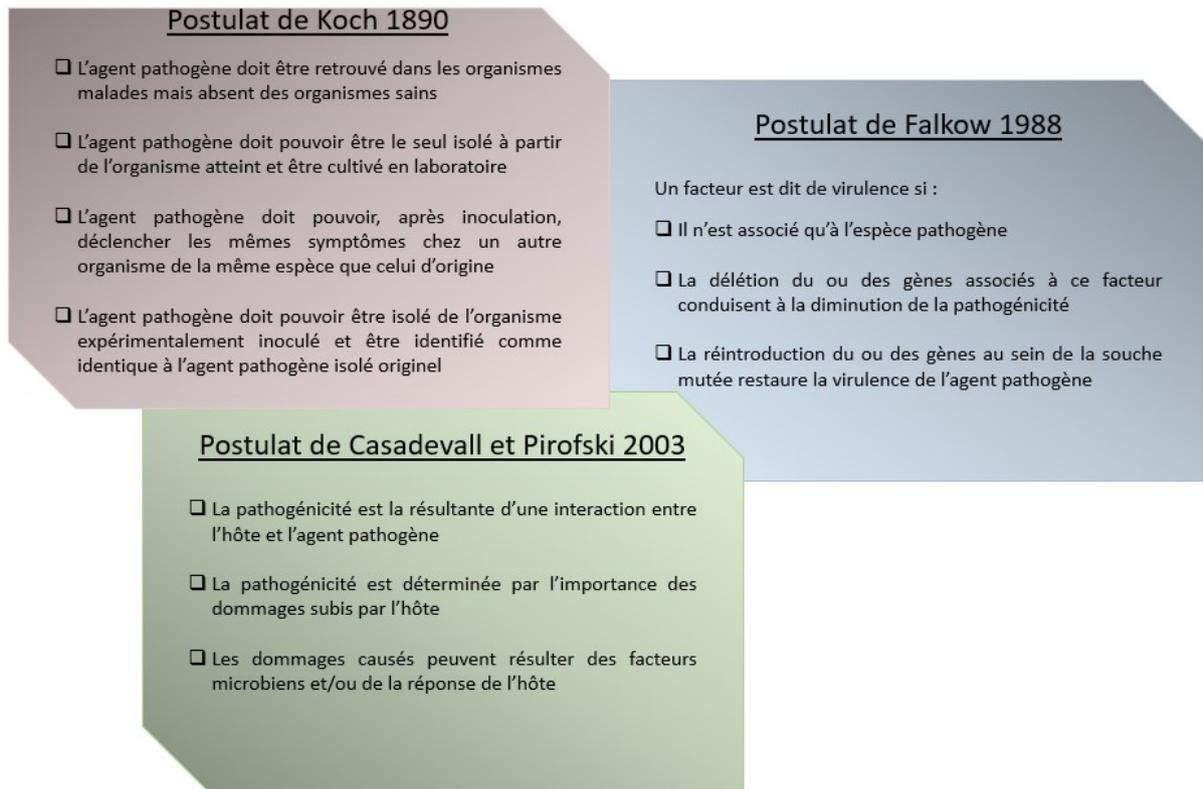


Figure 2 : Postulats de Koch permettant de démontrer qu'un microorganisme est responsable d'une pathologie, auxquels se sont ajoutés les postulats de Falkow en 1988 et de Casadevall et Pirofski en 2003.

La suite de ce manuscrit développera uniquement les cas de vibrions causés par les espèces de *Vibrio* pathogènes qui sont regroupées au sein d'un même groupe monophylétique partageant un taxon ancestral, le clade *Harveyi*.

1.2.2. ESPÈCES PATHOGÈNES DU CLADE *HARVEYI*

La proximité génétique des espèces présentes dans le clade *Harveyi* a rendu leur classification compliquée. Il n'est pas rare de voir des erreurs d'identification et de classification des bactéries appartenant à ce clade, dont la composition ne cesse d'évoluer grâce aux nouvelles techniques moléculaires mises en place (Thompson *et al.*, 2007). Une étude basée sur la technique MLSA menée par Sawabe et collaborateurs a recensé neuf espèces appartenant au clade *Harveyi* (Sawabe *et al.*, 2013). Parmi elles, cinq sont reconnues pour être pathogène d'organismes marins, provoquant des vibrions pouvant entraîner des mortalités en milieu naturel ou au sein

de structures aquacoles : *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii* et *V. rotiferianus* (Ruwandeeepika *et al.*, 2012).

Vibrio harveyi

L'espèce *V. harveyi* a été décrite pour la première fois en 1936 par Johnson et Shunk et dénommée *Achromobacter harveyi* en l'honneur d'Edmund Newton Harvey pour ses travaux sur la bioluminescence observée chez cette espèce (Johnson and Shunk, 1936). C'est d'ailleurs grâce à cette caractéristique que la vibriose provoquée par cette bactérie est souvent appelée « vibriose lumineuse ». Cependant, toutes les souches de *V. harveyi* ne sont pas luminescentes, comme dans le cas de souches affectant les ormeaux, par exemple.

C'est avec le développement de l'aquaculture en Asie et en Amérique du Sud que *V. harveyi* a été reconnue comme étant un sévère pathogène d'organismes marins touchant aussi bien les populations d'élevage que naturelles et induisant des symptômes variés (Austin and Zhang, 2006). Parmi les organismes infectés sont retrouvées diverses espèces de requins, poissons, crustacés et mollusques (Austin and Zhang, 2006). Chez les poissons, les vibrioses induites par *V. harveyi* entraînent des gastro-entérites, nécroses entérites, infections des yeux, ulcères de la peau et vasculites (Austin and Zhang, 2006 ; Lee *et al.*, 2002). Cependant, contrairement aux invertébrés, les infections causées par *V. harveyi* chez les vertébrés sont plutôt d'ordre opportunistes (Thompson *et al.*, 2006). Chez les invertébrés, les données collectées ces dernières années ont révélé l'importance de mortalité provoquées par *V. harveyi* induisant des pertes économiques conséquentes dans l'aquaculture, notamment dans les pays ayant un climat tropical (Montánchez and Kaberdin, 2020). L'utilisation de différentes espèces de crevettes en tant qu'organismes modèles a permis d'obtenir des informations importantes sur les maladies provoquées par cette bactérie. Chez les crevettes, la bactérie est associée au syndrome de vibriose lumineuse. Cette maladie induit des lésions au niveau des yeux et de la queue et des

perturbations au niveau du développement (Austin and Zhang, 2006 ; Montánchez and Kaberdin, 2020). En plus d'être impliquée dans les infections de crevettes, *V. harveyi* est capable d'infecter de nombreux autres invertébrés tels que le concombre de mer *Holothuria scabra*, les huîtres *Crassostrea gigas* et *Pinctada maxima* ou encore différentes espèces d'ormeaux (Zhang *et al.*, 2020 ; Montánchez and Kaberdin, 2020). La vibriose de l'ormeau sera présentée ultérieurement dans le manuscrit.

Vibrio campbellii

V. harveyi et *V. campbellii* sont deux espèces bactériennes partageant plus de 97% de similarités entre leur ARNr 16S. De ce fait, les épidémies enregistrées dans l'environnement marin ont souvent été associées à *V. harveyi* alors que des analyses ultérieures des génomes ont montré que ces bactéries appartiennent à l'espèce *V. campbellii*. Ainsi, à cause de ces erreurs d'identifications, il devient difficile de citer avec certitude les épidémies causées par *V. campbellii*. Par exemple, les souches *V. harveyi* BAA-11116 (aussi dénommée BB120) et HY01 responsables de mortalité de crevettes ont été par la suite identifiées comme appartenant à l'espèce *V. campbellii* (Lin *et al.*, 2009). C'est pourquoi les vibrioses causées par cette espèce ne seront pas évoquées dans cette partie.

Vibrio parahaemolyticus

V. parahaemolyticus est retrouvé dans les zones côtières tempérées et tropicales du monde entier. Cette espèce est reconnue comme étant la cause majeure de gastro-entérites chez l'Homme, suite à une consommation de fruits de mer crus ou insuffisamment cuits. Dans certains cas sévères, elle peut causer des septicémies (Baker-Austin *et al.*, 2018). Initialement, les infections humaines causées par *V. parahaemolyticus* ne touchaient strictement que la zone géographique du Japon (Figure 3). Cependant à la fin des années 1990, l'apparition de la souche

V. parahaemolyticus O3:K6 a déclenché une expansion des maladies causées par cette bactérie à travers le monde (Figure 3). Une autre expansion transcontinentale, cette fois-ci associée aux souches de *V. parahaemolyticus* appartenant au type clonal ST36 (multilocus sequence type 36), a été enregistrée au cours de l'année 2012 (Figure 3). Outre son pouvoir pathogène envers l'Homme, *V. parahaemolyticus* est un sévère pathogène d'organismes marins, entraînant des mortalités importantes chez les populations d'invertébrés, principalement en Asie (Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012). Plusieurs cas de vibrioses chez deux espèces de crevettes (*Penaeus monodon* et *Litopenaeus vannamei*) ont été attribués à cette bactérie après avoir provoqué des nécroses hépatopancréatique aiguës chez ces dernières (Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012 ; Tran *et al.*, 2013).

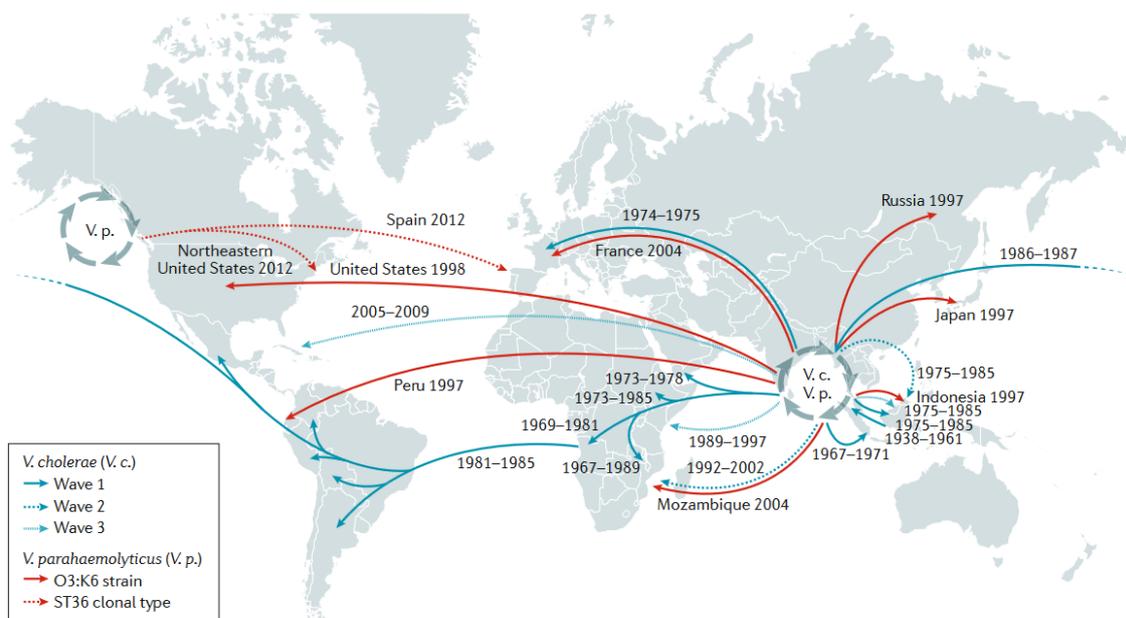


Figure 3 : Propagation mondiale des souches *V. cholerae* El Tor et *V. parahaemolyticus* O3:K6. Les flèches bleues représentent les trois vagues de propagation de *V. cholerae* El Tor et les flèches rouges celles de *V. parahaemolyticus* O3:K6 et ST36 (d'après Baker-Austin *et al.*, 2018).

Vibrio alginolyticus

V. alginolyticus est retrouvée dans les eaux côtières et sédiments marins à travers le monde, pouvant être associée à des infections des oreilles et tissus mous chez l'Homme (Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012 ; Baker-Austin *et al.*, 2018 ; Jacobs Slifka *et al.*, 2017). *V.*

alginolyticus est également un sévère pathogène d'organismes marins entraînant de fortes mortalités dans les productions aquacoles de coquillages, crustacés et crevettes. Elle a notamment pu être isolée après des épisodes de mortalité touchant les larves de palourdes *Venerupis decussatus* en Espagne (Gómez-León *et al.*, 2005) et de post-larves d'ormeaux *Haliotis diversicolor supertexta* en Chine (Cai *et al.*, 2006a). Chez la crevette, *V. alginolyticus* provoque des taches blanches au niveau de la cuticule et est responsable de mortalité (Selvin and Lipton, 2003 ; Lee *et al.*, 1996).

Vibrio rotiferianus

V. rotiferianus a été isolé pour la première fois en 2003 à partir de cultures de rotifères *Brachionus plicatilis* (Gomez-Gil *et al.*, 2003). Des expérimentations d'infection en laboratoire ont montré que cette bactérie est pathogène de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, ainsi que du crustacé *Artemia nauplii* (Austin *et al.*, 2005). À ce jour, une seule étude a pu réellement associer *V. rotiferianus* à de mortalité survenue dans le milieu naturel. En 2010, des épisodes de mortalité ont touché la population de crevettes *Fenneropenaeus chinensis*, dont *V. rotiferianus* a été identifiée comme responsable (Zhang *et al.*, 2014).

1.3 FACTEURS DE VIRULENCE DU CLADE *HARVEYI*

De manière générale, le cycle infectieux d'une bactérie pathogène inclut quatre étapes : (1) une phase de reconnaissance, d'adhésion et de pénétration de l'organisme hôte ; (2) une phase d'évasion du système immunitaire de l'hôte permettant la multiplication et l'invasion des tissus de l'hôte par l'agent pathogène ; (3) une phase de dommages chez l'hôte et (4) une phase de sortie de l'organisme hôte suivie d'une transmission de l'agent pathogène à un organisme sain (Donnenberg, 2000). Lors de chacune de ces étapes, des facteurs de virulence sont produits par l'organisme pathogène afin d'assurer la réussite du cycle infectieux.

1.3.1. COLONISATION DE L'ORGANISME HÔTE

L'adhésion d'une bactérie aux surfaces muqueuses et externes d'un hôte est souvent corrélée à sa pathogénicité. C'est pourquoi cet attachement est considéré comme la première étape d'une infection bactérienne. Les *Vibrio* pathogènes d'organismes marins produisent différentes protéines retrouvées à la surface de leur membrane externe qui assurent une adhésion efficace sur les surfaces chitineuses, muqueuses et cellulaires de l'hôte (Thompson *et al.*, 2006).

Flagelle

Les flagelles sont des appendices filamenteux de locomotion (nage et/ou swarming) fortement conservés chez les bactéries du genre *Vibrio* (McCarter, 2001). Ils interviennent dans le mode de vie des espèces de *Vibrio*, notamment lors de la colonisation d'organismes à infecter ou la formation de biofilms (Zhu *et al.*, 2013 ; Guttenplan and Kearns, 2013). Cependant, ils demandent un coût énergétique important pour leur biogénèse et leur fonctionnement (Khan *et al.*, 2020). Le flagelle se compose d'un corpuscule basal ancré dans les membranes interne et externe de la cellule et d'un crochet sur lequel est connecté le filament (Figure 4A). Le flagelle est assemblé par étapes, en commençant par l'appareil d'exportation dans la membrane

cytoplasmique, qui sécrète ensuite des composants dans l'ordre correct pour former le corpuscule basal et le crochet, et se termine par la sécrétion des monomères de flagelline, qui s'assemblent pour former le filament (Echazarreta and Klose, 2019) (Figure 4A). Le chimiotactisme est un mécanisme qui va orchestrer la migration de la bactérie en contrôlant le sens de rotation des flagelles via la perception d'informations chimiques de l'environnement (Zhu *et al.*, 2013).

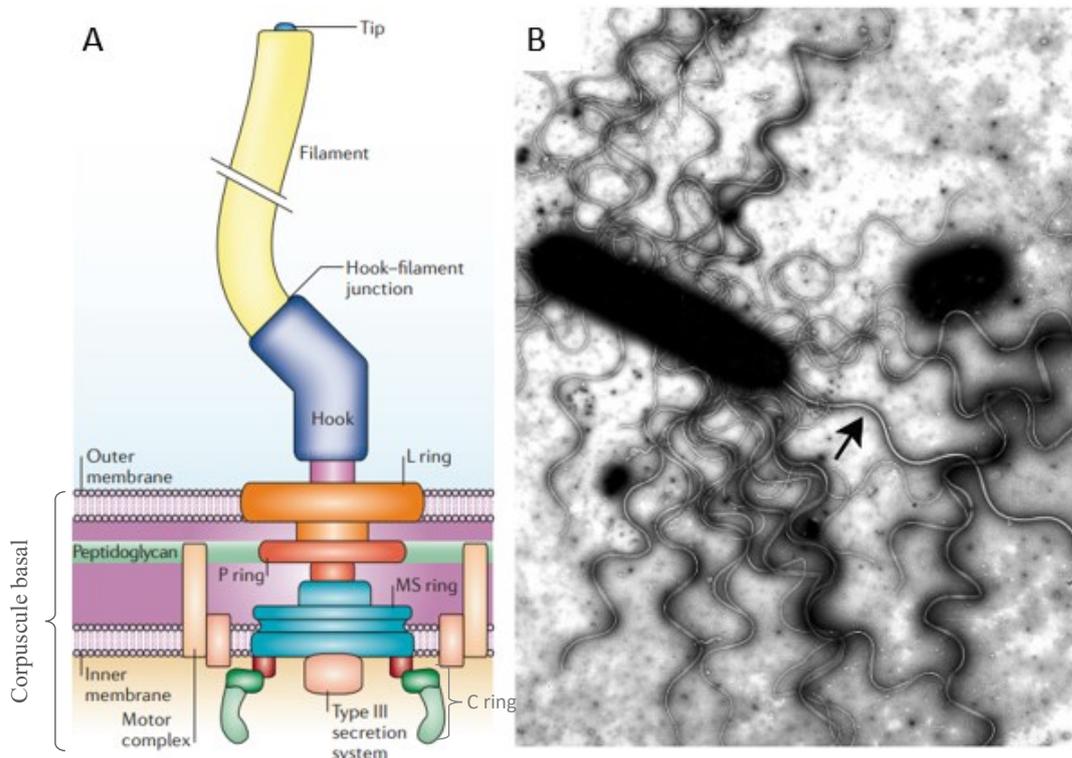


Figure 4 : Double système flagellaire retrouvé chez certaines bactéries appartenant au genre *Vibrio*. Schéma représentant un flagelle bactérien composé d'un corpuscule basal, d'un crochet et d'un filament retrouvé dans l'environnement externe (A). Micrographie électronique du double système flagellaire, le flagelle polaire unique étant indiqué avec une flèche (B). Filament : filament, Hook : crochet, Outer membrane : membrane externe, Inner membrane : membrane interne, Motor complex : complexe moteur, L ring : anneau L, P ring : anneau P et MS ring : anneau MS. (d'après Pallen and Matzke, 2006 ; McCarter, 2001).

Deux types de systèmes flagellaires peuvent être retrouvés chez les *Vibrio*, leur assurant une plasticité de déplacements selon la viscosité du milieu (McCarter, 2004) (Figure 4B). Le flagelle polaire, dont l'énergie nécessaire à la rotation du moteur provient du potentiel membranaire du sodium, assure la nage dans les environnements aqueux. Les flagelles latéraux permettent le « swarming », c'est-à-dire la motilité bactérienne sur des surfaces solides ou dans

des milieux visqueux et leur rotation dépend de la force proton-motrice (McCarter, 2001 ; Khan *et al.*, 2020). Ce double système flagellaire est retrouvé chez *V. harveyi*, *V. campbellii*, et *V. parahaemolyticus* en ce qui concerne le clade *Harveyi*. Chez *V. parahaemolyticus*, les gènes codant les protéines constituant les flagelles polaires sont constitutivement exprimés, alors que ceux codant les protéines des flagelles latéraux sont induits par les surfaces visqueuses ou solides (McCarter, 2004). Il est à noter que les noms des gènes peuvent varier selon les espèces bactériennes, mais les fonctions des protéines codées restent identiques. L'assemblage des flagelles polaires et latéraux suit l'expression hiérarchique des gènes associés (Figure 5) (Stewart and McCarter, 2003 ; Echazarreta and Klose, 2019).

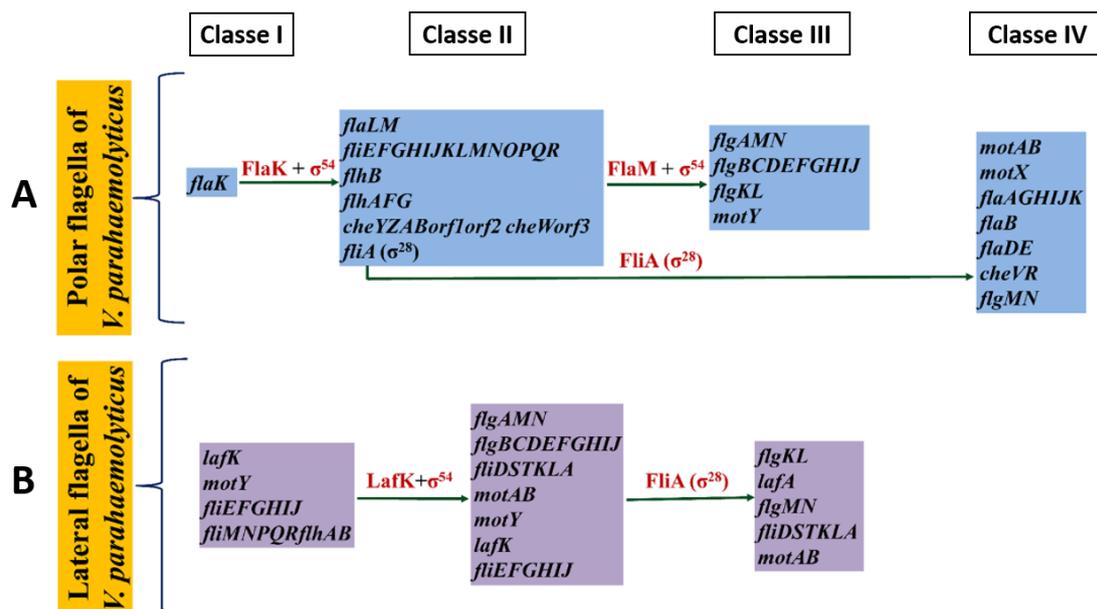


Figure 5 : Hiérarchisation de la transcription des gènes flagellaires chez *V. parahaemolyticus*. La hiérarchie de l'expression des gènes flagellaires est classée en quatre niveaux (classes I, II, III et IV) pour le flagelle polaire (A) et en trois niveaux (classes I, II et III) pour le flagelle latéral (B). Les gènes associés à la classe I codent FlaK (flagelle polaire) et LafK (flagelle latéral) qui sont les principaux régulateurs. Les gènes appartenant à la classe II sont nécessaires à la synthèse des anneaux MS et C, de l'ATPase et de l'appareil d'exportation associés à la membrane cytoplasmiques et des composants de la machinerie de chimiotactisme. Les gènes retrouvés dans la classe III dépendants de FlaM et σ^{54} (flagelle polaire) ou FliA (σ^{28}) (flagelle latéral), synthétisent les protéines du corpuscule basal, du crochet et du moteur rotatif. Cette classe code aussi pour la flagelline (LafA) du flagelle latéral. Les gènes associés à la classe IV du système flagellaire polaire, codent la flagelline (FlaA), des composants moteurs et des protéines de chimiotactisme (d'après Khan *et al.*, 2020).

Ainsi, avec des flagelles correctement assemblés, la bactérie possède la capacité d'être motile. Chez *V. alginolyticus*, la délétion des gènes *flrA* (synonyme de *flaK*), *flrB* ou *flrC* (synonymes de *flaL* et *flaM*) impliqués dans la synthèse et l'assemblage du flagelle polaire provoque une perte de motilité (Luo *et al.*, 2016). Les flagelles peuvent être associés à la virulence du fait de leur implication dans l'adhésion des bactéries à des surfaces muqueuses via la flagelline agissant probablement comme une adhésine (Khan *et al.*, 2020). Les flagelles polaires et latéraux sont impliqués dans la persistance du pathogène *V. parahaemolyticus* au sein de l'huître creuse *C. gigas* après dépuración (Aagesen *et al.*, 2013). En effet, l'inactivation des gènes *flaK* ou *lafK* amenant respectivement à un défaut de synthèse du flagelle polaire ou des flagelles latéraux conduit, après dépuración, à une absence de *V. parahaemolyticus* chez l'huître creuse *C. gigas* (Aagesen *et al.*, 2013). L'implication des flagelles dans la virulence des bactéries appartenant au clade *Harveyi* n'a à ce jour par encore été mis en évidence. Néanmoins, chez *V. vulnificus*, la délétion de gènes associés à la production de la flagelline induit une perte d'adhésion de la bactérie aux cellules HeLa, ainsi qu'une inhibition de son pouvoir cytotoxique envers ces mêmes cellules (Kim *et al.*, 2014). De ce fait, la biogénèse des flagelles peut être associée à la virulence d'une bactérie par leur implication dans la motilité et la capacité des cellules à adhérer à des surfaces.

Pili

En plus du flagelle, un autre type d'appendice filamenteux appelé pilus ou fimbriae, est retrouvé à la surface des cellules bactériennes. Les pili assurent un rôle dans l'adhésion, le déplacement mais aussi dans la conjugaison bactérienne. En effet, le pilus de sécrétion de type IV est associé strictement au transfert de matériel génétique par conjugaison bactérien (Lukaszczyk *et al.*, 2019). Concernant la fonction d'adhésion et de déplacement, deux types de pili ont été identifiés chez les bactéries appartenant au clade *Harveyi*. Le premier type est synthétisé par la voie des

« chaperone-usher » (pilus de type 1 et P pilus) et est impliqué dans l'adhésion bactérienne et dans les interactions hôte-pathogène (Figure 6A) (Hospenthal *et al.*, 2017). Le second type correspond au pilus de type IV (T4P), qui est impliqué dans l'adhésion aux surfaces et dans la motilité de type « twitching », qui résulte d'un mouvement d'extension du pilus, d'attache de son extrémité à une surface, puis de la rétraction du pilus permettant à la bactérie de se déplacer de façon saccadée sur une surface (Figure 6B) (Mattick, 2002 ; Lukaszczyk *et al.*, 2019).

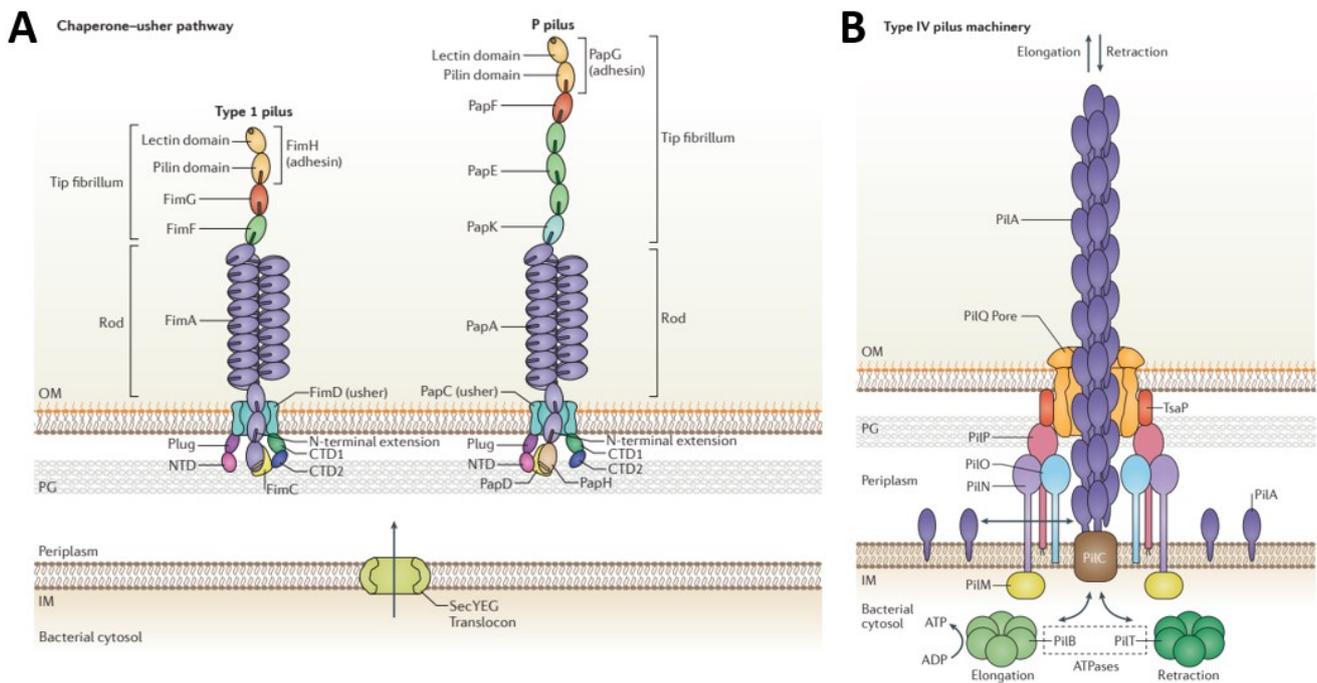


Figure 6 : Architecture des pili associés à l'adhésion chez les bactéries à Gram négatifs. Représentation schématique des pili synthétisés par la voie des chaperone-usher. Les sous-unités des pili de type 1 et IV sont transportées à travers la membrane interne à l'aide de la voie de translocation SecYEG, puis à travers la membrane externe grâce au protéines FimD (pilus de type 1) ou PapC (pilus P) afin de former le pilus (A). Représentation schématique du pilus de type IV (T4P) impliqué dans l'adhésion et la motilité de type « twitching ». Les T4P utilisent une ATPase d'assemblage cytoplasmique afin de piloter la polymérisation et la croissance du pilus à partir de la membrane interne, à travers le périplasm et à travers le canal de sécrétine de la membrane externe (PilQ) (B). OM : membrane externe, PG : peptidoglycane, periplasm : périplasm, IM : membrane interne, bacterial cytosol : cytosol bactérien (d'après Hospenthal *et al.*, 2017).

V. parahaemolyticus code pour des protéines formant un homologue du pilus de type I et des homologues de deux pili de type IV : l'hémagglutinine sensible au mannose (MSHA) et le pilus

régulé par la chitine (PilA). Comme les flagelles, ces pili sont impliqués dans le maintien de *V. parahaemolyticus* au sein de l'huître creuse *C. gigas*, ainsi que dans la formation de biofilm (Aagesen *et al.*, 2013). Les pili PilA et MSHA sont aussi nécessaires à *V. parahaemolyticus* pour se lier à des surfaces chitineuses que l'on retrouve en grande quantité dans l'environnement marin (Frischkorn *et al.*, 2013). Des études moléculaires chez *V. alginolyticus* ont montré une diminution de l'expression de plusieurs gènes nécessaires à la synthèse du pilus de type IV dans des conditions de culture diminuant l'adhésion des bactéries (Huang *et al.*, 2016). Bien qu'ils soient nécessaires dans les interactions avec l'hôte, l'implication directe des pili dans la virulence des *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi* reste à démontrer (Lukaszczyk *et al.*, 2019 ; Aagesen *et al.*, 2013).

Liaison à la chitine

La chitine, un polymère de N-acétylglucosamines liées en β -1,4, est l'un des constituants principaux des exosquelettes des crustacés et de mollusques (Keyhani, 1999). La capacité des pathogènes d'organismes marins à se fixer à des surfaces chitineuses participe à leur virulence. Ceci est rendu possible grâce à des protéines retrouvées à la surface des cellules bactériennes appelées « chitin-binding proteins ». Plusieurs de ces protéines ont déjà été identifiées chez *V. harveyi* et *V. alginolyticus* (Montgomery and Kirchman, 1994 ; Pruzzo *et al.*, 1996 ; Suginta, 2007). Chez *V. parahaemolyticus*, la protéine GbpA est connue pour être impliquée dans l'attachement de *V. cholerae* à la chitine et pourrait ainsi être responsable de l'adhésion de la bactérie à la carapace des crevettes (Tiruvayipati and Bhassu, 2016).

Après s'être attachés, les *Vibrio* sécrètent des enzymes hydrolytiques appelées chitinases qui ont pour rôle de dégrader la chitine en oligomères courts qui sont absorbés et utilisés par la bactérie comme source de carbone et d'azote (Montgomery and Kirchman, 1994 ; Hunt *et al.*, 2008). Différentes études menées chez *V. cholerae* ont montré la dégradation de la chitine en

oligosaccharides par les chitinases, qui sont ensuite importés au sein de la cellule à l'aide des porines et chitoporines, toutes deux protéines de la membrane externe formant des canaux (Keyhani, 1999 ; Debnath *et al.*, 2020). Plusieurs chitinases sont retrouvées chez *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. rotiferianus*, dont la plus étudiée est la chitinase codée par le gène *chiA* (Svitol *et al.*, 1997 ; Hunt *et al.*, 2008 ; Debnath *et al.*, 2020). Certaines des chitinases de *V. harveyi* sont produites en présence de différentes chitines, alors que d'autres sont spécifiques à une forme de chitine (Svitol *et al.*, 1997). L'attachement de la bactérie à la chitine va optimiser le contact avec le substrat, permettant une absorption plus efficace des produits de dégradation et apportant à la bactérie un avantage nutritif (Montgomery and Kirchman, 1994).

1.3.2. MULTIPLICATION, INVASION ET DOMMAGES CHEZ L'HÔTE

Pour se multiplier au sein de l'organisme hôte, les bactéries doivent être en capacité d'acquérir les éléments qui sont essentiels à leur croissance, à déjouer les mécanismes de défense de l'hôte, ainsi qu'à induire des dommages cellulaires chez l'organisme infecté. À ce jour, il existe un grand nombre d'études décrivant les composants invasifs utilisés par les espèces de *Vibrio* pathogènes. Ces derniers peuvent être regroupés en facteurs de virulence enzymatiques et non-enzymatiques. Chez les espèces du clade *Harveyi*, les facteurs non-enzymatiques sont principalement les sidérophores. Les facteurs enzymatiques regroupent quant à eux des protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire et des effecteurs injectés dans le cytoplasme des cellules de l'organisme infecté grâce à des systèmes de sécrétions. Ces facteurs enzymatiques ont été identifiés comme étant des composants essentiels à l'invasion, la survie et la prolifération du *Vibrio* pathogène dans l'organisme hôte (Deane *et al.*, 2012).

Acquisition de fer : sidérophores

Le fer est un élément essentiel pour la croissance d'un grand nombre d'organismes vivants. Malgré son abondance dans l'environnement, sa biodisponibilité est limitée lors du processus d'infection de l'hôte puisqu'il se retrouve lié aux protéines de l'hôte telles que la transferrine (Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012). Pour faire face à cela, les bactéries vont acquérir le fer via la sécrétion de sidérophores. Ce sont des molécules à faible poids moléculaire qui vont soit aller se fixer au fer libre, soit le rendre disponible en l'extrayant de protéines porteuses. Par la suite, le sidérophore ayant fixé le fer sera transporté au sein de la cellule bactérienne, faisant intervenir un récepteur de la membrane externe, une protéine périplasmique et un système de transport ABC (ATP-binding cassette) de la membrane interne (Butler, 2005 ; Miethke and Marahiel, 2007). Les sidérophores sont considérés comme des déterminants de virulence chez plusieurs *Vibrio* incluant *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* et *V. harveyi* (Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012). La vibrioferrine est un sidérophore très étudié chez *V. parahaemolyticus*, dont l'implication dans la virulence de la bactérie a déjà été démontrée (Li *et al.*, 2019). La vibrioferrine est synthétisée par les protéines codées par l'opéron *pvsABCDE*, tandis que l'opéron *psuA-pvuABCDE* code le récepteur de la membrane externe de ce sidérophore (Tableau 1) (Tanabe *et al.*, 2003, 2011). Récemment, une étude a montré la présence de ces mêmes gènes dans le génome de plusieurs souches de *V. harveyi* isolées de l'huître creuse *C. gigas* porteuse du virus OsHV-1. Ce sidérophore faciliterait la colonisation et le maintien de cette espèce, ainsi que celle de *V. rotiferianus*, qui elle ne possède que le récepteur à la vibrioferrine, chez l'huître creuse *C. gigas* infectée avec l'OsHV-1 (Tableau 1) (Oyanedel *et al.*, 2023).

Enzymes extracellulaires

De nombreuses bactéries pathogènes produisent des enzymes lytiques pouvant causer des dommages sur les tissus de l'hôte infecté, libérant ainsi des nutriments et permettant au pathogène de se propager dans les tissus. Les espèces pathogènes du clade *Harveyi* produisent des hémolysines et protéases (Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012). Une étude a par ailleurs corrélé la mortalité des crevettes à la production de protéases et de phospholipases par *V. harveyi* (Soto-Rodriguez *et al.*, 2003).

Les **hémolysines** sont des exotoxines, largement répandues dans le clade *Harveyi*, induisant une lyse des cellules de l'hôte (Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012). Ces toxines protéiques possèdent deux modes d'actions : former des pores au sein des cellules cibles ou bien dégrader les membranes cellulaires membranaires via une activité de phospholipase (Sun *et al.*, 2007). *V. parahaemolyticus* synthétise trois hémolysines, dont l'hémolysine thermostable directe (TDH) et l'hémolysine liée à la TDH (TRH), qui sont considérées comme les principaux facteurs de virulence chez cette espèce (Tableau 1) (Gutierrez West *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2019). Additionnée à ces protéines, l'hémolysine thermolabile (THL) identifiée chez *V. parahaemolyticus* est une phospholipase présentant une activité d'hémolyse en présence de lecithin (Tableau 1) (Taniguchi *et al.*, 1986 ; Zhang and Austin, 2005). *V. harveyi* synthétise une hémolysine codée par le gène *vhh* appartenant à la famille des THL, dont l'expression peut être induite lorsque la bactérie infecte les larves de crevettes (Tableau 1) (Zhang *et al.*, 2001 ; Zhang and Austin, 2005 ; Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012).

Les **protéases** utilisées par les bactéries pathogènes sont des enzymes capables de dégrader des protéines contenues dans les tissus de l'hôte telles que la gélatine, la fibronectine et le collagène, pouvant parfois provoquer des hémorragies sans induire de lyse cellulaire (Teo *et al.*, 2003). Ces enzymes sont impliquées dans la virulence de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. harveyi* envers des crevettes et poissons (Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*,

2020). Chez *V. harveyi*, les gènes *pap6* et *degQ*, codant respectivement une métalloprotéase et une sérine protéase, ont montré une augmentation de leur expression suite à une infection de larves de crevettes *Artemia franciscana* (Tableau 1) (Teo *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Ruwandeepika *et al.*, 2011). Des protéases isolées et purifiées à partir de cultures de *V. parahaemolyticus* se sont révélées létales après injection dans la crevette *P. monodon* (Sudheesh and Xu, 2001). Plusieurs études ont rapporté que les protéases produites par *V. alginolyticus* ont un effet toxique sur les larves d'huîtres *Ostrea edulis* ou encore un effet léthal sur la crevette *P. japonicus* (Rui, 2009 ; Nottage and Birkbeck, 1987).

Systèmes de Sécrétion Type III (T3SS) et leurs protéines effectrices

La plupart des facteurs de virulence bactériens sont localisés sur la surface des cellules ou sont sécrétés. Chez les bactéries à Gram négatif, les protéines sécrétées transitent à travers les deux membranes via des systèmes de sécrétions. Six types de systèmes de sécrétion sont retrouvés chez les bactéries à Gram négatif parmi lesquels les systèmes de sécrétion de types III, IV et VI (T3SS, T4SS et T6SS) qui permettent une injection de protéines effectrices directement au sein de la cellule cible (Green and Meccas, 2016). L'un des systèmes de sécrétion le plus étudié et retrouvé dans le clade *Harveyi* est le système de sécrétion de type III (T3SS), aussi appelé « injectisome » en raison de sa structure similaire à celle d'une seringue (Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012 ; Green and Meccas, 2016). Il est composé d'un corpuscule basal ancré dans les membranes interne et externe de la bactérie, d'une « aiguille » extracellulaire et d'un translocon qui va former un pore dans la membrane de l'hôte (Figure 7A). L'extrémité de « l'aiguille » va détecter la cellule hôte et être nécessaire à l'insertion du translocon dans sa membrane (Figure 7A) (Calder *et al.*, 2014b ; Kosarewicz *et al.*, 2012 ; Green and Meccas, 2016). C'est à travers ce système, en partant du cytoplasme de la bactérie, que les protéines effectrices vont transiter et être injectées directement au sein de la cellule hôte. Les protéines

effectrices vont remodeler les fonctions cellulaires de la cellule hôte afin de permettre à la bactérie pathogène de s'établir dans les cellules ou tissus de l'hôte ou même induire la mort cellulaire (Green and Meccas, 2016 ; Li *et al.*, 2019).

V. parahaemolyticus possède deux T3SS ayant chacun un rôle distinct dans la virulence de la bactérie et dont les gènes sont régulés par deux réseaux de régulation différents (Figure 7B et C). L'expression des gènes associés au T3SS1 est contrôlée par les protéines ExsABCDE, dont ExsA est l'activateur principal de transcription, alors que les régulateurs transcriptionnel VtrA et VtrB régulent l'expression des gènes associés au T3SS2 (Figure 7B et C).

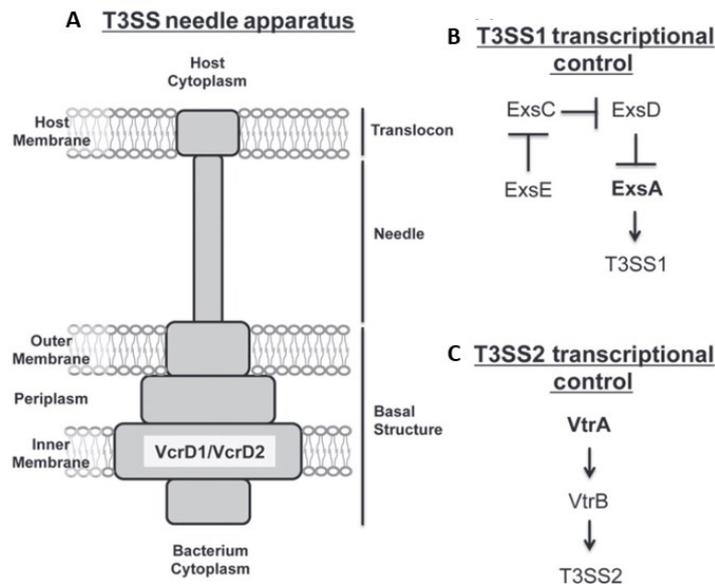


Figure 7 : Représentation schématique du système de sécrétion de type III de *V. parahaemolyticus* (A) et des voies de régulations des T3SS1 (B) et T3SS2 (C) (d'après Calder *et al.*, 2014).

Les effecteurs sécrétés par le T3SS1 (VopQ, VopS, VPA0450, VP1680 et VopR) sont impliqués systématiquement dans la mort cellulaire en promouvant l'autophagie et la lyse cellulaire (Tableau 1) (Ono *et al.*, 2006; Burdette *et al.*, 2008; Matlawska-Wasowska *et al.*, 2010). En parallèle, ceux sécrétés par le T3SS2 (VopA, VopT, VopI, VopV, VopC, VopZ et VPA1380) sont nécessaires à l'invasion cellulaire en inactivant la réponse immunitaire et en modulant le cytosquelette d'actine de la cellule hôte (Tableau 1) (Li *et al.*, 2019). Chez *V. harveyi*, les mutations ciblées sur les gènes *vscC* et *vscD*, codant des protéines du corpuscule

basal, ont eu pour effets de diminuer sa capacité à coloniser les tissus, à induire des mortalités chez le mérrou ($\text{♀} \textit{Epinephelus fuscoguttatus} \times \text{♂} \textit{Epinephelus lanceolatu}$) et à résister aux stress acide et oxydant (Zhang *et al.*, 2021).

Tableau 1 : Facteurs de virulence retrouvés chez les espèces de *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi* associés à la multiplication, l'invasion et aux dommages provoqués chez l'hôte.

Espèce bactérienne	Gène(s)	Produit	Référence
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>pvsABCDE</i>	Sidérophore-vibrioferrine	Tanabe <i>et al.</i> , 2003
<i>V. harveyi</i>			Oyanedel <i>et al.</i> , 2023
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>psuA-pvuABCDE</i>	Système de transport, récepteur de la vibrioferrine	Tanabe <i>et al.</i> , 2011
<i>V. harveyi</i>	<i>pvuA1A2BCDE</i>		Oyanedel <i>et al.</i> , 2023
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Hémolysine thermostable direct (TDH)	Gutierrez West <i>et al.</i> , 2013
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	TDH-related hemolysin	Gutierrez West <i>et al.</i> , 2013
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	Hemolysine thermolabile	Taniguchi <i>et al.</i> , 1986
<i>V. harveyi</i>	<i>vhh</i>	Hemolysine	Zhang <i>et al.</i> , 2001
<i>V. harveyi</i>	<i>pap6</i>	Métalloprotéase	Teo <i>et al.</i> , 2003
<i>V. harveyi</i>	<i>degP</i>	DegP Sérine protéase	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>V. harveyi</i>	<i>degQ</i>	DegQ Sérine protéase	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>V. harveyi</i>	<i>degS</i>	DegS outer membrane-stress sensor serine endopeptidase	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1680</i>	VopQ ou VP1680 (Effecteur T3SS1)	Shimohata <i>et al.</i> , 2011
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1686</i>	VopS ou VP1686 (Effecteur T3SS1)	Matlawska-Wasowska <i>et al.</i> , 2010
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vpa0450</i>	VPA0450 (Effecteur T3SS1)	Broberg <i>et al.</i> , 2010
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1683</i>	VopR (Effecteur T3SS1)	Salomon <i>et al.</i> , 2013
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopA</i>	VopA (Effecteur T3SS2)	Trosky <i>et al.</i> , 2004
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopT</i>	VopT (Effecteur T3SS2)	Kodama <i>et al.</i> , 2007
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopL</i>	VopL (Effecteur T3SS2)	Liverman <i>et al.</i> , 2007
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopV</i>	VopV (Effecteur T3SS2)	Hiyoshi <i>et al.</i> , 2011
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopC</i>	VopC (Effecteur T3SS2)	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopZ</i>	VopZ (Effecteur T3SS2)	Zhou <i>et al.</i> , 2013
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vpa1380</i>	VPA1380 (Effecteur T3SS2)	Calder <i>et al.</i> , 2014a
<i>V. alginolyticus</i>	<i>val1680</i>	Val1680 (Effecteur T3SS)	Zhao <i>et al.</i> , 2018
<i>V. alginolyticus</i>	<i>val1686</i>	Val1686 (Effecteur T3SS)	Zhao <i>et al.</i> , 2018

La délétion du gène *vscC* chez *V. alginolyticus* a rendu la bactérie défectueuse dans la sécrétion de protéines via son T3SS. Cette bactérie produit deux effecteurs, Val1686 et Val1680 qui sont des homologues de VopQ et VopS retrouvés chez *V. parahaemolyticus* (Tableau 1) (Zhao *et*

al., 2018). Ces protéines sont responsables de la mort de cellules de poissons en induisant leur arrondissement, apoptose et lyse cellulaire (Zhao *et al.*, 2010, 2018).

1.3.3. ÉCHAPPEMENT AU SYSTÈME IMMUNITAIRE DE L'HÔTE

En parallèle des mécanismes mis en place par les bactéries pathogènes pour se multiplier au sein de l'hôte, elles vont devoir déjouer ou inhiber le système immunitaire de l'hôte.

Protection face au stress oxydant

Lors du processus infectieux, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont des produits hautement réactifs formés à partir d'O₂, sont produites par les bactéries elles-mêmes, ainsi que par le système immunitaire de l'hôte. Ces ROS vont causer des dommages aux cellules bactériennes. Les bactéries pathogènes, et notamment les *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi*, vont principalement utiliser des enzymes à activités anti-oxydantes, telle que la super-oxyde dismutase (SOD) ou encore la catalase, qui transforment les ROS en produits peu ou non toxiques (Wang *et al.*, 2012a ; Chen *et al.*, 2019). Les gènes codant plusieurs types de SOD ont été identifiés dans le génome de *V. alginolyticus*, *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus* (Kimoto *et al.*, 2001 ; Vattanaviboon *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2019). L'implication directe de la super-oxyde dismutase B dans la résistance au stress oxydant et la colonisation des cellules de poissons a pu être démontrée chez *V. alginolyticus* (Chen *et al.*, 2019).

Capsule

Pour échapper au système immunitaire, les bactéries pathogènes sont parfois capables de former à leur surface, une capsule composée de polysaccharides. Cette dernière protège la bactéries de l'action de phagocytose induite par le système immunitaire de l'hôte (Nanra *et al.*, 2013). Dans

le clade *Harveyi*, le cluster de gènes *cps* (pour *capsular polysaccharides*) codant une capsule de polysaccharides est présent dans le génome de plusieurs souches de *V. parahaemolyticus* (Pang *et al.*, 2019). Certaines souches de *V. parahaemolyticus* qui ne produisent pas de capsule sont plus sensibles à l'activité hémocytaire de l'huître creuse *C. gigas* (Volety *et al.*, 2001).

1.3.4. RÉGULATION DES GÈNES DE VIRULENCE : QUORUM SENSING

Le quorum sensing est un système de communication bactérienne permettant une régulation de gènes en fonction de la densité cellulaire. Ainsi, grâce à la sécrétion et à la perception de molécules signal, aussi appelées auto-inducteurs, les bactéries vont être capables de détecter le moment où la densité bactérienne atteint un seuil, aussi appelé quorum et induire une réponse coordonnée dans la régulation des gènes cibles. Le quorum sensing a pour la première fois été décrit chez *V. fischeri* dans l'étude portant sur la bioluminescence produite lors de sa relation symbiotique avec le calmar *E. scolopes* (Nealson *et al.*, 1970 ; Fuqua *et al.*, 1994 ; Visick *et al.*, 2000). Depuis ce jour, des systèmes similaires au système LuxR-LuxI de *V. fischeri* ont été décrits chez de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif (Montánchez and Kaberdin, 2020). Les bactéries appartenant au clade *Harveyi* présentent des systèmes de quorum sensing communs entre elles (Bassler *et al.*, 1994a ; Darshanee Ruwandepika *et al.*, 2012). La souche dont le quorum sensing a été le plus décrit est celui de *V. campbellii* BB120, initialement classifiée *V. harveyi* (Lin *et al.*, 2009). Le quorum sensing de *V. campbellii* est composé de trois voies de signalisation : les systèmes LuxM/LuxN, LuxS/LuxPQ et CqsA/CqsS (Figure 8) (Bassler *et al.*, 1994a).

Le premier système permet la synthèse de l'auto-inducteur HAI-1 (pour *harveyi* auto-inducer 1) de type *N*-acyl homosérine lactone par LuxM. HAI-1 va se lier au récepteur membranaire LuxN, qui est une protéine de type histidine kinase (Cao and Meighen, 1989 ; Ng and Bassler, 2009). Les histidine kinases sont des enzymes participant à la transduction de signaux via

l'autophosphorylation d'un résidu histidine. Le second système, LuxS/LuxPQ, est le plus répandu chez les bactéries du genre *Vibrio*. Il peut être retrouvé notamment chez *V. cholerae*, *V. fischeri* ou encore *V. vulnificus* (Milton, 2006). Ce système utilise une molécule signal de type diester furanosyl borate (appelée AI-2 pour auto-inducteur 2) synthétisée par LuxS. Le récepteur de l'AI-2 est composé de deux protéines, LuxP située dans le périplasma et qui va lier la molécule signal puis interagir avec l'histidine kinase LuxQ située dans la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2002 ; Ng and Bassler, 2009). Le dernier système, CqsA/CqsS, qui a d'abord été décrit chez *V. cholerae*, utilise la protéine CqsA (pour *cholerae* quorum sensing autoinducteur) pour produire la molécule signal CAI-1 de type (S)-3-hydroxytridecan-4-one, qui interagit avec l'histidine kinase CqsS liée à la membrane (Figure 8) (Ng *et al.*, 2011). Du fait de la diversité des systèmes senseurs, il semblerait que les différents auto-inducteurs soient utilisés pour différents types de communications. En effet, les AI-2 sont produits par une large gamme de bactéries à Gram négatif et positif et permettraient donc une communication inter-espèces. Les CAI-1, produits par plusieurs espèces du genre *Vibrio*, et les HAI-1, retrouvées seulement chez quelques espèces du clade *Harveyi* (*V. harveyi*, *V. campbellii* et *V. parahaemolyticus*), permettraient respectivement une communication inter-*Vibrio* et intra-espèces (Papenfort and Bassler, 2016). Dans la littérature, ces différents auto-inducteurs sont dits « diffusible » sans qu'à ma connaissance cela ait été démontré expérimentalement (Waters and Bassler, 2005). Comme représenté sur la Figure 8, ces divers systèmes de quorum sensing vont tous converger vers une même cascade de phosphorylation. À **faible densité bactérienne**, les auto-inducteurs sont à une concentration trop faible pour être détectés par leurs récepteurs qui vont alors s'auto-phosphoryler et transférer le phosphate à la protéine cytoplasmique LuxU (Freeman and Bassler, 1999a, 1999b ; Waters and Bassler, 2005). Le phosphate est ensuite transmis à la protéine LuxO. La protéine LuxO phosphorylée qui possède un domaine d'activation du facteur Sigma alternatif σ^{54} , interagit avec ce dernier afin d'activer la

transcription de gènes codant de petits ARNs (small RNA) régulateurs (Lilley and Bassler, 2000 ; Bassler *et al.*, 1994b). Ces derniers interagissent avec la protéine chaperonne Hfq et ils vont ensemble activer la production du principal régulateur du quorum sensing à faible densité cellulaire, la protéine AphA. En parallèle, les petits ARNs et Hfq déstabilisent l'ARNm de *luxR* (Lenz *et al.*, 2004).

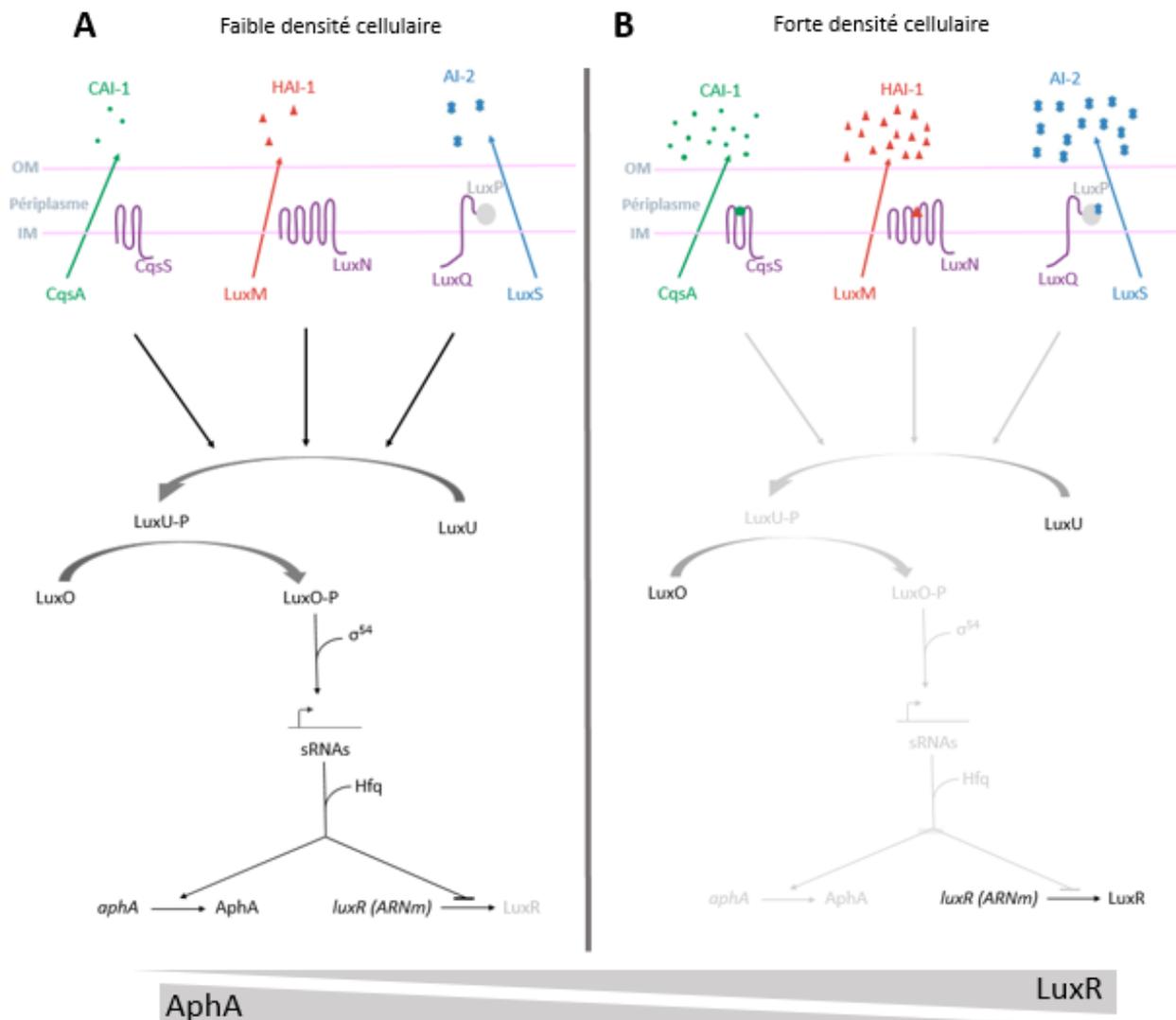


Figure 8 : Représentation des trois voies de signalisation du quorum sensing chez *V. campbellii*, partagées par les espèces appartenant au clade *Harveyi*. À faible densité, les quantités d'auto-inducteurs sont en dessous du seuil et la cascade de phosphorylation a donc lieu permettant la production de la protéine AphA (A). À forte densité cellulaire, la concentration d'auto-inducteurs atteint le seuil leur permettant de se lier à leurs récepteurs respectifs empêchant la cascade de phosphorylation et permettant la production de la protéine LuxR (B). Les auto-inducteurs et leurs précurseurs sont représentés par différentes couleurs, vert pour CqsA/CAI-1, orange pour LuxM/HAI-1 et bleu pour LuxS/AI-2. Les récepteurs des différents systèmes sont représentés en violet. OM : membrane externe ; IM : membrane interne (adapté de Waters and Bassler, 2005).

La protéine LuxR n'étant pas produite, elle ne peut activer la transcription des gènes appartenant à l'opéron *luxCDABE* impliqué dans la bioluminescence bactérienne (Figure 8A) (Swartzman *et al.*, 1992). À l'inverse, à **forte densité bactérienne**, la concentration en auto-inducteurs augmente jusqu'à atteindre le seuil, permettant l'interaction des molécules signal avec leurs récepteurs respectifs, qui vont passer d'une activité kinase à une activité phosphatase, inhibant ainsi la cascade de phosphorylation (Freeman and Bassler, 1999a, 1999b ; Waters and Bassler, 2005). Ainsi, la protéine LuxO non phosphorylée ne peut induire l'expression des gènes codant les petits ARNs régulateurs, permettant par conséquent la production de la protéine LuxR et la régulation de gènes sous la dépendance de ce régulateur. En contrepartie, la protéine AphA n'est pas produite, empêchant l'expression de certains gènes (Figure 8B) (Lilley and Bassler, 2000 ; Bassler *et al.*, 1994b ; Lenz *et al.*, 2004).

C'est ainsi que chez *V. campbellii* plus de 700 gènes sont régulés par le quorum sensing. Parmi eux, LuxR régule l'expression de 600 gènes, notamment l'opéron *luxCDABE* (Ball and van Kessel, 2019), les gènes codant des protéases (Chen *et al.*, 2020) ou encore des gènes associés à la motilité (Yang and Defoirdt, 2015). AphA, le régulateur à faible densité cellulaire du quorum sensing, régule quant à lui 167 gènes. Ces deux protéines co-régulent 77 gènes dont ceux associés au système de sécrétion de type III (van Kessel *et al.*, 2013).

2. BIOFILMS BACTÉRIENS

2.1 DÉFINITION

Dans tous les environnements, dont les environnements aquatiques, les bactéries peuvent vivre sous forme planctonique ou bien en formant des communautés organisées appelées biofilms. Ces derniers sont le plus souvent définis comme étant des assemblages de microorganismes attachés de manière irréversible à une surface, entourés d'une matrice extracellulaire polymérique qu'ils produisent eux-mêmes (Donlan, 2002). La formation d'un biofilm est souvent associée à la colonisation d'une surface par les bactéries. Cependant, depuis quelques années des biofilms formés à l'interface air-liquide commencent à être étudiés chez plusieurs espèces bactériennes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ou encore *V. cholerae* (Koza *et al.*, 2009 ; Martí *et al.*, 2011 ; Hollenbeck *et al.*, 2014 ; Bouffartigues *et al.*, 2014 ; Ardré *et al.*, 2015). Par leur formation à la surface d'un liquide, ces biofilms sont aussi dénommés « pellicules ». Ces derniers sont des regroupements de bactéries, qui, après s'être développées dans le milieu liquide, vont s'agréger entre elles à l'interface air-liquide sans qu'il y ait attachement initial à une surface solide. Ce type de biofilm va permettre d'augmenter la surface d'échange d'oxygène, qui peut parfois être limitante dans les biofilms se développant à partir de surfaces (Ardré *et al.*, 2015). La définition proposée par Vert *et al.* (2012) n'est pas la plus répandue, mais prend en compte ces deux types de biofilms en supprimant la notion de surface comme élément essentiel au développement de biofilms. Elle est la suivante : un biofilm est un agrégat de microorganismes dans lequel les cellules, incluses dans une matrice extracellulaire qu'elles produisent, adhèrent les unes aux autres et/ou à une surface formant une communauté organisée (Vert *et al.*, 2012).

Le passage d'un mode de vie planctonique à celui de biofilm est en partie régulé par le taux intracellulaire de di-guanosine monosphosphate cyclique (c-di-GMP) (McDougald *et al.*, 2012). La production et dégradation de cette molécule est contrôlée par deux types d'enzymes que sont

les diguanylate cyclases (DGC) et les phosphodiesterases (PDE). La synthèse de ces enzymes est sous la dépendance de signaux environnementaux, tels que le taux en oxygène, la disponibilité en nutriments ou encore la température, influençant de ce fait sur la concentration intracellulaire en c-di-GMP chez les bactéries. Une augmentation du taux en c-di-GMP favorise la formation de biofilm et inhibe le phénotype de motilité par la régulation de l'expression de gènes associés (Bassis and Visick, 2010 ; Yildiz and Visick, 2009).

Le mode de vie biofilm est éloigné de celui des cellules planctoniques, s'accompagne d'un changement dans l'expression des gènes par la bactérie lorsqu'elle passe d'un mode de vie à l'autre (Beloin and Ghigo, 2005 ; Rodrigues *et al.*, 2018 ; Wang, 2022). De plus, la formation de biofilm provoque la création de microenvironnements et de stress auxquels les cellules doivent s'adapter, ce qui induit un changement dans l'expression de leurs gènes et ainsi de leur physiologie (Sauer and Camper, 2001 ; Kirisits *et al.*, 2005 ; Koh *et al.*, 2007 ; Stewart and Franklin, 2008). C'est en partie la raison pour laquelle ce mode de vie confère une protection aux bactéries. De plus, la formation de biofilm s'accompagne de la production d'une matrice extracellulaire par les bactéries elles-mêmes, principalement composée de polysaccharides, protéines et ADN extracellulaires (Flemming and Wingender, 2010). Cette matrice assure elle aussi un rôle de protection face à l'environnement changeant. Ainsi, la vie sous forme de biofilms offre aux agents microbiens une homéostasie nécessaire à leur persistance au sein d'environnements oligotrophes.

2.2 FORMATION DE BIOFILM

N'importe quelles surfaces immergées se retrouvent colonisées par les bactéries environnantes. Le cycle de formation d'un biofilm sur une surface est la succession de trois étapes : (1) le déplacement de cellules bactériennes et leur adhésion réversible puis irréversible à une surface ; (2) la maturation du biofilm ; (3) et enfin la dispersion du biofilm via le détachement de

certaines cellules bactériennes retournant à un état planctonique et dont la dissémination dans l'environnement leur permettra de coloniser de nouvelles surfaces (Figure 9) (Stoodley *et al.*, 2002).

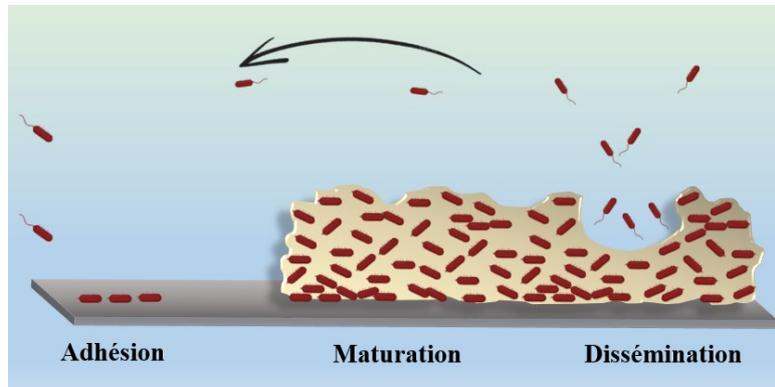


Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien. Les bactéries adhèrent à une surface (1) puis se multiplient et produisent une matrice extracellulaire (représentée en jaune) afin de former un biofilm (2) dont certaines bactéries se détacheront, retournant à l'état planctonique afin de coloniser de nouvelles surfaces (3).

2.2.1. ADHÉSION

Lorsqu'une surface est immergée, sa chimie de surface va être modifiée par l'adsorption des molécules provenant du milieu environnant. Suite à ce conditionnement de la surface, une partie des cellules en suspension va alors aller se fixer à ce support (Garrido *et al.*, 2014). Les cellules bactériennes approchent des surfaces par différents moyens, à l'aide de leur flagelle polaire, par chimiotactisme en réponse à la présence de molécules, via le mouvement brownien, la sédimentation ou encore le mouvement d'écoulement du liquide (Teughels *et al.*, 2006 ; Khan *et al.*, 2020). Les bactéries passeront ainsi d'un état mobile à un état sessile initiant la formation de biofilm. La première étape est l'adhésion des bactéries au support (Figure 10). Cet attachement est dans un premier temps dit **réversible**. La théorie DVLO (Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek) décrit l'interaction entre la cellule et la surface comme un équilibre entre les énergies physiques associées que sont les forces de van der Waals et les interactions électrostatiques (Figure 10) (Hermansson, 1999). Ainsi, si les forces répulsives deviennent trop importantes, les bactéries se détacheront de la surface (Garrett *et al.*, 2008). Cette répulsion est surmontée par des interactions moléculaires médiées par les structures protéiques retrouvées à

la surface bactérienne comme les flagelles, et pili de types I et IV (Pratt and Kolter, 1998; Bruzaud *et al.*, 2015; Berne *et al.*, 2018).

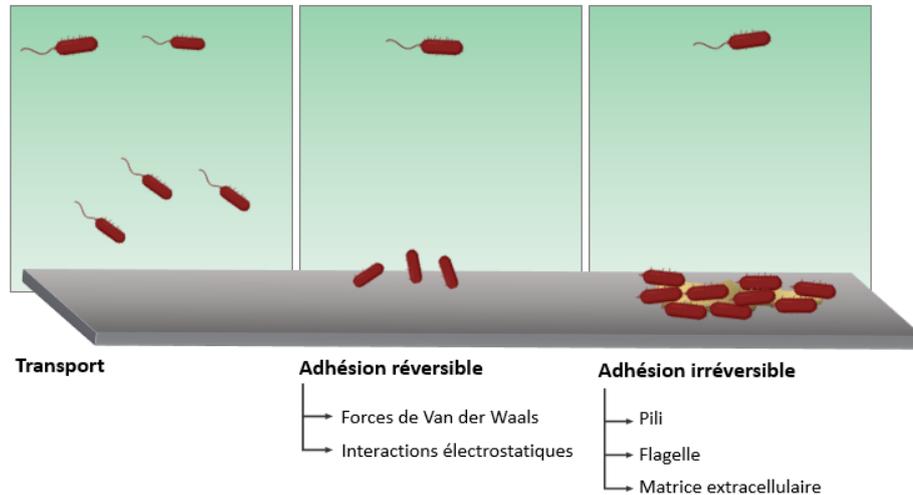


Figure 10 : Mécanismes généraux de l'adhésion des microorganismes aux surfaces.

Après que la cellule bactérienne ait surmonté les forces de répulsions et qu'un contact soit initié avec la surface, des changements transcriptionnels et phénotypiques ont lieu au sein des cellules bactériennes et l'adhésion devient **irréversible** (Dunne, 2002). À ce stade, la bactérie devient immobile et consolide son adhésion. La rotation du flagelle polaire est réprimée, une motilité de surface (twitching) est éventuellement mise en place par les pili de type IV, permettant aux cellules de se rapprocher entre elles (Figure 10) (Burrows, 2012 ; Berne *et al.*, 2018). Ce rapprochement associé à la division cellulaire permet la formation de microcolonies. Certaines souches mutées de *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi* présentant un défaut dans la synthèse du flagelle polaire ou du pilus de type IV ont présenté une diminution dans leur capacité à adhérer à des surfaces, ainsi qu'à former du biofilm (Luo *et al.*, 2016 ; Frischkorn *et al.*, 2013). En parallèle, les bactéries produisent une matrice extracellulaire favorisant leur maintien sur la surface (Figure 10) (Tsuneda *et al.*, 2003 ; Das *et al.*, 2010).

2.2.2. MATURATION DU BIOFILM

Les bactéries, après avoir établi une adhésion irréversible avec le substrat qu'elles ont colonisé, vont entamer le processus de maturation du biofilm. À cette étape, les bactéries continuent de se multiplier afin de former des agrégats, créant un tapis bactérien dense, et de produire la matrice extracellulaire (Figure 9). La formation d'un biofilm mature requiert la production d'une matrice extracellulaire qui va servir d'interface avec l'environnement, ainsi qu'un liant entre les bactéries et entre les bactéries et le substrat (Das *et al.*, 2010 ; Giglio *et al.*, 2013 ; Flemming and Wingender, 2010). Cette matrice confère au biofilm sa robustesse (résistance aux forces de cisaillement créées par des flux de liquide), permet le maintien des cellules à proximité les unes des autres, favorisant leurs interactions (Bazire *et al.*, 2010 ; Earl *et al.*, 2020 ; Campoccia *et al.*, 2021). Cela aboutit à la création d'une communauté organisée de micro-organismes au sein d'un même micro-habitat représenté par le biofilm. De ce fait, le biofilm acquiert une structure tridimensionnelle dont les caractéristiques dépendent des composants de la matrice extracellulaire, de l'environnement et des interactions entre les bactéries. Par exemple, *P. aeruginosa* est une bactérie qui présente un biofilm contenant des structures tridimensionnelles en forme de champignons quand elle est cultivée en chambre en flux sans citrate, cependant la structure de son biofilm devient plane en présence de citrate (Klausen *et al.*, 2003). Nielsen *et al.* (2000) ont observé la formation de micro-colonies mixtes composées de deux espèces bactériennes présentant une interaction sur le plan métabolique. En revanche, l'utilisation d'un milieu de culture métabolisable par les deux bactéries induit la formation de biofilms séparés (Nielsen *et al.*, 2000). La composition de la matrice extracellulaire est spécifique à chaque microorganisme, mais certains éléments tels que les exopolysaccharides, l'ADN extracellulaire et les protéines en restent les composants principaux (Flemming *et al.*, 2016).

Exopolysaccharides

Comme mentionné précédemment, les bactéries sécrètent des polysaccharides nécessaires à leur adhésion aux surfaces. Ces exopolymères jouent aussi un rôle important dans le processus de maturation du biofilm, allant jusqu'à représenter entre 50% et 90% du carbone organique total d'un biofilm mature (Donlan, 2002). Chez les bactéries à Gram négatif, ces exopolysaccharides peuvent être neutres ou polyanioniques. Ils participent à l'hydratation du biofilm en formant des liaisons avec des molécules d'eau, favorisant ainsi le maintien et l'échange de métabolites avec l'environnement (Flemming et Wingender, 2010). Les exopolysaccharides participent aussi à la protection des cellules contre des agents antimicrobiens auxquels ils se fixent, ralentissant leur pénétration au sein du biofilm (Flemming *et al.*, 2016). Chez les bactéries appartenant au genre *Vibrio*, deux principaux clusters de gènes ont été identifiés comme participant à la production d'exopolysaccharides. Le premier, le **cluster *vps*** (pour *Vibrio* polysaccharide *synthesis*) a initialement été découvert chez *V. cholerae*, mais a été depuis identifié chez *V. fischeri* ou encore *V. tapetis* (Figure 11) (Yildiz and Schoolnik, 1999 ; Yildiz and Visick, 2009 ; Rodrigues *et al.*, 2018). Les polysaccharides VPS peuvent composer jusqu'à 50% de la matrice totale des biofilms formés par *V. cholerae* et sont principalement composés de glucose et galactose (Limoli *et al.*, 2015 ; Ruhul and Kataria, 2021). Les opérons *vps*-I et *vps*-II sont impliqués dans la synthèse et l'exportation de VPS. La délétion de l'un ou des deux clusters provoque un aspect lisse des colonies et un défaut de formation et de structuration des biofilms formés par *V. cholerae* (Fong *et al.*, 2010). Ces gènes sont positivement régulés par le quorum sensing lorsque les bactéries sont à faible densité cellulaire (Figure 8) (Teschler *et al.*, 2015).

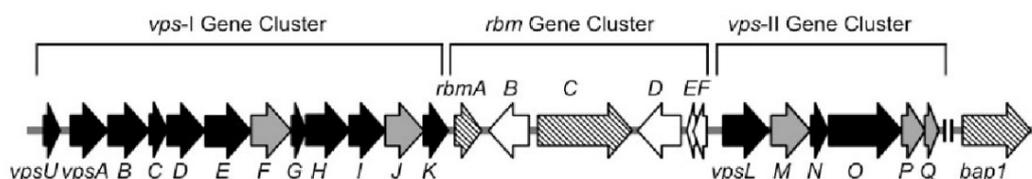


Figure 11 : Organisation des clusters de gènes codant les protéines responsables de la production des polysaccharides VPS et du cluster *rbm* codant les protéines de la matrice chez *V. cholerae*. Les deux opérons *vps-I* et *vps-II*, responsables de la synthèse de VPS, encadrent le cluster de gènes *rbm* impliqué dans la production de protéines composant la matrice du biofilm (d'après Fong *et al.*, 2010).

Chez *V. parahaemolyticus* il existe un cluster de gènes similaire au cluster *vps-II* de *V. cholerae*, dénommé *cps* (pour capsular polysaccharides) (Guo and Rowe-Magnus, 2010). Ce dernier est impliqué dans la formation de biofilm via la synthèse des protéines CPS contenant divers sucres tels que le glucose, galactose ou de la N-acétylglucosamine (Güvener and McCarter, 2003 ; Enos-Belarge and McCarter, 2000 ; Enos-Belarge *et al.*, 2005).

Le **cluster *syp*** (pour symbiosis polysaccharides) a été initialement identifié chez *V. fischeri* et depuis retrouvé dans le génome de plusieurs espèces appartenant au genre *Vibrio*, excepté *V. cholerae* (Figure 12A) (Yip *et al.*, 2005 ; Yildiz and Visick, 2009). Ce cluster de gènes ayant été découvert chez *V. fischeri*, il a largement été décrit chez cette espèce. Des souches mutantes dans lesquelles des gènes *syp* sont délétés présentent un défaut de production de biofilm (Morris and Visick, 2010 ; Yip *et al.*, 2005). Les mécanismes de régulation de ce cluster ne sont pas encore totalement élucidés. Il a été montré que la régulation du cluster *syp* est sous la dépendance de la protéine membranaire senseur-kinase RscS, fonctionnant en amont du régulateur SypG (Figure 12B). Ce dernier possède un domaine d'interaction avec le facteur sigma σ^{54} et active la transcription des gènes associés au cluster *syp*. Cela aboutit à la production de la protéine SypE qui présente un domaine sérine kinase N-terminal et un domaine sérine phosphatase C-terminal (Morris and Visick, 2010). SypE régule la production de biofilm et la colonisation du calmar *E. scolopes* en contrôlant l'état de phosphorylation de la protéine régulatrice SypA (Figure 12B) (Morris and Visick, 2013).

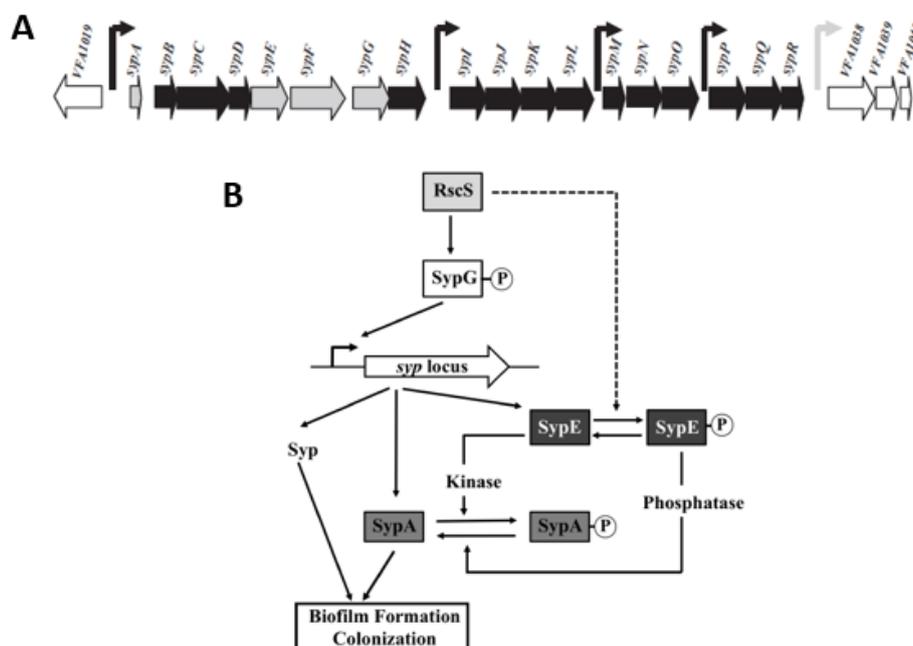


Figure 12 : Représentations schématiques du cluster *syp* et du modèle de régulation chez *V. fischeri*. Les gènes présentant une fonction régulatrice sont représentés en gris et ceux impliqués dans la biosynthèse des polysaccharides en noir. Les régions promotrices sont indiquées à l'aide des flèches noires courbées (A). Modèle de régulation du cluster *syp* proposé par Morris et Visick (B) (d'après Yip *et al.*, 2005 ; Morris and Visick, 2013).

Même si l'activité de SypA reste à ce jour inconnue, la surexpression des gènes *sypA* et *sypG* provoque la production de biofilm laissant penser qu'une forte concentration de SypA surmonte l'activité inhibitrice de SypE (Hussa *et al.*, 2008; Morris and Visick, 2010, 2013).

ADN extracellulaire

L'un des autres composants principaux de la matrice des biofilms bactériens est l'ADN extracellulaire (ADNe). En effet, des études ont montré que l'utilisation de DNase induit une diminution des biofilms formés par *Staphylococcus aureus* ou *P. aeruginosa* (Dengler *et al.*, 2015 ; Ruhel and Kataria, 2021). La présence d'ADNe au sein de la matrice a très vite été attribuée à la lyse cellulaire pouvant avoir lieu au sein du biofilm. En effet, cet ADN est similaire à l'ADN génomique de bactéries contenues dans le biofilm, qui peuvent parfois subir une autolyse cellulaire et ainsi relarguer leur matériel génétique (Okshevsky and Meyer, 2015).

Chez *P. aeruginosa*, l'ADNe présent dans le biofilm provient de la lyse cellulaire provoquée par divers mécanismes tels que la production de protéases ou la génération de peroxyde d'hydrogène. Chez cette bactérie, la lyse cellulaire peut de plus être induite, provoquant ainsi la libération de l'ADN bactérien (Okshevsky and Meyer, 2015 ; Sarkar, 2020). Chez *V. cholerae*, il a été montré que la formation de biofilm sur un substrat composé de chitine induit la compétence de la bactérie et ainsi l'acquisition d'ADN exogène (Meibom *et al.*, 2005). Cette induction est accompagnée de la synthèse du système de sécrétion de type VI (T6SS), qui est actif contre les cellules adjacentes et provoque leur lyse cellulaire amenant à la libération d'ADNe, qui est par la suite capté par les cellules compétentes (Borgeaud *et al.*). Ainsi, l'ADNe présent dans le biofilm peut être utilisé par les bactéries afin d'acquérir de nouveaux gènes. Chez les bactéries appartenant au genre *Vibrio*, l'ADNe, retrouvé comme principal constituant des biofilms, joue aussi un rôle dans le développement du biofilm et dans sa structuration en interagissant parfois avec des exopolysaccharides, tels que les VPS de *V. cholerae* (Rodrigues *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2020 ; Kanampalliwar and Singh, 2020).

Protéines

Les composants protéiques de la matrice du biofilm comprennent les protéines extracellulaires sécrétées, les adhésines de surface cellulaire, les appendices filamenteux que sont les flagelles et pili, ainsi que les protéines des vésicules membranaires. Les protéines représentent le troisième composant le plus retrouvé dans la matrice des biofilms (Flemming and Wingender, 2010). Ces dernières ont un rôle dans la robustesse du biofilm en créant des liaisons entre les molécules de la matrice et les cellules. Chez *P. aeruginosa*, la lectine LecB retrouvée à la surface de la bactérie se lie à l'exopolysaccharide Psl permettant la stabilisation de la matrice (Passos da Silva *et al.*, 2019). Chez cette même bactérie, le pilus de type IV est capable de se lier à l'ADNe présent, jouant ainsi un rôle dans la structuration du biofilm (van Schaik *et al.*,

2005). L'étude du protéome de la matrice du biofilm formé par *V. cholerae* a révélé la présence de 74 protéines extra-cytoplasmiques incluant plusieurs protéines de la membrane externe (OMP), divers appendices filamenteux, des enzymes, ainsi que les protéines Rbm (Absalon *et al.*, 2011). Chez *V. cholerae*, les deux opérons *vps*-I et *vps*-II encadrent le cluster de gènes *rbm* (pour « rugosity and biofilm structure modulators ») codant des protéines impliquées dans la maturation du biofilm (Figure 11) (Fong and Yildiz, 2007). RbmA et RbmC sont deux protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II (T2SS), qui s'accumulent à la surface des cellules. RbmA est responsable de l'aspect rugueux des colonies et est impliquée dans le développement et la stabilité du biofilm de *V. cholerae* (Fong *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2014). La protéine RbmC est quant à elle impliquée dans l'incorporation des polysaccharides VPS au sein de la matrice du biofilm (Berk *et al.*, 2012). De plus, chez *V. cholerae* et *V. fischeri*, des vésicules de membranes issues de la membrane externe sont retrouvées dans la matrice des biofilms (Altindis *et al.*, 2014 ; Shibata and Visick, 2012). Chez *V. fischeri*, leur présence est associée à la protéine RscS, ainsi qu'au cluster de gènes *syp* (Figure 12) (Shibata and Visick, 2012). *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* et *V. tapetis*, pathogènes d'organismes marins, produisent aussi des vésicules de membranes, qui pourraient être présentes dans la matrice des biofilms formés par ces espèces (Kondo *et al.*, 1993 ; Brameyer *et al.*, 2018 ; Madec *et al.*, 2014).

En parallèle des protéines participant à la structuration du biofilm, d'autres protéines présentant une activité enzymatique sont impliquées dans la dégradation de polymères retrouvés dans l'environnement externe. Chez *V. cholerae*, la chitinase ChiA-2 est présente dans la matrice du biofilm formé (Absalon *et al.*, 2011). Chez *P. aeruginosa*, de nombreuses enzymes ont été identifiées, dont certaines peuvent être associées à la virulence de la bactérie par leur action dans la dégradation de tissus appartenant à l'hôte permettant un apport en nutriment (Toyofuku *et al.*, 2012).

2.2.3. DISPERSION DU BIOFILM

La dispersion du biofilm est considérée comme la dernière étape dans le cycle de développement du biofilm. À ce stade, les bactéries vont passer d'un mode de vie sessile pour retourner à un état planctonique, puis coloniser de nouvelles surfaces et réinitialiser la formation d'un nouveau biofilm (Figure 9) (Donlan, 2002). Deux types de dispersion peuvent se produire. Le premier est la dispersion passive, provoquée par des forces physiques de l'environnement induisant le détachement d'une partie du biofilm (McDougald *et al.*, 2012). Le second mode de dispersion ne concerne que certaines cellules et est appelée dispersion active, puisque ce sont les bactéries appartenant au biofilm qui vont orchestrer leur départ. Cette dernière est une réponse des cellules face à des conditions environnementales qui vont tendre à défavoriser le mode de vie sous forme de biofilm chez les bactéries, telles que la disponibilité en nutriments, la concentration en oxygène ou encore les changements de température (Kaplan and Fine, 2002 ; Gjermansen *et al.*, 2005 ; An *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2017). L'expression génétique, la morphologie, le phénotype et le stade de différenciation et de développement varient entre les cellules d'un biofilm mature. Dans un biofilm formé par *Escherichia coli*, il a été mis en évidence la formation de sous-populations présentant une expression différente des gènes impliqués dans la synthèse d'appendices filamenteux (Besharova *et al.*, 2016). Au sein du biofilm de *P. aeruginosa*, la présence d'une sous-population synthétisant un sidérophore est nécessaire au développement d'une seconde sous-population (Yang *et al.*, 2009). C'est grâce à cette différenciation phénotypique des cellules au sein d'un même biofilm que des cellules redeviennent motiles et vont coloniser de nouvelles surfaces (Boles *et al.*, 2004 ; Mai-Prochnow *et al.*, 2006, 2008) (Figure 9). Le phénomène de dispersion est aussi associé à la désagrégation du biofilm. Chez *V. cholerae*, l'expression des gènes appartenant au cluster *vps* est inhibée lorsque la concentration en molécules signal est importante, provoquant une diminution de production de matrice extracellulaire par les cellules, facilitant ainsi la dispersion bactérienne

(Hammer and Bassler, 2003 ; Teschler *et al.*, 2015). En plus d'inhiber l'expansion de la matrice du biofilm, via des régulations transcriptionnelles contrôlées par le quorum sensing, les bactéries produisent des enzymes qui digèrent les composants de la matrice. Comme décrit précédemment, le cluster *rbm* présent chez *V. cholerae* est impliqué dans la production de protéines. Parmi ces protéines, RbmB est une enzyme capable de dégrader les polysaccharides (Fong and Yildiz, 2007). Des protéases et DNases ont aussi été décrites chez *V. cholerae* comme étant nécessaires à la dégradation de la matrice, ainsi qu'à la dispersion du biofilm (Seper *et al.*, 2011 ; Bridges *et al.*, 2020). Chez *Pseudoalteromonas tunicata*, la protéine secrétée AlpP amène à la production de peroxyde d'hydrogène, induisant la lyse cellulaire au sein des structures tridimensionnelles du biofilm, ce qui provoque la désagrégation de ces structures et la dispersion des bactéries (Mai-Prochnow *et al.*, 2004).

2.3 BIOFILM ET VIRULENCE

Le mode de vie en biofilm permet aux bactéries de se maintenir dans des habitats qui ne lui sont pas favorables, en leur prodiguant une protection face aux stress environnementaux et agents externes hostiles à leur survie (Flemming *et al.*, 2016). De nombreuses études ont déjà montré que la formation de biofilms par certaines bactéries est associée à des infections chroniques chez l'Homme (Vestby *et al.*, 2020). Les espèces appartenant au genre *Vibrio* sont capables de former du biofilm (paragraphe 2.2, page 32), mais le lien entre ce mode de vie et leur pathogénicité envers les organismes marins n'est à ce jour pas mis évidence. Une analyse transcriptomique a montré que *V. tapetis* CECT4600 exprime des gènes de virulence qui sont associés au système de sécrétion de type VI (T6SS) (Rodrigues *et al.*, 2018). De la même manière, chez *V. cholerae*, l'expression de gènes codant une entérotoxine, la toxine du choléra, ainsi que pour les régulateurs de virulence Tox est augmentée lorsque la bactérie forme du biofilm (Gallego-Hernandez *et al.*, 2020). Ce mode de vie permet à la bactérie de se maintenir

dans les environnements aqueux (Teschler *et al.*, 2015). En laboratoire, il a été démontré que la formation de biofilm par *V. cholerae* provoque l'apparition de cellules avec un phénotype d'hyper-infectivité (Faruque *et al.*, 2006 ; Tamayo *et al.*, 2010). Ces résultats soutiennent un modèle de transmission du choléra dans lequel la formation de biofilm contribue au pouvoir pathogène, ainsi qu'à sa persistance dans l'environnement. Bien que le rôle de ce mode de vie au sein de l'organisme hôte ne soit pas encore établi, une étude suggère que les VPS sont produits pendant l'infection. La délétion de gènes liés aux deux clusters *vps* provoque un défaut de production de biofilm et un défaut de colonisation d'intestin de souris. Les auteurs de cette étude ont ainsi émis l'hypothèse que la production de ces exopolysaccharides est nécessaire à la bactérie pour s'établir dans l'hôte (Fong *et al.*, 2010). Dans un contexte de relation symbiotique, le biofilm formé par *V. fischeri* est nécessaire à la colonisation, ainsi qu'à son maintien dans le calmar *E. scolopes*. La délétion de certains gènes du cluster *syp* provoque une absence de formation de biofilm chez la bactérie, qui s'est aussi révélée incapable de coloniser le calmar (Shibata *et al.*, 2012 ; Yip *et al.*, 2005). Ces mêmes résultats ont aussi été observés chez *V. parahaemolyticus*, suggérant l'importance de la production de biofilm et de la synthèse des polysaccharides à partir du cluster *syp* pour la colonisation du calmar *E. scolopes* (Liu *et al.*, 2022 ; Shibata *et al.*, 2012).

À ce jour, aucune étude n'a permis d'observer la présence de cellules de *Vibrio* sous forme d'agrégats au sein d'organismes infectés. L'observation de biofilms bactériens associés aux surfaces chitineuses pouvant être retrouvées au niveau des organismes marins est associée à leur persistance dans l'environnement plus qu'à leur pouvoir infectieux (Reguera and Kolter, 2005 ; Pruzzo *et al.*, 2008 ; Markov *et al.*, 2015).

3. LA VIBRIOSE DE L'ORMEAU

3.1 GÉNÉRALITÉS SUR L'HÔTE : *HALIOTIS* SP.

Les ormeaux sont des gastéropodes marins du genre *Haliotis*, retrouvés dans les eaux tropicales et tempérées du monde entier. Ils vivent généralement accrochés aux rochers à de faibles profondeurs entre 0 et 10 mètres, dans des habitats à fort courant et hautement oxygénées. Le nom d'*Haliotis* vient du grec « halios » désignant la mer, habitat naturel de l'animal et « otis » signifiant l'oreille, en rapport avec la forme spiralée de la coquille (Geiger, 2000).

En terme de production aquacole, celle de l'ormeau représente une part assez faible, mais reste cependant un met délicat très prisé dans de nombreuses régions du monde et particulièrement en Asie (Cook, 2014). Dans les années 1970, cette production a largement chuté pour cause de surexploitation, pêches illégales et maladies. Depuis, elle ne cesse d'augmenter et les pays asiatiques restent les producteurs principaux sur le marché (Cook, 2016). En Europe, la principale espèce cultivée est *Haliotis tuberculata* puisque c'est la seule espèce européenne capable d'atteindre la taille réglementaire pour être récoltée (Huchette et Clavier, 2004). Cette espèce comprend trois sous-espèces, décrites par leurs caractéristiques morphologiques, que sont *Haliotis tuberculata tuberculata*, *Haliotis tuberculata lamellosa* et *Haliotis tuberculata coccinea* (Mgaya 1995). Les trois sous-espèces de *H. tuberculata* sont retrouvées dans les eaux du nord de l'Afrique jusqu'aux côtes atlantiques de l'Irlande. Ainsi, *H. tuberculata tuberculata* est retrouvée dans tout le bassin méditerranéen jusque sur les côtes d'Irlande, *H. tuberculata coccinea* est présente sur les côtes marocaines, aux Açores et îles canaries et en Espagne alors que *H. tuberculata lamellosa* est retrouvée exclusivement en Méditerranée (Geiger, 2000). L'ormeau européen *H. tuberculata tuberculata* a été implanté dans les années 1970 dans le but de développer son aquaculture en France. La pêche professionnelle de cette espèce en Europe a débuté en 1994 (Huchette et Clavier, 2004). À la fin des années 90, une centaine de kilogrammes d'ormeaux européens était produite et vendue en Normandie par une compagnie

régionale (Synergie Mer et Littoral : SMEL) développant la production d'ormeaux en milieu semi-fermé (Nicolas *et al.*, 2002). La suite de ce manuscrit ne présentera que l'espèce *H. tuberculata tuberculata*.

3.1.1. ANATOMIE

L'ormeau est un gastéropode qui possède une seule coquille, spiralée, qui recouvre entièrement l'animal (Figure 13 A et B). Du fait de la présence d'une coquille unique, l'ormeau présente un mode de vie fixé dans le but de protéger la partie ventrale, c'est-à-dire les différents organes, du milieu extérieur. La coquille possède une rangée de perforations permettant le passage d'eau (Figure 13) (Morash and Alter, 2016). Les trous de la coquille permettent aussi l'excrétion de gamètes médiée par les tentacules. Sous cette dernière est retrouvé un muscle adducteur reliant le pied à la coquille (Figure 13D).

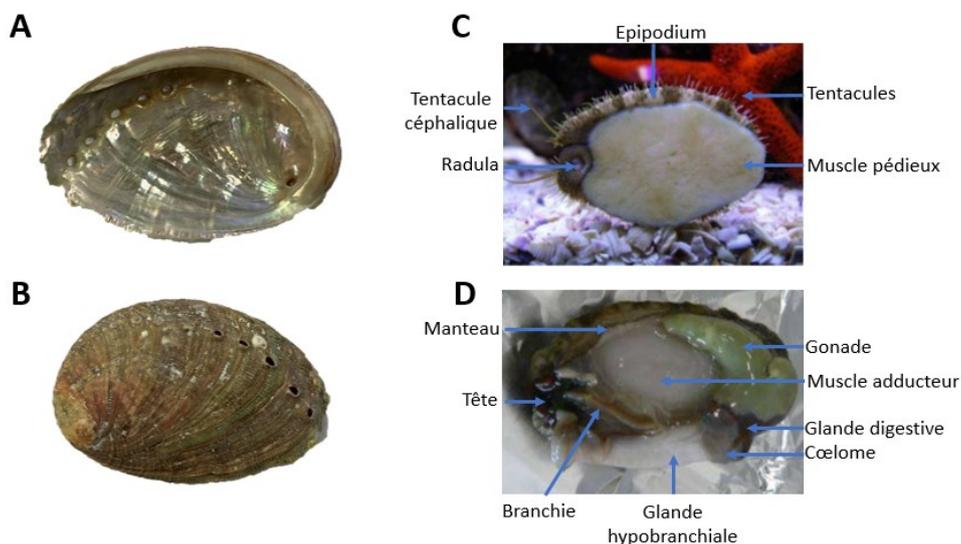


Figure 13 : Anatomie de l'ormeau. Photographies d'une coquille de *H. tuberculata tuberculata* en vue ventrale (A) et dorsale (B). Photographies de l'anatomie d'un ormeau européen en vue ventrale (C) et des principaux organes observables sur un animal décoquillé (d'après Travers, 2008).

Autour de ce muscle, sont retrouvés les organes internes comprenant les organes respiratoires, l'organe reproducteur et la glande digestive, qui seront retenus par le manteau (Figure 13D). Le tout est entouré de l'épipedium qui est un organe sensoriel permettant à l'animal de détecter son environnement grâce à la présence de tentacules sensoriels (Figure 13C). Et enfin, on retrouve le muscle pédieux, qui permet à l'animal de rester accroché à une surface et participe à son déplacement (Figure 13C) (Morash and Alter, 2016).

Alimentation

La radula, sorte de langue munie de nombreuses dents chitineuses, leur permet de brouter des algues brunes, vertes et rouges. En aquaculture, de nombreuses études ont été menées afin d'optimiser la croissance de ces animaux dans le but d'atteindre les tailles de récolte plus rapidement. Il a notamment été découvert que le régime alimentaire de ces animaux influence leur croissance et certaines espèces d'algues ont été sélectionnées pour l'aquaculture afin de favoriser ce processus (Daume *et al.*, 2004 ; Naidoo *et al.*, 2006). Le microbiote intestinal des gastéropodes herbivores comme l'ormeau européen est composé de bactéries capables de dégrader les composants cellulaires complexes des membranes algales tels que la cellulose ou encore les pectines (Flint *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2014). De ce fait, le microbiote intestinal évolue en fonction du régime alimentaire du gastéropode. Il a cependant été montré chez l'ormeau européen qu'une communauté initiale est établie dans la glande digestive à partir du stade juvénile de l'animal (Gobet *et al.*, 2018).

Système respiratoire

La fonction respiratoire est assurée par une paire de branchies, qui est associée à une glande hypobranchiale (Figure 13D). L'eau chargée en oxygène passe entre les lamelles constituant les branchies. Une grande partie de ces organes est reliée au manteau, un organe très vascularisé

permettant une bonne oxygénation de l'hémolymphe (Figure 13D) (Manganaro *et al.*, 2012). Les élevages aquacoles se doivent de contrôler le taux en oxygène, qui peut fluctuer dans les eaux côtières dont ils dépendent. En effet, des périodes d'hypoxie peuvent survenir dans l'environnement marin et, face à ce phénomène, les ormeaux auront tendance à s'échapper de leur bassin en recherche d'eau plus fortement chargée en oxygène. De plus, cela peut engendrer un stress défavorable à leur croissance (Harris *et al.*, 2005). Il est donc important pour les élevages aquacoles de réguler le taux en oxygène et de le maintenir à niveau suffisant.

Systeme circulatoire

Les ormeaux possèdent un système circulatoire ouvert, composé d'un cœur envoyant l'hémolymphe à travers les artères et les veines en direction des organes. Au sein de ce fluide sont retrouvées des cellules hémocytaires assurant principalement un rôle dans le transport d'oxygène et l'immunité de l'ormeau (Travers *et al.*, 2008c ; Hong *et al.*, 2019).

Le muscle pédieux

Comme dit précédemment, les ormeaux possèdent un mode de vie très sédentaire et sont principalement retrouvés fixés à des rochers grâce à leur muscle pédieux. Cette fixation leur permet de parer à la prédation et de résister à l'action des vagues, qui pourrait provoquer le détachement des ormeaux. Lorsqu'un ormeau se retrouve sur le dos, il se sert de ce muscle pour se retourner rapidement (Travers, 2008). Ce dernier, lubrifié avec du mucus sécrété, permet à l'animal de se déplacer dans le seul but de se nourrir, s'avancant la nuit en direction d'algues à la dérive (Morash and Alter, 2016).

3.1.2. REPRODUCTION

Les ormeaux suivent un cycle de reproduction annuel. La maturation des gamètes est associée au développement des gonades, et débute à la fin de l'hiver. L'augmentation de la taille de cet organe, qui dure jusqu'à l'été, permet ainsi son observation utile à la distinction des deux sexes. S'en suit une période de ponte, c'est-à-dire la libération des gamètes dans l'environnement marin, pendant la période estivale lorsque les températures de l'eau de mer sont les plus élevées. Et enfin, après l'excrétion des gamètes, les gonades se résorbent et entrent dans un état de quiescence pendant la période automnale (Booolootian *et al.*, 1962 ; McAvaney *et al.* 2004 ; Webber and Giese, 1969). Une étude a montré que la maturation de l'ormeau européen peut être induite par une augmentation progressive de la température (Travers *et al.*, 2009a). Ainsi, les fermes aquacoles sont en capacité de conditionner les animaux pour contrôler leur période de maturation. La reproduction est un processus qui demande une importante quantité d'énergie, qui est dirigée vers le développement des gonades et la production de gamètes, ralentissant ainsi la croissance. Il existe un compromis dans la répartition de l'énergie entre la reproduction, l'immunité et la résistance au stress hypoxique et au stress dû à la manipulation des ormeaux, qui peut expliquer les mortalités survenant le plus souvent durant la période estivale (Travers *et al.*, 2008b ; Morash and Alter, 2016).

3.1.3. SYSTÈME IMMUNITAIRE

Chez les invertébrés, l'immunité cellulaire est médiée par les hyalinocytes et granulocytes, deux types d'hémocytes retrouvés dans l'hémolymphe, ainsi qu'une immunité appelé « priming », similaire à la réponse immunitaire adaptative des vertébrés, qui est apportée par les activités des lymphocytes, les anticorps et les immunoglobines (Allam *et al.*, 2002 ; Hooper *et al.*, 2007 ; Hong *et al.*, 2019). Chez les invertébrés, l'immunité « priming » est soit une reconnaissance spécifique d'un agent pathogène conduisant à une réponse immunitaire plus rapide et intensive

après une seconde exposition, soit une réponse non spécifique après une première infection (Kurtz, 2005). Chez l'ormeau européen, cette immunité « priming » a été observée dans une population n'ayant jamais subi de mortalité provoquée par *V. harveyi* ORM4 dans l'environnement naturel (Dubief *et al.*, 2017).

Les hyalinocytes et granulocytes impliqués dans l'immunité cellulaire participent aux phénomènes de phagocytose, sécrétion d'enzymes et production de ROS dans le but de supprimer les agents pathogènes (Hooper *et al.*, 2007 ; Allam and Pales Espinosa, 2015).

Reconnaissance de l'agent pathogène

La première étape de la réponse immunitaire suite à l'intrusion d'un corps étranger chez les mollusques est la reconnaissance de ce dernier par les cellules immunitaires.

Les lectines sont des glycoprotéines présentes à la surface membranaire des hémocytes ou qui sont sécrétées par ces mêmes cellules et qui participent à la reconnaissance des particules étrangères. Elles se lient aux sucres retrouvés à la surface des cellules pathogènes provoquant leur agglutination sur l'agent pathogène (Pees *et al.*, 2016). Les lectines retrouvées dans le fluide circulant des mollusques sont souvent composées de différentes sous-unités, permettant ainsi une reconnaissance d'une large diversité de pathogènes (Yakovleva *et al.*, 2001). Chez les mollusques, trois classes de lectines existent, alors que seule la lectine de type C (Ca^{2+}) a été décrite chez les ormeaux. Un gène codant une lectine de type C a été identifié chez l'ormeau *Haliotis discus discus*, et la transcription de ce gène est induite après contact avec *V. alginolyticus*. La mise en présence de cette bactérie avec cette protéine aboutit à l'agglutination de cette dernière autour du pathogène (Wang *et al.*, 2008). Plus récemment, une lectine de type C a aussi été caractérisée chez *Haliotis discus hannai* (Choi *et al.*, 2022).

En plus des lectines, les PRR (pattern recognition receptors) retrouvés à la surface des cellules immunitaires permettent la reconnaissance des microorganismes étrangers en détectant les

PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Parmi les PRR sont retrouvés les récepteurs de type Toll (Toll-like receptors [TLR]), dont certains ont pu être identifiés chez plusieurs espèces d'ormeaux dont *H. tuberculata* (Dubief, 2017) Des gènes codant de potentiels TLR identifiés chez *H. diversicolor* et *H. discus discus* présentent une augmentation de leur expression en présence de bactéries pathogènes appartenant au genre *Vibrio* (Ge *et al.*, 2011 ; Elvitigala *et al.*, 2013 ; Priyathilaka *et al.*, 2019).

Transduction du signal

Après la reconnaissance des agents pathogènes, la transduction du signal se fait à travers des voies de signalisation intracellulaire qui aboutissent à une réponse immunitaire. Chez les ormeaux, deux voies ont pu être identifiées. La première est la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B), dont des protéines homologues ont été identifiées dans un premier temps chez *H. diversicolor supertexta*, puis chez *H. discus discus* et *H. tuberculata* notamment (Jiang and Wu, 2007 ; Zoysa *et al.*, 2010 ; Cardinaud *et al.*, 2015). La seconde voie identifiée est celle des MAP-kinases (mitogen-activated kinases) impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont ceux liés à l'immunité, tels que la phagocytose et la production de ROS. Cette seconde voie, subdivisée en trois sous-voies que sont les voies ERK, JNK et p38, a été plus tardivement identifiée chez les espèces de *Haliothis*, en réponse à une infection ou un stress hypoxique (Travers *et al.*, 2009b ; Perera *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2019).

Élimination de l'agent pathogène

Chez les mollusques, l'élimination des agents étrangers est principalement attribuée à l'immunité cellulaire. En effet, la majorité des cellules immunitaires sont capables de phagocytose. C'est un processus permettant l'internalisation de particules étrangères, suite à un remaniement du cytosquelette de la cellule immunitaire, dans le but de les éliminer (Yakovleva

et al., 2001). Cette élimination est permise par la fusion du phagosome, organite formé au sein d'une cellule phagocytaire, avec le lysosome, organite cellulaire contenant des enzymes, formant le phagolysosome au sein duquel il y aura dégradation des bactéries pathogènes (Tiscar and Mosca, 2004). Leur élimination au sein de ce compartiment est effectué par la production de ROS et/ou par la libération d'enzymes lysosomales (Hooper *et al.*, 2007). Le processus de phagocytose a été mis en évidence chez différentes espèces d'ormeaux, via l'utilisation de billes fluorescentes mises en contact avec les hémocytes, puis quantification par cytométrie en flux des hémocytes contenant ces billes (Hooper *et al.*, 2007 ; Cardinaud *et al.*, 2015).

En plus de la phagocytose, la production de ROS est un facteur essentiel dans l'élimination de l'agent pathogène. Ils sont formés à partir de la réduction d'O₂ par la NADPH oxydase, produisant l'ion superoxide (O₂⁻), qui servira à la production d'autres espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Bayne *et al.*, 2001). La libération de ces molécules entraîne un stress oxydant causant des dommages chez l'agent pathogène s'il est dans l'incapacité de se protéger. La cellule immunitaire de l'hôte doit elle aussi faire face à ce stress oxydant et pour cela elle synthétise des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase afin de limiter les dommages pouvant être causés sur les cellules de l'hôte (Valavanidis *et al.*, 2006). Chez différentes espèces d'ormeaux, une production de ROS avait été montrée en réponse à une infection par des *Vibrio* pathogènes (Hooper *et al.*, 2007 ; Travers *et al.*, 2009b).

Effet de la température sur l'immunité cellulaire

La mortalité des ormeaux associée à des pathogènes ont souvent été enregistrées pendant les périodes estivales, lorsque les températures de l'eau sont les plus élevées dans l'année. Des études se sont portées sur l'effet de la température sur les paramètres associés à l'immunité chez l'ormeau. Les auteurs ont ainsi montré une susceptibilité accrue des ormeaux face à une

infection par des agents pathogènes lorsque la température était élevée. Ils ont notamment expliqué cela par le fait que des paramètres tels que la quantité d'hémocytes circulants, le taux de phagocytose et la production de ROS étaient impactés par cette augmentation de température (Hooper *et al.*, 2007 ; Cheng *et al.*, 2004 ; Dang *et al.*, 2012).

3.2 VIBRIOSES CAUSÉES PAR LE CLADE *HARVEYI* CHEZ LES ESPÈCES DE *HALIOTIS*

Précédemment, nous parlions de la forte baisse du stock d'ormeaux qui s'est produite au cours des années 1970 (Cook and Roy Gordon, 2010). Certains épisodes d'infections bactériennes survenus auprès de populations d'ormeaux ont engendré de fortes mortalité impactant la production aquacole. Il est important de noter que le développement d'infections est un effet combiné de plusieurs facteurs. Des éléments abiotiques, comme les variations environnementales et biotiques, tels que la présence de pathogènes, le patrimoine génétique de l'ormeau, ainsi que les conditions physiologiques de l'animal vont conditionner et favoriser ce phénomène. Les bactéries appartenant au clade *Harveyi* (paragraphe 1.2.2, page 9) sont en partie responsables de mortalité survenues auprès des populations d'ormeaux (Austin, 2010).

3.2.1. VIBRIOSES CAUSÉES PAR *V. PARAHAEMOLYTICUS*

À la fin des années 1990, durant la période estivale, plusieurs épisodes de mortalité ont été enregistrés à Taiwan et en Chine auprès de population d'ormeaux adultes, ainsi que de post-larves de *H. diversicolor supertexta*. Les animaux adultes présentent une perte d'adhérence causée notamment par un muscle pédieux rétréci, l'épipodium décoloré et des lésions sur les tissus viscéraux (Liu *et al.*, 2000 ; Huang *et al.*, 2001). Les post-larves sont quant à elles devenues blanches, léthargiques et se détachent des diatomées sur lesquelles elles sont cultivées (Cai *et al.*, 2006b, 2007 ; Cheng *et al.*, 2008). *V. parahaemolyticus* a été isolé à partir de l'hémolymphe d'ormeaux et à partir de culture de post-larves moribondes. Des

expérimentations d'infection sur des ormeaux adultes sains par injection des souches isolées ou de leurs produits extracellulaires ont permis de reproduire les symptômes décrits précédemment et ont provoqué la mort des animaux (Liu *et al.*, 2000). Une étude récente s'est intéressée à la réponse métabolique de *H. discus hannai* face à une infection par *V. parahaemolyticus* (Lu *et al.*, 2017). Les auteurs ont montré une accumulation d'ATP au niveau des tissus branchiaux pour faire face à cette infection. De plus, il a été montré une augmentation de métabolites dans l'hépatopancréas, dont certains révèlent un dommage causé sur les tissus, pouvant être dû à une production excessive de ROS par l'hôte en réponse à l'infection. Enfin, ces réponses sont différentes en fonction du sexe de l'animal, la réponse étant plus intense chez les ormeaux femelles (Lu *et al.*, 2017).

La capacité de *V. parahaemolyticus* à induire des mortalités est favorisée par une augmentation de la température de l'eau de mer. Comme décrit dans le paragraphe 3.1.3, ce paramètre affecte l'immunité cellulaire des ormeaux. Dans ce cas d'infection, les auteurs ont montré que la température provoque une baisse de la phagocytose et de l'activité de la phénoloxydase, une enzyme responsable de la conversion de phénols en quinones, réaction qui forment des composés intermédiaires toxiques pour les microorganismes (Cheng *et al.*, 2004 ; Soderhall et Cerenius 1998).

3.2.2. VIBRIOSES CAUSÉES PAR *V. ALGINOLYTICUS*

Plusieurs cas de vibrioses impliquant *V. alginolyticus* et touchant les espèces *H. diversicolor supertexta*, *Haliotis rufescens* et *Haliotis asinina* au sein d'écloseries asiatiques ont été rapportés.

V. alginolyticus a été isolé à partir de l'hémolymphe d'ormeaux adultes appartenant à l'espèce *H. diversicolor supertexta* et présentant des abcès et ulcères au niveau du manteau (Lee *et al.*, 2001). Cette espèce bactérienne a également été isolée à partir de cultures de post-larves de la

même espèce d'ormeaux au sein de structures aquacoles (Cai *et al.*, 2006a). Dans ce cas de vibriose, une augmentation de température rend les ormeaux plus susceptibles à la bactérie, ainsi qu'aux produits extracellulaires qu'elle sécrète (Lee *et al.*, 2001).

Concernant l'espèce *H. rufescens*, *V. alginolyticus* a dans un premier temps été isolée du muscle pédieux d'animaux juvéniles, suite à des épisodes de mortalité survenus au sein de structures aquacoles (Elston and Wood, 1983). Les animaux présentaient des lésions aux niveaux des branchies, du tractus digestif, du muscle pédieux et de l'épipodium. Par la suite, cette bactérie a aussi été isolée de cultures de larves et post-larves suite à plusieurs mortalités survenues en éclosion (Anguiano-Beltrán *et al.*, 1998)

3.2.3. VIBRIOSES CAUSÉES PAR *V. HARVEYI*

Le premier cas de vibriose d'ormeaux induit par *V. harveyi* a été identifié chez l'espèce *H. diversicolor supertexta* suite à des épisodes de mortalité survenus dans des structures aquacoles au Japon. Les animaux présentaient une perte d'adhérence, ainsi que des lésions et la présence de pustules blanches sur le muscle pédieux (Nishimori *et al.*, 1998). Des expérimentations en laboratoire ont elles aussi établi un lien entre la capacité de la bactérie à induire des mortalités et l'augmentation de la température (Jiang *et al.*, 2013). Par la suite, *V. harveyi* a été responsable de la mortalité de près de 60 000 ormeaux adultes *H. discus hannai* au cours de l'été 2002 au Japon. Ces animaux présentaient un œdème hémolympatique à partir duquel la bactérie a pu être isolée (Sawabe *et al.*, 2007a). Des expérimentations d'infections par baignade d'ormeaux adultes sains ont permis de confirmer le pouvoir pathogène et mortel de la souche isolée. De plus, grâce à une observation au microscope à épifluorescence après infection, la bactérie est retrouvée sous forme d'amas au niveau des branchies de l'animal. Cet organe pourrait être la porte d'entrée de *V. harveyi* dans l'ormeau, puisque cette dernière n'a pu être observée que sur les branchies (Sawabe *et al.*, 2007a).

V. harveyi est aussi responsable de mortalité auprès de populations d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata*. Plusieurs études ont été menées afin de caractériser ce couple infectieux. Ces recherches vont être présentées dans la partie suivante.

3.3 ÉTUDE DU MODÈLE *V. HARVEYI* – *H. TUBERCULATA*

3.3.1. ISOLEMENT DE *V. HARVEYI* ORM4

À la fin des années 1990 en Bretagne et en Normandie, plusieurs épisodes de mortalité ont été enregistrés auprès des populations naturelles et d'élevages d'ormeaux européens, atteignant parfois 80% de mortalité. Elles ont débuté durant l'été 1997 près de Concarneau, puis ont touché en 1998 les populations situées à Saint-Malo, atteignant les côtes Normandes en 1999 (Figure 14) (Nicolas *et al.*, 2002). Mises à part des mortalités survenues en 1963 suite à un hiver particulièrement froid, aucun épisode de mortalité de cette ampleur n'avait été observé dans ces régions (Nicolas *et al.*, 2002).

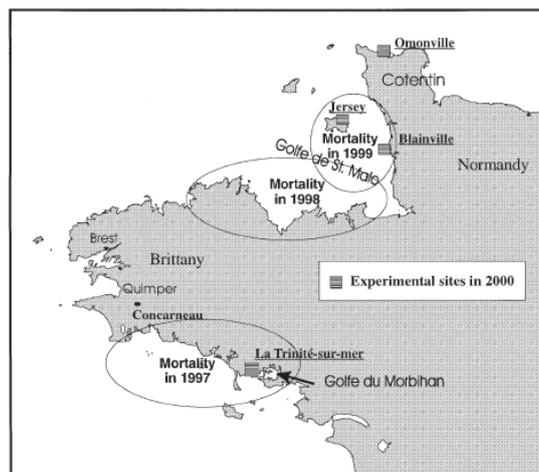


Figure 14 : Zones géographiques touchées par les mortalités d'ormeaux européens *H. tuberculata* entre 1997 et 1999 (d'après Nicolas *et al.*, 2002).

L'agent pathogène responsable a été isolé à partir d'échantillons de tissus d'ormeaux moribonds en 1999. Suite à une caractérisation génétique et phénotypique, la souche isolée a été affiliée à l'espèce *V. carchariae* et nommée *V. carchariae* souche ORM4 (Nicolas *et al.*, 2002). Cette

espèce étant un synonyme de *V. harveyi*, pour la suite du manuscrit elle sera nommée *V. harveyi* ORM4 (Gauger and Gómez-Chiarri, 2002). Cette nouvelle souche a par la suite été utilisée dans le cadre d'expérimentations d'infection d'animaux sains par balnéation ou par injection. Des pustules blanches sur le muscle pédieux ont pu être observées chez les ormeaux infectés et les premières mortalités sont survenues après seulement deux jours (Nicolas *et al.*, 2002). Des observations microscopiques ont révélé la présence d'une bactérie motile dans l'hémolymphe et différents tissus tels que le muscle pédieux. En parallèle, des ormeaux sains ont été placés en Juin 2000 sur 4 sites, représentés sur la Figure 14, allant du sud de la Bretagne jusqu'au Cotentin. Des mortalités ont pu être enregistrées sur les sites de Blainville et de la Trinité, d'où des bactéries phénotypiquement identiques à *V. harveyi* ORM4 ont à nouveau pu être isolées à partir d'ormeaux moribonds, confirmant ainsi son implication dans les épisodes de mortalité rapportés les années précédentes (Nicolas *et al.*, 2002). Les études qui ont été menées par la suite et qui se sont portées sur ce couple infectieux ont permis de déterminer le cycle infectieux de *V. harveyi* ORM4.

3.3.2. CYCLE INFECTIEUX DE *V. HARVEYI* ORM4 DANS L'ORMEAU EUROPÉEN *H. TUBERCULATA*

La compréhension de l'infection provoquée par *V. harveyi* ORM4 passe par l'étude de son cycle infectieux et donc sa localisation au sein de l'animal. Une approche de biologie moléculaire a permis pour la première fois l'observation de la bactérie au sein de l'animal, grâce à l'utilisation d'un plasmide lui permettant de synthétiser une protéine à fluorescence verte appelée GFP (Green Fluorescent Protein) (Figure 15) (Travers *et al.*, 2008a). Par la suite, à partir d'infections expérimentales d'ormeaux européens par *V. harveyi* ORM4, divers tissus ont été échantillonnés afin de détecter et quantifier la bactérie par dénombrements sur milieux gélosés et PCR quantitative (qPCR) (Cardinaud *et al.*, 2014a). Toutes ces études ont permis d'établir le cycle infectieux de *V. harveyi* ORM4 au sein de l'ormeau européen *H. tuberculata*.

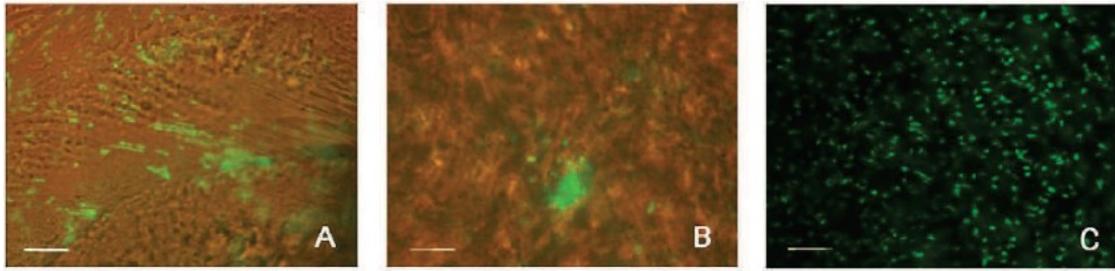


Figure 15 : Observations au microscope à épifluorescence de *V. harveyi* ORM4-GFP dans les tissus et l'hémolymphe d'ormeaux européen *H. tuberculata* après 48 h d'infection. Branchies (A), muscle pédieux (B), hémolymphe (C). Barre d'échelle = 10µm. (d'après Travers et al., 2008a).

Colonisation

L'étape de colonisation est cruciale pour l'établissement de la bactérie au sein de l'animal. *V. harveyi* ORM4, bactérie marine présente dans la colonne d'eau, colonise dans un premier temps les branchies et la glande hypobranchiale de l'animal. En conditions de laboratoire, ceci se produit dès les premières heures suivant la mise en contact des animaux avec les bactéries par baignade. En effet, les observations microscopiques et quantifications bactériennes ont permis de mettre en lumière la présence de la bactérie sur ces organes (Figure 15A) (Travers *et al.*, 2008a). De plus, après six heures de mise en contact la concentration bactérienne augmente d'un facteur cinq dans les branchies d'animaux infectés (Cardinaud *et al.*, 2014a). L'équipe de Sawabe avait elle aussi mis en évidence, via l'utilisation de bactéries exprimant la GFP, la présence de *V. harveyi* sur les branchies de *H. discus hannai* après 48h d'infection (Sawabe *et al.*, 2007a). Cet organe étant directement en contact avec l'eau de mer, il n'est pas étonnant qu'il soit le premier compartiment colonisé par *V. harveyi* ORM4. Les branchies sont recouvertes de mucus, qui constitue une barrière physique contre l'environnement extérieur et est composé de complexes protéines-polysaccharides, de cellules épithéliales et de nombreuses molécules bioactives (Allam and Pales Espinosa, 2015).

Prolifération

Les branchies et la glande hypobranchiale sont des organes localisés près du système circulatoire de l'animal. Après avoir colonisé les branchies, *V. harveyi* ORM4 passe dans l'hémolymphe, puisqu'elle y est retrouvée après trois heures de mise en contact (Figure 15) (Cardinaud *et al.*, 2014a ; Travers *et al.*, 2008a). Dans ce compartiment, la concentration en bactéries augmente progressivement au cours de l'infection, suggérant qu'il y ait une multiplication bactérienne (Cardinaud *et al.*, 2014a ; Dubief *et al.*, 2017). La capacité de la bactérie à se multiplier dans l'hémolymphe a déjà été suggérée auparavant, lors d'une étude *in vitro* pendant laquelle *V. harveyi* ORM4 a été mise en contact de l'hémolymphe et a été capable de croître malgré la présence des cellules immunitaires (Travers *et al.*, 2009b). Des études complémentaires ont d'ailleurs permis d'observer une réponse immunitaire des hémocytes suite à une infection par *V. harveyi* ORM4, confirmant ainsi sa présence dans l'hémolymphe (Cardinaud *et al.*, 2015). En fin d'infection, la concentration en bactéries atteint 10^9 cellules/mL d'hémolymphe, causant ainsi une septicémie à l'origine de la mort de l'animal (Travers *et al.*, 2008a).

À ce jour, aucun mécanisme de virulence bactérien n'a pu être identifié comme étant nécessaire au développement de l'infection dans l'ormeau européen par *V. harveyi* ORM4. Cependant, divers facteurs ont pu être identifiés comme influençant la sensibilité de l'animal à la bactérie.

3.3.3. FACTEURS INFLUENÇANT L'INFECTION CAUSÉE PAR *V. HARVEYI* ORM4

Le développement d'infection n'est pas seulement dépendant de l'agent pathogène, l'hôte ainsi que l'environnement vont moduler les interactions entre les différents protagonistes pour aboutir ou non à une infection. Depuis l'identification de *V. harveyi* ORM4, les études se portant sur ce couple infectieux ormeau-*Vibrio* ont été capables d'identifier divers facteurs modulant cette infection.

Température

L'importance de la température de l'eau de mer dans l'efficacité de l'infection a été suspectée au moment de l'identification de *V. harveyi* ORM4. En effet, Nicolas et collaborateurs (2002) ont démontré que la vibriose se déclenche lorsque cette température atteint au minimum 17°C. De plus, tous les épisodes de mortalité survenus auprès des populations d'ormeaux européens ont été enregistrés à la fin de l'été lorsque les températures de l'eau de mer sont les plus élevées, suggérant là encore l'importance de la température (Nicolas *et al.*, 2002). Dès lors, d'autres études ont été menées afin de vérifier cette hypothèse. Des animaux matures ont ainsi été mis en contact avec la bactérie à différentes températures d'eau de mer. À des températures inférieures à 17°C, le taux de survie des animaux atteint 100%. Lorsque celles-ci dépassent 17°C, les mortalités d'ormeaux européens atteignent 80% (Figure 16) (Travers *et al.*, 2009a).

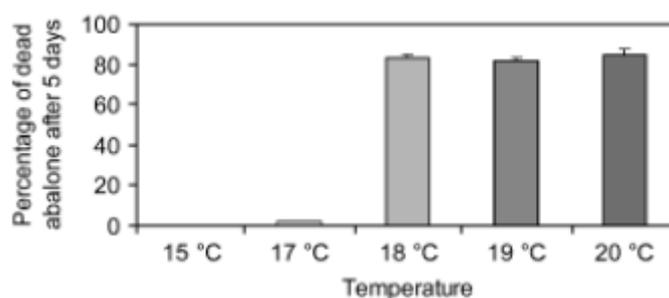


Figure 16 : Influence de la température de l'eau de mer sur les mortalités d'ormeaux européens *H. tuberculata*, en réponse à une infection par balnéation avec *V. harveyi* ORM4 (d'après Travers *et al.*, 2009a).

Les vibrioses causées par le clade *Harveyi* survenues chez d'autres espèces de *Haliotis* montrent elles aussi une dépendance à la température. En effet, les mortalités causées sont toutes caractéristiques de la période estivale (Cheng *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2001; Sawabe *et al.*, 2007a). Des hypothèses ont été émises concernant un lien entre la température, l'état physiologique des animaux et l'activité de leur système immunitaire. La période de développement des vibrioses pourrait aussi être corrélée à la croissance de ces *Vibrio*, dont la

température de croissance optimale est au-dessus de 18°C. Leur multiplication dans l'environnement est donc favorisée lors des saisons chaudes (Sampaio *et al.*, 2022).

En plus de la température, le processus de reproduction de l'ormeau européen influence aussi sa sensibilité à une infection par *V. harveyi* ORM4.

Physiologie de l'ormeau européen

Comme décrit ci-dessus, les vibrioses touchant les ormeaux se produisent le plus souvent au cours de la période estivale, coïncidant avec le processus de maturation des gonades et de reproduction des ormeaux. Le coût énergétique exigé à l'animal par ce processus l'affaiblit et le rend sujet à des infections. La vibriose causée par *V. harveyi* ORM4 chez l'ormeau européen ne fait pas exception à cette règle. En effet, seuls des animaux à maturité sexuelle développent une infection en présence de la bactérie, lorsque la température de l'eau de mer est supérieure à 17°C (Figure 16) (Travers *et al.*, 2009a). Cette susceptibilité vis-à-vis de *V. harveyi* ORM4 est enregistrée seulement lors de la période de maturation des gonades jusqu'à devenir maximale après la ponte des animaux (Travers *et al.*, 2008b). De plus, cela coïncide avec une dépression du système immunitaire chez les ormeaux, expliquant ainsi leur sensibilité et la capacité de *V. harveyi* ORM4 à induire jusqu'à 80% de mortalité (Travers *et al.*, 2009a). Il y a donc un compromis entre le processus de reproduction et la capacité de défense immunitaire dans le cas de la vibriose touchant *H. tuberculata*.

En effet, lorsqu'ils sont dans en période de reproduction, les hémocytes, principaux acteurs de l'immunité cellulaire, présentent une activité diminuée (Travers *et al.*, 2008b). Des études se sont intéressées à la réponse de ces cellules en présence de *V. harveyi* ORM4 et d'une souche non pathogène de l'ormeau européen, *V. harveyi* LMG 7890. En comparant la capacité de phagocytose des hémocytes, les chercheurs ont remarqué que les cellules présentent une activité phagocytaire en présence de la souche *V. harveyi* LMG 7890 non pathogène pour l'ormeau,

alors qu'en présence de *V. harveyi* ORM4 le taux de phagocytose reste similaire à celui mesuré chez des hémocytes n'ayant pas été mis en contact avec l'une des bactéries (Travers *et al.*, 2009b). Cette réponse peut être partiellement expliquée par la voie des MAP kinases p38 qui est fortement activée en présence de *V. harveyi* LMG 7890, alors qu'un retard d'activation est observé en présence de la souche pathogène. La présence de *V. harveyi* ORM4 interfère donc avec la réponse immunitaire de l'ormeau européen en inhibant la voie des MAP kinases p38. Cette diminution de l'activité phagocytaire explique la prolifération observée de *V. harveyi* ORM4 en présence d'hémolymphe, contrairement à la souche LMG 7890 non pathogène pour l'ormeau, qui est rapidement détruite par les hémocytes (Travers *et al.*, 2009b). Une autre étude s'intéressant à la réponse immunitaire, mais cette fois-ci en condition d'infection par balnéation, a permis de confirmer en partie ces résultats. En effet, une diminution de l'activité phagocytaire et de production de ROS chez les hémocytes a été observée en présence de *V. harveyi* ORM4. Dans cette étude il est suggéré que *V. harveyi* ORM4 ait une action lytique envers les hémocytes, puisque leur concentration diminue au cours de l'infection (Cardinaud *et al.*, 2015). Les paramètres immunitaires sont aussi influencés par divers stress chez *H. tuberculata* indépendamment de l'état de maturation. En effet, le détachement des animaux des surfaces ou leur maintien hors de l'eau pendant plusieurs heures induit une diminution de transcription des gènes de réponse aux stress, ainsi qu'une diminution des paramètres immunitaires des hémocytes. De ce fait, une infection par *V. harveyi* ORM4 d'animaux non matures mais stressés provoque des taux de mortalité similaires à ce qui est enregistré chez des animaux matures non stressés (Cardinaud *et al.*, 2014b).

Conclusion générale sur l'interaction entre *H. tuberculata* et *V. harveyi* ORM4

V. harveyi ORM4, bactérie marine se trouvant dans la colonne d'eau, infecte l'ormeau européen *H. tuberculata* en colonisant dans un premier temps les branchies de l'animal malgré la présence de mucus sur ces organes (Figure 17). Seulement quelques heures après, la bactérie passe dans l'hémolymphe dans lequel elle est capable de proliférer (Figure 17). Cette multiplication bactérienne est en partie expliquée par un système immunitaire affaibli du fait de la condition physiologique de l'animal. Ceci provoque une septicémie causant la mort de l'ormeau et ainsi le relargage de la bactérie dans l'environnement (Figure 17). Cette infection est principalement régulée par la température de l'eau de mer, qui permet une prolifération de la bactérie dans l'environnement et induit le processus de reproduction de l'animal influençant l'activité hémocytaire.

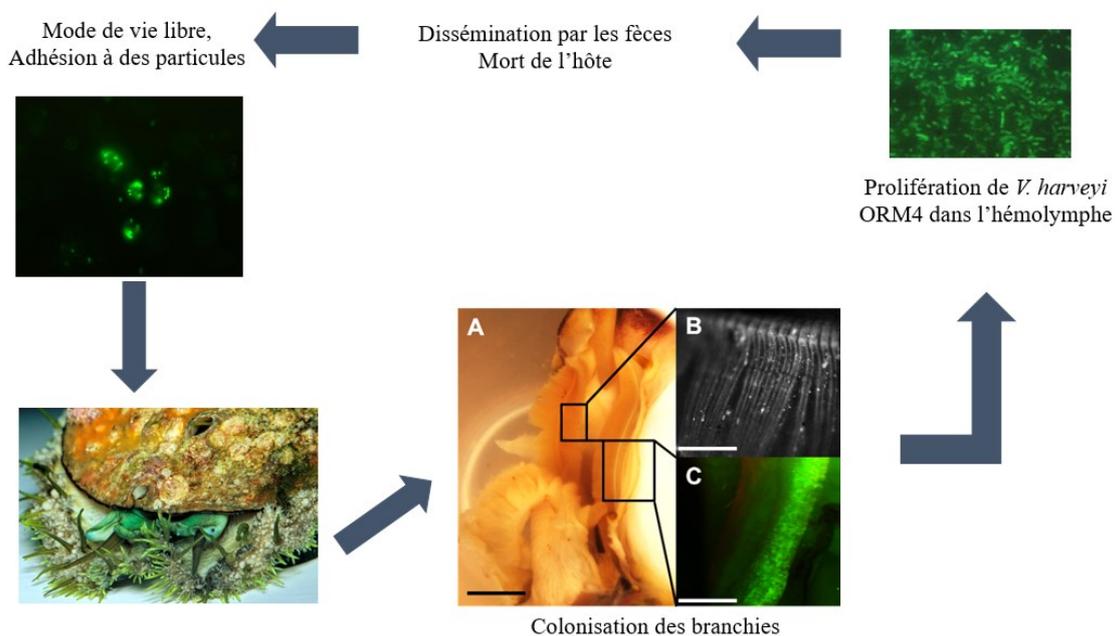


Figure 17 : Schéma général du cycle infectieux de *V. harveyi* ORM4 dans l'ormeau européen *H. tuberculata* (adapté de Travers *et al.*, 2008a ; Cardinaud *et al.*, 2014).

OBJECTIFS DE TRAVAIL

4. OBJECTIFS DE TRAVAIL

À l'égard des connaissances concernant l'interaction entre *V. harveyi* ORM4 et *H. tuberculata*, les travaux développés au cours de cette thèse visaient à apporter une première description des facteurs de virulence nécessaires à la bactérie pour infecter et induire des mortalités chez l'ormeau européen. Pour répondre à cette problématique générale de thèse, les études réalisées sont présentées dans les trois chapitres suivants :

- ❖ **Chapitre 1 : Identification de facteurs participant à la virulence de *V. harveyi* ORM4 lors d'une infection de l'ormeau européen, *H. tuberculata*.**
À travers un travail d'étude du génome de la bactérie et de mutagénèses ciblées, l'implication de diverses protéines participant à la virulence d'autres espèces de *Vibrio* a été étudiée chez ce couple d'infection.
- ❖ **Chapitre 2 : Étude de la colonisation de l'ormeau européen par *V. harveyi* ORM4.** Le second chapitre s'intéresse à l'importance du système de sécrétion type III et du quorum sensing dans la capacité de *V. harveyi* ORM4 à coloniser les branchies et l'hémolymphe, ainsi que leur impact sur les paramètres immunitaires de l'animal aux premiers jours de l'infection.
- ❖ **Chapitre 3 : Étude de la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4.** Cet axe de recherche vise à donner une première description du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 et de sa régulation orchestrée par le quorum par une approche de microscopie et de transcriptomique.

Cette thèse a été effectuée au LEMAR (Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin), UMR 6539 et au LBCM (Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines), EMR 6076, sous la direction d'Alain Dufour, Christine Paillard et François Delavat et l'encadrement scientifique de Sophie Rodrigues.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

5. CULTURE BACTÉRIENNE

5.1. CONDITIONS DE CULTURE

Les différentes souches utilisées au cours de cette étude (Tableau 2) ont été cultivées en milieu liquide ou en milieu gélosé contenant 1,5 % d'agar et conservées à -80°C dans du glycérol 20%. Les souches de *V. harveyi* ont été cultivées dans du LB (Luria-Bertani) (tryptone 10 g/L ; extrait de levure 5 g/L) supplémenté en NaCl (20 g/L final) à 20°C ou 28°C sous agitation. Les souches de *E. coli* ont quant à elles été cultivées dans du LB à 37°C sous agitation. Si nécessaire, les milieux de cultures ont été supplémentés en kanamycine (Km, 100 µg/mL), chloramphénicol (Cm, 5 µg/mL), triméthoprime (Trim, 10 µg/mL), ampicilline (Amp, 100 µg/mL), glucose (Glc, 0,3 g/L), acide diaminopimélique (DAP, 0,3 mM), L-arabinose (L-ara, 0,2%), Rouge congo (40 µg/mL) ou en Bleu de Coomassie (15 µg/mL).

6. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE

6.1. CARACTÉRISATION DES TEMPS DE DOUBLEMENTS

Les temps de doublements des différentes souches de *V. harveyi* ont été déterminés par spectrophotométrie. Pour ce faire, une colonie isolée a été utilisée pour inoculer 5 mL de LBS et cultivée pendant 8 heures sous agitation à 20°C ou 28°C. 100 µL de cette pré-culture ont été utilisées afin d'inoculer 5 mL de LBS et ont été placés sous agitation aux températures respectives pendant une nuit. Le lendemain matin, 50 µL ont été utilisés pour inoculer des Erlenmeyers de 100 mL contenant 20 mL de LBS. Si nécessaire, chaque culture en LBS a été supplémentée en triméthoprime. L'Abs_{600 nm} a été mesurée régulièrement pendant 10 h. Le temps de doublement a été calculé à partir des mesures obtenues en phase exponentielle pour chaque culture.

Tableau 2 : Souches bactériennes utilisées au cours de cette thèse. À noter que chaque souche de *V. harveyi* a été transformée avec les plasmides pFD085 ou pFD086 mais ne sont pas mentionnées dans ce tableau pour plus de lisibilité. Trim^R, Km^R, Em^R, Tc^R : résistance au Triméthoprim, Kanamycine, Erythromycine et Tétracycline. DAP : diaminopimelate. Toutes les souches ont été stockées à -80°C dans du glycérol.

Souche	Caractéristiques	Références
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α λpir	<i>sup E44, ΔlacU169 (ΦlacZΔM15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, λpir phage lysogen</i>	Collection LEMAR
DH5 α λpir + pFD085	Dérivée de <i>E. coli</i> Dh5α λpir dans laquelle le pFD085 a été transformé. Trim ^R	Cette thèse
DH5 α λpir + pFD086	Dérivée de <i>E. coli</i> Dh5α λpir dans laquelle le pFD086 a été transformé. Trim ^R	Cette thèse
GEB883 + pEVS104	Souche GEB883 (Nguyen <i>et al.</i> , 2018) contenant pEVS104 (Stabb and Ruby, 2002)	Cette thèse
β3914	F ⁻ , RP4-2-Tc::Mu, Δ <i>dapA</i> ::(erm-pir) <i>gyrA462 zei-298</i> ::Tn10, Km ^R , Em ^R , Tc ^R , DAP ⁻	Le Roux <i>et al.</i> , 2007
<i>Vibrio harveyi</i>		
ORM4	Souche virulente pour l'ormeau européen	Nicolas <i>et al.</i> , 2002
ORM4 + pFD085	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le pFD085 a été transformé. Trim ^R	Cette thèse
ORM4 + pFD086	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le pFD086 a été transformé. Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>exsA</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>exsA</i> a été délété	Cette thèse
ORM4 Δ <i>exsA</i> + pFD067	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>exsA</i> contenant le pFD067 pour la complémentation du gène <i>exsA</i> . Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>luxO</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>luxO</i> a été délété	Cette thèse
ORM4 Δ <i>luxO</i> + pFD084	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>luxO</i> contenant le pFD084 pour la complémentation du gène <i>luxO</i> . Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>flaK</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>flaK</i> a été délété	Cette thèse
ORM4 Δ <i>flaK</i> + pAM001	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>flaK</i> contenant le pAM001 pour la complémentation du gène <i>flaK</i> . Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>aphB</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>aphB</i> a été délété	Cette thèse
ORM4 Δ <i>aphB</i> + pFD074	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>aphB</i> contenant le pFD074 pour la complémentation du gène <i>aphB</i> . Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>luxR</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>luxR</i> a été délété	Cette thèse
ORM4 Δ <i>luxR</i> + pAM005	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 Δ <i>luxR</i> contenant le pAM005 pour la complémentation du gène <i>luxR</i> . Trim ^R	Cette thèse
ORM4 Δ <i>ompV</i>	Dérivée de <i>V. harveyi</i> ORM4 dans laquelle le gène <i>ompV</i> a été délété	Cette thèse
LMG 7890	Souche non virulente pour l'ormeau européen	Bertone <i>et al.</i> , 1996

6.2. MOTILITÉ

La capacité des souches de *V. harveyi* à se déplacer par nage a été évalué sur gélose de nage en LBS contenant 0.2 % d'agar ou en gélose pauvre (0.2 % agar ; 1 % tryptone ; 2 % NaCl et 35 mM MgSO₄). Si nécessaire, chaque culture a été supplémentée en triméthoprime. Pour ce faire, les souches utilisées (Tableau 2) ont été mises en culture durant une nuit dans du LBS à 20°C ou 28°C. Le lendemain ces pré-cultures ont été diluées à une concentration de 5×10^8 CFU/mL et 2 μ L ont été déposées sur les géloses de nage, incubées aux températures respectives. Les diamètres de nage ont été mesurés régulièrement pendant 24 h.

6.3. FORMATION DE BIOFILM

La formation du biofilm par les souches de *V. harveyi* a été étudiée en condition statique (microplaque) et en condition dynamique (chambres à flux).

6.3.1. CULTURE DE BIOFILM EN MICROPLAQUE

Les biofilms ont été cultivés en présence de LBS ou de sérum d'hémolymphe supplémenté en triméthoprime. Le sérum a été préparé à partir d'hémolymphe d'ormeaux prélevé avec une seringue de 2,5 mL (Terumo) et d'une aiguille (Terumo, 25G, 0,5 x 16 mm). Après centrifugation pendant 5 min à 1150 g à 4 °C, le surnageant a été stérilisé en le filtrant à 0,22 μ m afin d'obtenir le sérum et gardé dans la glace jusqu'à utilisation.

Les souches de *V. harveyi* transformées avec pFD085 (plasmide vide) ou le plasmide utilisé pour la complémentation (Tableau 2) ont été cultivées une nuit dans du LBS + Trim à 20°C ou 28°C. Le lendemain matin, chaque suspension a été diluée dans du LBS + Trim à une Abs_{600nm} à 0,1 et des aliquots de 200 μ L ont été transférés dans les puits d'une microplaque en polystyrène (microplaques Bioscreen Honeycomb, Thermo Scientific) pour la production de biofilm en LBS + Trim. Pour la production de biofilm en présence de sérum d'hémolymphe,

900 μL de la suspension ajustée à une $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ à 0,1, ont été centrifugées (3 min à 6000 g) et les culots ont été resuspendus dans 900 μL de sérum d'hémolymphe supplémenté en triméthoprime avant d'être transférés dans la microplaque en quadruplicat. Les microplaques ont été placées dans le lecteur de microplaque Bioscreen (Labsystems) sans agitation à 20°C ou 28°C et la DO_{590} a été mesurée toute les 10 min. Après 48 h de culture, la microplaque a été vidée par inversion et 220 μL d'une solution de Cristal Violet (0,1 %) ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 10 min à température ambiante. Les puits ont été lavés deux fois dans de l'eau distillée et les microplaques ont été laissées pour séchage pendant 48 h à température ambiante. Le Cristal Violet a été resolubilisé avec 250 μL d'acide acétique (30 %), laissé pendant 10 min et l' $\text{Abs}_{550\text{nm}}$ a été mesurée. L'absorbance mesurée dans chaque puits a été normalisée en divisant l' $\text{Abs}_{550\text{nm}}$ mesurée après coloration au Cristal Violet par l' $\text{Abs}_{600\text{nm}}$ maximale mesurée durant les 48 h de croissance du puits correspondant.

6.3.2. CULTURE DE BIOFILM EN CHAMBRE À FLUX

Mise en place du système

La formation de biofilms en conditions dynamiques a été réalisée dans des chambres à flux (Figure 18) (Tolker-Nielsen and Sternberg, 2014). La chambre à flux est composée de trois canaux (1 x 40 x 44 mm, Biocentrum, DTU, Danemark) sur laquelle une lamelle de verre est collée à l'aide d'une colle silicone neutre (Clear Super Silicone Sealant, 3M, St-Paul, MN, États-Unis). Avant utilisation, le système a été stérilisé à l'eau de Javel (0,5 %) pendant au moins 1 h et rincée avec 800 mL d'eau distillée stérile. Le milieu de culture (LBS) est ensuite raccordé de manière stérile au système avant inoculation des chambres à flux. Après que le système ait été rempli, le flux est stoppé et les tuyaux en amont et en aval des chambres à flux sont clampés.

Adhésion des bactéries et formation de biofilm

Les biofilms des différentes souches de *V. harveyi* ORM4 transformées avec le plasmide pFD086 ou avec le plasmide utilisé pour la complémentation (Tableau 2), ont été formés en chambre à flux à 20 °C pendant 24 h (Tolker-Nielsen and Sternberg, 2014) (Figure 18).

Les souches de *V. harveyi* ORM4 ont été cultivées dans du LBS + Trim à 20°C sous agitation pendant une nuit. Chaque suspension cellulaire a été diluée à une DO_{600nm} de 0,1 dans 1 mL, centrifugée (3 min à 6000 g) et le culot bactérien a été repris dans 1 mL de Sea Salts (30 g/L). 300 μ L de suspension bactérienne ont été injectés dans chaque canal à l'aide d'une seringue 1 mL (Terumo) et d'une aiguille (Terumo, 25G, 0,5 x 16 mm).

Après injection, les chambres à flux sont incubées dans une étuve à 20 °C pendant 2 h en absence de flux afin de réaliser l'étape d'adhésion. Après incubation, le flux de LBS (2,5 mL/h) est appliqué pendant au moins 15 min afin d'éliminer les cellules planctoniques ou faiblement adhérentes. Les cellules adhérentes sont observées en microscopie confocale à balayage laser et le pourcentage de surface recouverte est quantifié avec le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, MD). Après adhésion, le flux à 2,5 mL/h de LBS est rallumé afin de cultiver les biofilms pendant 24 h à 20°C.

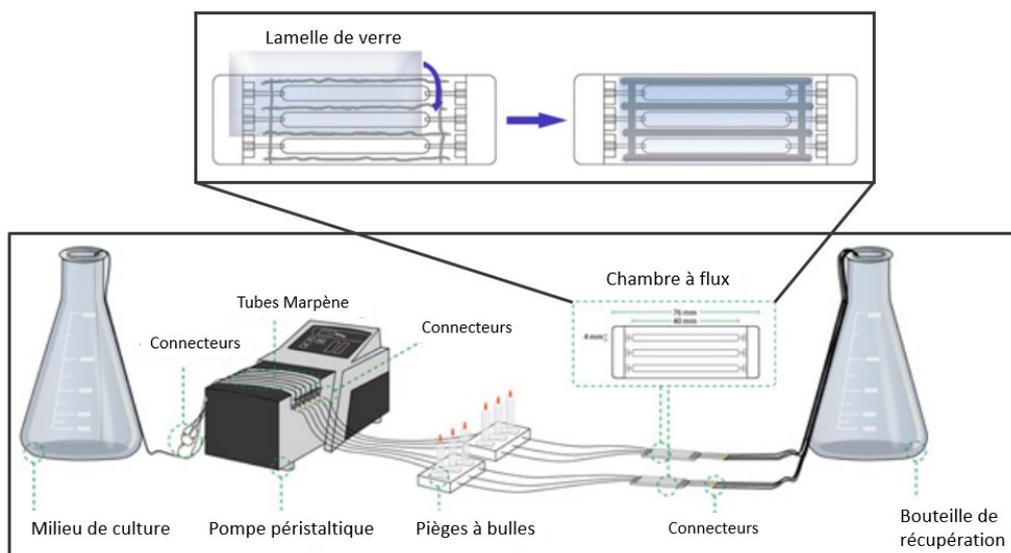


Figure 18 : Système de chambres à flux pour la formation de biofilms en conditions dynamiques (Weiss Nielsen *et al.*, 2011).

Microscopie confocal à balayage laser (MCBL)

Si besoin, différents marquages ont été effectués dans le but d'observer les cellules et les composants de la matrice du biofilm formé (Tableau 3). Pour ce faire, le flux a été stoppé et les clamps en aval des chambres à flux ont été ouverts afin d'injecter 300 μ L de fluorochrome (Tableau 3) par canal. Le marquage a été laissé pendant 15 min à température ambiante en absence de lumière, puis le flux a été rallumé pendant au moins 15 min afin de rincer les chambres à flux. Les cellules de *V. harveyi* ORM4 transformées avec le plasmide pFD086 contenant le gène *gfp* codant la Green Fluorescent Protein (GFP) (λ excitation = 488 nm, λ émission = 500-550 nm) ont été observées directement sans qu'il y ait besoin de marquage. Celles transformées avec le plasmide utilisées pour la complémentation ont été marquées au Syto 9 Green (Tableau 3).

Tableau 3 : Fluorochromes utilisés au cours de cette thèse pour l'observation au MCBL.

Fluorochrome	Élément marqué	λ d'excitation (nm)	λ d'émission (nm)	Concentration finale utilisée
Syto 9 Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis)	ADN cellulaire	485-486	498-501	5 μ M
Calcofluor White (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis)	Exopolysaccharides β 1-3 et β 1-4	400	410-450	100 μ M
FilmTracer SYPRO Ruby (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis)	Protéines extracellulaires	488	604-714	1 X
DDAO galactoside (9H-(1,3 Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One-7-yl) β-D-galactopyranoside (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis)	ADN extracellulaire	633	637-716	1 μ M

Les observations microscopiques ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (MCBL, LSM 710, Zeiss, Allemagne). Pour chaque canal, trois prises de vues sont effectuées. Les images de biofilms ont été analysées avec le logiciel COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) dans le but de définir le biovolume bactérien et les épaisseurs moyennes et maximales.

6.4. PRODUCTION DE POLYSACCHARIDES

La production de polysaccharides par les différentes souches de *V. harveyi* a été observée par coloration au Rouge Congo. Les souches de *V. harveyi* transformées avec pFD085 ou le plasmide utilisé pour la complémentation, ont été cultivées une nuit dans 5 mL de LBS + Trim à 20°C ou 28°C. La suspension a été diluée au centième dans du milieu LBS + Trim et cultivée à la température correspondante jusqu'en phase exponentielle, à une Ab_{S600nm} de 0,2. 10 μ L de cette suspension bactérienne ont été déposés sur une gélose de LBS contenant du Rouge Congo et Bleu de Coomassie (Bassis and Visick, 2010). Les géloses ont été incubées à 20°C et 28°C pendant 24 h avant d'être observées à l'œil nu.

7. CARACTÉRISATION DE L'INTERACTION ENTRE *V. HARVEYI* ET *H. TUBERCULATA*

7.1. ANIMAUX

Les ormeaux européens, *H. tuberculata*, utilisés au cours de cette thèse ont été conditionnés et fournis par France Halotis (Plouguerneau, France). Les animaux matures d'une taille comprise entre 6 et 7 cm, ont été acclimatés dans de l'eau de mer oxygénée à l'aide de bulleurs à une température de 20°C.

7.2. INFECTIONS PAR BALNÉATION

Après deux semaines d'acclimatation, 12 animaux par conditions d'infection (en triplicat) ont été placés dans des bacs de 20 L contenant 10 L d'eau de mer à 20°C avec bulleurs. Les différentes souches de *V. harveyi* ont été cultivées en LBS \pm Trim à 20°C sous agitation pendant une nuit. Le lendemain, ces suspensions bactériennes ont été utilisées afin d'infecter les animaux par balnéation à une concentration finale dans le bac de 5×10^6 UFC/mL pendant 24h.

L'eau des bacs a été changée tous les jours et un suivi de mortalité des animaux a été effectué sur 10 jours.

7.3. PRÉLÈVEMENTS

7.3.1. PRÉLÈVEMENT DE BRANCHIES

À partir d'animaux décoquillés, les branchies ont été prélevées à l'aide de pinces, ciseaux et scalpels stérilisés à l'eau DEPC et autoclavage et placés par la suite dans la glace dans un tube 2 mL de broyage, contenant 5 à 6 billes en céramique, jusqu'à utilisation. Les tubes de broyage contenant les billes ont été pesés avant et après avoir rajouté les branchies, afin d'obtenir la masse des échantillons prélevés. Entre chaque dissection, les outils ont été rincés à l'éthanol et à l'eau distillée stérile.

7.3.2. PRÉLÈVEMENT DE L'HÉMOLYMPHE

L'hémolymphe des ormeaux européens, *H. tuberculata*, a été prélevée dans le sinus artériel céphalique à l'aide d'une seringue de 2,5 mL et d'une aiguille de 25G et transférée dans un tube de 2 mL placé dans la glace jusqu'à utilisation.

7.4. ÉTUDE DE LA COLONISATION DE *H. TUBERCULATA* PAR *V. HARVEYI*

La colonisation des branchies et de l'hémolymphe de l'ormeau européen, au cours des deux premiers jours d'infection par les différentes souches de *V. harveyi* transformées avec le pFD085 ou le plasmide utilisé pour la complémentation, a été caractérisée par dénombrement bactérien sur gélose ainsi que par qPCR TaqMan après extraction de l'ADN bactérien (Schikorski *et al.*, 2013). Pour cela, 30 animaux par condition, ont été infectés par balnéation avec les différentes souches de *V. harveyi* et maintenus à 20°C (paragraphe 7.2, page 73). Aux temps 24 et 48 h post-infection, 10 animaux par condition d'infection ont été récupérés afin de

prélever les branchies et l'hémolymphe (paragraphe 7.3, page 74). En parallèle, 10 animaux ont été maintenus afin d'effectuer un suivi de mortalité sur 10 jours (paragraphe 7.2, page 73).

Après prélèvement des branchies, 500 μL d'eau de mer stérile filtrée (EMSF) ont été ajoutés dans chaque tubes de broyage contenant les branchies et des billes de broyages en céramique. Ces organes ont été broyés au FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) avec deux cycles de broyage de 30 secondes à 4,5 m/sec. 50 mg de broyat ont été dilués dans de l'EMSF (10^0 à 10^{-3}) et étalés sur gélose de LBS + Trim et incubés durant 48 h à 20°C afin d'effectuer un dénombrement et d'obtenir la concentration bactérienne par masse de branchies. Le broyat de branchies restant a été conservé à -20°C jusqu'à extraction d'ADN totaux.

Après prélèvement d'hémolymphe, la moitié du volume a été utilisée pour effectuer des dilutions en série dans de l'eau de mer stérilisée par filtration (10^0 à 10^{-3}). 100 μL de ces dilutions ont été étalés sur géloses de LBS + Trim incubées à 20°C pendant 48 h. Après 48 h, les colonies ont été dénombrées afin d'obtenir la concentration bactérienne par volume d'hémolymphe et le volume d'hémolymphe restant a été maintenu à -20°C jusqu'à extraction d'ADN bactérien.

Les ADN totaux contenus dans 50 mg de broyats de branchies et dans 1 mL d'hémolymphe d'ormeaux européens infectés, ont été extraits avec le kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Quiagen) en suivant les instructions du fournisseur. L'ADN extraits a été quantifié par mesure au Nanodrop. Ces ADN ont par la suite été utilisés comme matrice pour une qPCR TaqMan en ciblant les gènes *toxR* et *parA* dans le but de déterminer les quantités de bactéries de *V. harveyi* dans chaque échantillon.

7.5. ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE *H. TUBERCULATA* APRÈS INFECTION PAR *V. HARVEYI*

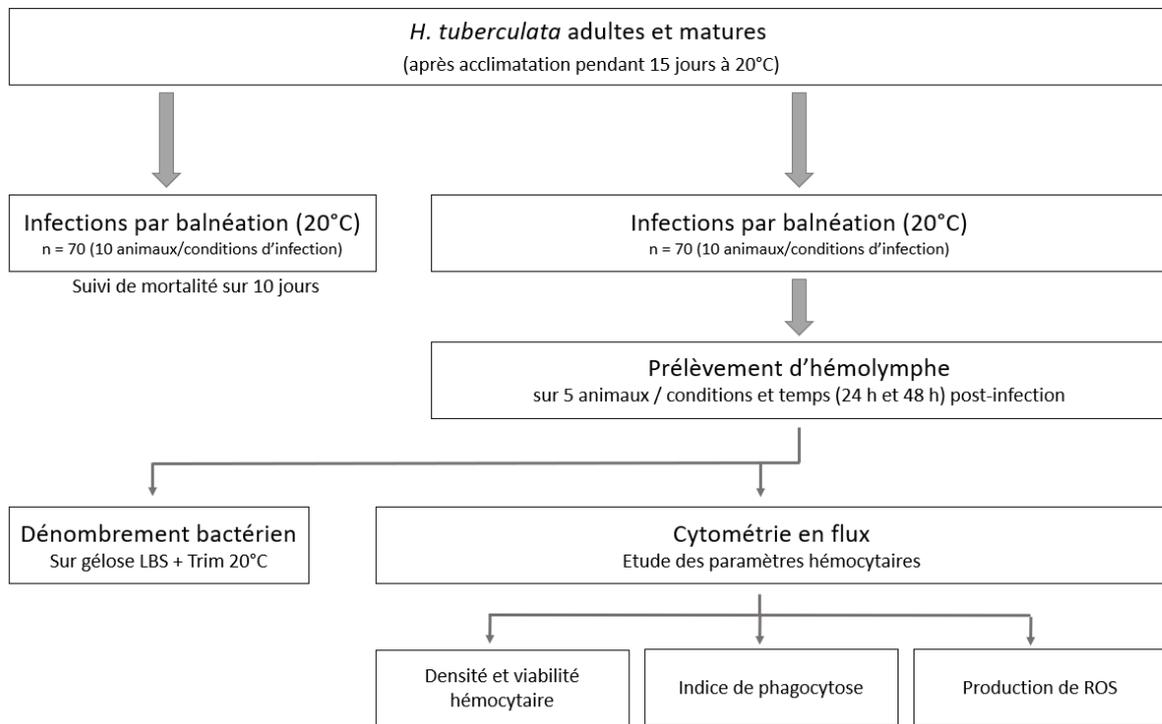


Figure 19 : Schéma du design expérimental utilisé pour déterminer l'influence de différentes souches de *V. harveyi* sur les paramètres hémoctaires.

La réponse immunitaire des hémocytes présents dans l'hémolymphe de *H. tuberculata* après infection par différentes souches de *V. harveyi* a été étudiée par cytométrie en flux. Pour cela, une infection par baignade de 15 animaux par condition a été effectuée comme décrit précédemment (paragraphe 7.2, page 73) avec différentes souches de *V. harveyi* transformées avec le plasmide pFD085 ou le plasmide utilisé pour la complémentation. Après 24 et 48 h d'infection, 5 animaux par condition d'infection et par temps ont été échantillonnés et environ 2 mL d'hémolymphe ont été récupérés (paragraphe 7.3.2, page 74) et maintenus dans la glace. La moitié du volume a été utilisé pour effectuer des dilutions en série dans de l'EDSMF (10^0 à 10^{-5}). 100 μ L de ces dilutions ont été étalés sur milieu sélectif (LBS + Trim) et les géloses ont été incubées à 20°C pendant 48 h. Après 48 h, les colonies ont été dénombrées afin d'obtenir la concentration des souches de *V. harveyi* par volume d'hémolymphe au temps 24 et 48 h post-

infection. Le volume d'hémolymphe restant a été filtré à travers une maille de nylon de 80 μm afin d'éliminer les agrégats et débris avant les analyses de cytométrie en flux.

7.5.1. ANALYSE CELLULAIRE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les analyses de la réponse hémocytaire en présence des différentes souches de *V. harveyi* utilisées pour l'infection ont été faites avec le cytomètre FACSCalibur (Becton Dickinson). Ainsi les paramètres immunitaires que sont la concentration des hémocytes, leur viabilité, l'index de phagocytose ainsi que la production de ROS, ont été mesurées par cytométrie en flux.

Densité et viabilité hémocytaire

200 μL d'hémolymphe ont été filtrés et rajoutés à 200 μL de solution anti-agrégante (1,5 % EDTA, 6,25 g/L NaCl dans 0,1 M de buffer phosphate à pH de 7,4). Chaque échantillon a été incubé pendant 30 min à température ambiante avec 2 μL de SYBR Green I (solution commerciale diluée à 10^{-2} diluée, Molecular Probes) et 2 μL d'iodure de propidium (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La concentration en hémocytes a été estimée en comptant 10 000 particules toutes les 30 secondes et les résultats ont été rapportés en cellules par millilitre d'hémolymphe. La mortalité cellulaire a été calculée à partir du pourcentage de cellules colorées par l'iodure de propidium.

Indice de phagocytose

Un volume de 250 μL d'EMSF a été ajouté à 250 μL d'hémolymphe filtrée de chaque échantillon et le mélange a été déposé dans une plaque 24 puits (Cellstar, Greiner Bio-one). Après adhésion des hémocytes pendant 15 min à 20°C, 100 μL de billes fluorescentes d'une taille de 2 μm (Polysciences, 1 :200 dans de l'EMSF) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 20°C, le surnageant a été éliminé et les cellules hémocytaires ont été

détachées avec 200 μL d'une solution de trypsine (2,5 mg/mL préparée dans la solution anti-agrégeante). Les plaques ont été mises sous agitation pendant 10 min et 200 μL de la solution anti-agrégeante ont été ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes ont par la suite été placés dans la glace jusqu'au passage dans le cytomètre en flux. Le pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté au moins 3 billes a été mesuré par cytométrie en flux grâce au détecteur de cytomètre FL1.

Production de ROS

L'hémolymph a été reprise dans un volume d'EMSF et 300 μL ont été mélangée avec 6 μL d'une solution de 2', 7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA, 0,1 mM). Après une incubation de 10 min à 20°C, la production de ROS par les hémocytes a été mesurée en cytométrie en flux. L'oxydation du DCFH-DA par les espèces réactives de l'oxygène produit de la dichlorofluorescéine (DCF), une molécule fluorescente qui est quantifiée par cytométrie en flux grâce au détecteur de cytomètre FL1 (Lambert *et al.*, 2003). Les résultats sont donnés en niveau de fluorescence intra-hémocytaire exprimé en unités arbitraires (U.A.).

8. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

8.1. EXTRACTION D'ACIDES NUCLÉIQUES

8.1.1. EXTRACTION D'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir d'une culture d'une nuit sous agitation à 28°C de la souche sauvage de *V. harveyi* ORM4, à l'aide du kit « PureLink Genomic DNA » (Invitrogen). Cet ADN génomique a été utilisé comme matrice pour les réactions de PCR afin d'amplifier des séquences nucléotidiques utilisées pour le clonage.

L'ADN plasmidique a été extrait à partir d'une culture d'une nuit à 37°C des souches d'*E. coli* (Tableau 2) à l'aide des kits d'extraction plasmidique NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel)

ou PureLink Plasmid DNA Purification (Invitrogen) en suivant les consignes des fournisseurs.

Les différents plasmides utilisés au cours de cette étude sont listés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Plasmides utilisés au cours de cette étude. Amp^R, Trim^R et Cm^R : confère une résistance à l'ampicilline, triméthoprimé et chloramphénicol. Tous les plasmides ont été conservés à -20°C.

Plasmide	Caractéristiques	Références
pGEM-T	Vecteur de clonage. <i>lacZ</i> . Amp ^R	Promega
pJLS199	Plasmide dérivé de pJLS198. Contient le gène <i>gfp</i> sans promoteur. Trim ^R	Stoudenmire <i>et al.</i> , 2018 ; Delavat <i>et al.</i> , 2018
pFD077	Plasmide dérivé de pJLS199 dans lequel le gène <i>mcherry</i> a été supprimé en utilisant EagI. Trim ^R	Cette étude
pFD085	Plasmide dérivé de pFD077 dans lequel la région RBS du gène <i>gfp</i> a été remplacée par celle retrouvée en amont du gène <i>gfp</i> du plasmide pVSV102 (Dunn <i>et al.</i> , 2006). Trim ^R	Cette étude
pFD086	Plasmide dérivé de pFD085 dans lequel le promoteur P _{lac} de pVSV102 a été inséré en amont du gène <i>gfp</i> en utilisant XhoI+XbaI. Trim ^R	Cette étude
pFD090	Plasmide dérivé de pFD085 contenant le promoteur P _{exsA} de <i>V. harveyi</i> ORM4 situé en amont du gène <i>gfp</i> en utilisant XbaI+Sall. Trim ^R	Cette étude
pLP12	Plasmide suicide utilisé pour la délétion de gènes cibles dans le chromosome des espèces de <i>Vibrio</i> . <i>oriT_{RP4}</i> , <i>oriV_{R6K}</i> , P _{BAD-vmi480} . Cm ^R	Luo <i>et al.</i> , 2015
Plasmides suicidés dérivés de pLP12		
pFD060	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>exsA</i> . Trim ^R	Cette étude
pFD083	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>luxO</i> . Trim ^R	Cette étude
pFD071	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>flaK</i> . Trim ^R	Cette étude
pFD068	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>aphB</i> . Trim ^R	Cette étude
pFD103	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>luxR</i> . Trim ^R	Cette étude
pAM014	Plasmide utilisé pour la délétion du gène <i>ompV</i> . Trim ^R	Cette étude
Plasmides dérivés de pJLS199 utilisés pour la complémentation de gènes		
pFD067	Plasmide contenant le gène <i>exsA</i> (NheI+BamHI supprimant <i>gfp</i>). Trim ^R	Cette étude
pFD084	Plasmide contenant le gène <i>luxO</i> (NheI+BamHI supprimant <i>gfp</i>). Trim ^R	Cette étude
pAM001	Plasmide contenant le gène <i>flaK</i> (NheI+BamHI supprimant <i>gfp</i>). Trim ^R	Cette étude
pFD074	Plasmide contenant le gène <i>aphB</i> (NheI+BamHI supprimant <i>gfp</i>). Trim ^R	Cette étude
pAM005	Plasmide contenant le gène <i>luxR</i> (NheI+BamHI supprimant <i>gfp</i>). Trim ^R	Cette étude

8.1.2. EXTRACTION D'ARN ET SÉQUENÇAGE

Les ARN de différents échantillons de culture de *V. harveyi* ont été extraits dans le but d'obtenir les transcriptomes associés. Au cours de cette thèse deux études transcriptomiques (RNASeq) ont été effectuées.

RNASeq : détermination des gènes impliqués dans la virulence de *V. harveyi* ORM4

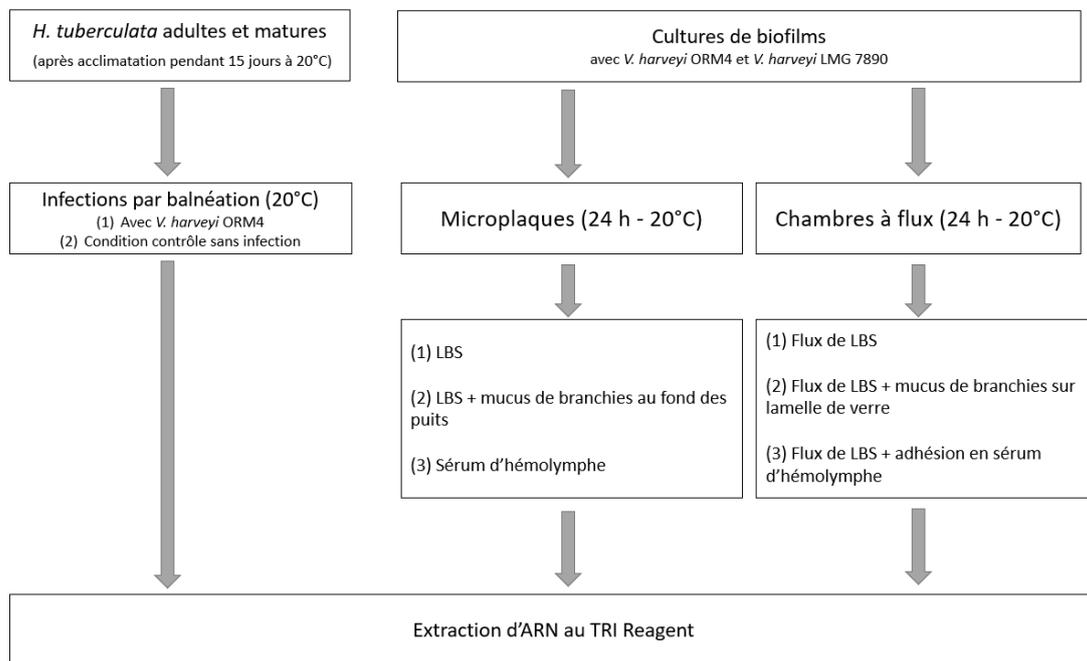


Figure 20 : Schéma du design expérimental utilisé pour déterminer les gènes associés à la virulence de *V. harveyi* ORM4 et ceux associés à la production de biofilm.

Dans le but d'identifier les gènes associés à la virulence de *V. harveyi* ORM4 ainsi que ceux impliqués dans la formation de biofilms cultivés en conditions statiques et dynamiques en présence ou non d'échantillons provenant de l'hôte, une première étude transcriptomique a été effectuée (Figure 20). Dans un premier temps, 100 ormeaux européens matures ont été infectés en triplicat avec *V. harveyi* ORM4 comme expliqué précédemment (paragraphe 7.2, page 73). En parallèle, le même nombre d'animaux non infectés, correspondent à la condition contrôle d'infection. Après 24 et 48 h d'infection, 8 animaux par réplicat et infection ont été récupérés et les branchies et hémolymphe ont été échantillonnées (paragraphe 7.3 page 74) et stockée à -80°C après avoir été plongée dans l'azote liquide jusqu'à extraction d'ARN.

En parallèle, les biofilms de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 ont été cultivés en microplaques 24 puits à fond en verre à 20°C en LBS avec ou sans mucus de branchies et en présence de sérum d'hémolymphe pendant 24 h. Dans un premier temps le mucus de branchies

d'ormeaux européens matures, a été prélevé à l'aide de cotons stérilisés par autoclave, badigeonnés au fond des puits puis laissé sécher pendant 24 h à 20 °C. Le sérum d'hémolymphe a été préparé comme décrit précédemment (paragraphe 6.3.1, page 69). Les cultures de *V. harveyi* ORM4 et LMG 7890 cultivées sur une nuit à 20°C sous agitation, ont été diluées à une Abs_{600nm} de 0,25. Une partie a été centrifugée (6000 g pendant 3 min) et le culot a été repris dans du sérum d'hémolymphe. 2 mL de cultures de *V. harveyi* ORM4 et LMG 7890 diluées dans du LBS ont été transférés dans des microplaques 24 puits à fond de verre, une partie a été utilisée pour inoculer les puits badigeonnés de mucus de branchies d'ormeaux européens. 2 mL de cultures de *V. harveyi* ORM4 et LMG 7890 reprises dans du sérum d'hémolymphe, ont été transférés dans les mêmes microplaques et le tout a été incubé 24 h à 20°C en conditions statiques. Après incubation, les puits ont été vidés par pipetage et rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Les biofilms ont ensuite été décrochés après ajout de 2 mL de LBS, transférés dans un cryotube de 2 mL plongé dans de l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à extraction d'ARN.

Les biofilms de *V. harveyi* ORM4 et LMG 7890 ont aussi été cultivés en chambre à flux (paragraphe 6.3.2, page 70) sous un flux continu de LBS à 2,5 mL/h pendant 24 h à 20°C. Les biofilms ont été cultivés soit en présence de LBS, soit en présence de mucus de branchies sur la lamelle, soit en présence de sérum d'hémolymphe au cours des 2 h d'adhésion. Après 24 h de culture, le flux a été augmenté à un débit de 25 mL/h pendant 5 min. Les biofilms ont été décrochés à l'aide d'1 mL de LBS injecté à l'aide d'une seringue et d'une aiguille 25G et récupérés dans des cryotubes de 2 mL qui ont été plongés dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à extraction d'ARN.

Les ARN totaux de chaque échantillon ont été extraits à l'aide de TRI-Reagent™. Brièvement, les différents échantillons ont été décongelés sur glace et centrifugés 10 min à 16 000 g à 4°C.

Les culots ont été repris dans 1 mL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich), transférés dans un tube de 1,5 mL, vortexés et incubés 5 min à température ambiante. Après centrifugation (10 min, 13 000 g, 4°C) les surnageants ont été repris dans 300 µL de chloroforme, vortexés, incubés 10 min dans la glace et centrifugés (15 min, 13 000 g, 4°C). Cette étape a été effectuée deux fois au total et les acides nucléiques ont été précipités avec 0,7 volume d'isopropanol à -20°C pendant une nuit. Le lendemain, les acides nucléiques précipités ont été centrifugés (30 min, 13 000 g, 4°C), et les culots ont été lavés trois fois à l'éthanol 75 % froid avant d'être repris dans de l'eau MilliQ. Les échantillons ont été traités à la DNase avec la RQ1 (Promega) en suivant les instructions du fournisseur. Les ARN ont par la suite été précipités une nuit à -20°C avec 1/10 volume d'acétate de potassium 5M et 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid. Le lendemain, après trois lavages à l'éthanol 75 % froid, les culots ont été repris dans de l'eau MilliQ. Les ARN ont été quantifiés au Nanodrop et leur intégrité évaluée à l'aide d'un Bioanalyseur (Agilent). Après déplétion des ARN ribosomaux à l'aide du kit Terminator 5'-Phosphate dependent exonucléase (Lucigen), les ARN extraits ont ensuite été envoyés pour séquençage Illumina à Génome Québec. Seuls les échantillons de biofilms de *V. harveyi* ORM4 et LMG 7890 cultivés en chambres à flux en LBS et présence ou absence de mucus ont pu être analysés en transcriptomique.

RNaseq : détermination des gènes impliqués dans la formation de biofilm de V. harveyi ORM4

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la formation de biofilm de *V. harveyi* ORM4 et ceux régulés par le quorum sensing, des cultures planctoniques et en chambres à flux ont été effectuées à 20°C avec la souche sauvage et le mutant *luxO*. Brièvement, les cultures planctoniques de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ ont été réalisées en triplicat comme décrit précédemment (paragraphe 6.1, page 67). Dans un premier temps, les ARN ont été extraits à partir de culots bactériens obtenus après une centrifugation (10 min à 6000g, 4°C)

d'une culture de 15h à 20°C. En parallèle, les biofilms de ces deux souches ont été cultivés en triplicat en chambres à flux pendant 24 h à 20 °C en présence de LBS comme décrit précédemment (paragraphe 6.3.2, page 70). Après culture et observation au MCBL des biofilms, le flux a progressivement été augmenté jusqu'à 25 mL/h et maintenu ainsi pendant 5 min afin de d'éliminer les cellules planctoniques résiduelles. Les cellules des biofilms ont été décrochés par des aspirations-refoulements avec 1 mL de LBS froid et stockées sur glace jusqu'à extraction d'ARN le jour même. Les ARN totaux ont été extraits des différents échantillons à l'aide du kit MasterPure Complete RNA purification (Epicentre, Illumina) en suivant les indications du fournisseur. Les ARN ont ensuite été quantifiés au Nanospectrophotomètre (NanoPhotometer N60, Implen) et leur qualité évaluée par gel d'électrophorèse à 2 % d'agar, puis l'intégrité des ARN (RIN) a été mesurée à l'aide d'un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). Seuls les échantillons possédant des ratios (Abs_{260}/Abs_{280} et Abs_{260}/Abs_{230}) supérieurs à 2 et un $RIN \geq 8$ ont été sélectionnés pour le séquençage. Ces échantillons ont ensuite été stockés à -80°C.

La déplétion des ARN ribosomiaux, la préparation des bibliothèques d'ADNc et le séquençage Illumina ont été réalisés par le laboratoire GATC (Eurofins, GATC Biotech, Konstanz, Allemagne). L'analyse des données brutes a été effectuée à l'aide de la plateforme Galaxy France ([Galaxy | France \(usegalaxy.fr\)](https://usegalaxy.fr)). La qualité des données brutes a été analysée avec l'outil FastQC (version 0.73) (Andrew, 2010) et un nettoyage des séquences a été effectué avec l'outil Trimmomatic (version 0.38.1) (Bolger *et al.*, 2014).

Les séquences ont ensuite été mappées sur le génome de *V. harveyi* ORM4 (GenBank: KC306506.1) à l'aide du logiciel Bowtie2 (Version 2.4.5) (Langmead and Salzberg, 2012). L'abondance de chaque transcrit a été calculée en utilisant le modèle d'union avec l'outil HTseq-count (Version 0.9.1) (Anders *et al.*, 2015). Par la suite, l'analyse statistique des gènes

différentiellement exprimés a été réalisée avec les packages R SARTools et DESeq2 (Varet *et al.*, 2016). Ces packages permettent la normalisation des données et des tests d'expression différentielle pour chaque transcrits entre les conditions. Les gènes sont considérés comme différentiellement exprimés de manière significative si la valeur p -value par la correction des faux positifs FDR (False Discovery Rate) (Benjamini and Hochberg, 1995) est inférieure à 0,05 et si le fold-change (FC) de l'expression du gène dans la condition témoin par rapport à la condition testée est négative (inférieure à 1) ou positive (supérieure à 1).

Les résultats de RNA-seq ont été validés par RT-qPCR. Les ARN totaux ont été convertis en ADNc à l'aide du kit High capacity cDNA reverse Transcriptase (Applied Biosystems). 8 gènes ont été choisis et les amorces correspondantes ont été produites à l'aide du logiciel Primer Express (Applied Biosystems) (Annexe 1). La qPCR a été effectuée à l'aide de l'appareil 7300 RT PCR Systems (Applied Biosystems) et du Master Mix PCR SYBR Green (Applied Biosystems). Le niveau d'expression de gène a été calculé à l'aide de la méthode $Ct(2^{-\Delta\Delta CT})$ et en utilisant l'ARNr 16S comme contrôle endogène (Livak and Schmittgen, 2001).

8.2. RÉACTIONS DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR)

La vérification des transformations de souches ainsi que l'amplification de séquences nucléotidiques pour les clonages ont été effectués par PCR à l'aide des différentes amorces listées en Annexe 1.

Les PCR de routine ont été effectués à l'aide des enzymes GoTaq (Promega) ou OneTaq (New England Biolabs) en suivant les préconisations du fournisseur. Pour l'amplification de séquences nucléotidiques dans une finalité de clonage, les PCR ont été réalisées à l'aide d'enzymes à faible taux d'erreur telles que la polymérase Phusion (ThermoScientific) ou Q5 (New England Biolabs) qui ont été privilégiées. Les produits PCR ont été visualisés par

électrophorèse en gel d'agarose (1% ou 2%) préparé dans un tampon TAE 1X (Tris HCl 40 mM, acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 7,9) (Biosolve) supplémenté en Midori Green (Nippon Genetics). La révélation des gels a été réalisée sous UV à l'aide d'un transilluminateur (E-Box Vilber, Grosseron).

8.3. TRANSFORMATIONS BACTÉRIENNE

8.3.1. TRANSFORMATION PAR ÉLECTROPORATION

Les cellules des différentes souches d'*E. coli* ont été préparées par la méthode de Dower *et al.* (1988). Pour cela, les cellules ont été cultivées en LB à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une DO_{600nm} entre 0,4 et 0,8 puis lavées et concentrées dans du glycérol 10 % froid par centrifugations successives (10 min, 4000g, 4°C) avant stockage à -80°C. Les cellules électrocompétentes des souches de *V. harveyi* sont quant à elles préparées en suivant la méthode de Delavat *et al.* (2018) qui consiste à concentrer les cellules et supprimer le sel présent dans les cultures à l'aide d'un tampon saccharose à partir d'une culture sur la nuit à 37°C (Delavat *et al.*, 2018). Les cellules électrocompétentes et les plasmides ou produits de clonage sont transférés dans une cuve d'électroporation de 1 mm maintenue dans la glace et directement électroporés avec un Gene Pulser II + Pulse controller Plus (Biorad) réglé à 1,5 kV, une résistance de 200 Ω et une capacité de 25 μF . La constante de temps après le pulse doit être comprise en 4 et 5 ms. Après électroporation, 1 mL de SOC a été ajouté et les cellules ont été respectivement placées sous agitation à 37°C pendant 1 ou 4 h. Les cellules ont par la suite été étalées sur milieu sélectif et incubées pendant une nuit à 37°C pour *E. coli* et 28°C pour *V. harveyi*.

8.3.2. TRANSFORMATION PAR CHOC THERMIQUE

Les cellules des différentes souches d'*E. coli* ont été rendues chimiocompétentes en suivant la méthode au chlorure de calcium élaborées par Oishi et Cosloy (1972) qui consiste en des centrifugations successives à froid dans une solution de CaCl₂ à 50 mM stérile et froide. Les cellules ont été par la suite conservées dans du glycérol (15% finaux) à -80°C jusqu'à utilisation. 50 µL de ces cellules chimiocompétentes ont été mélangées à 50 – 100 ng de plasmide ou 5 µL de mixture de ligation dans la glace et la transformation s'est opérée grâce à un choc thermique à 42°C pendant 90 sec. Les cellules ont été directement replacées dans la glace pendant 1 min. 1 mL de solution autoclavée SOC (2 % tryptone ; 0,5 % yeast extract ; 10 mM NaCl ; 25mM KCl ; 10mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20mM D-Glucose ; pH 7) a été ajouté et les cellules sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. Les cellules ont été par la suite étalées sur milieu sélectif et incubées pendant une nuit à 37°C.

8.3.3. TRANSFORMATION PAR CONJUGAISON TRI-PARENTAL

Dans certains cas, les souches de *V. harveyi* ont été modifiées par conjugaison tri-parentale. Pour ce faire, après une culture d'une nuit dans les conditions optimales de croissance des différentes souches utilisées, 200 µL de souche donneuse *E. coli* (DH5αpir ou GEB883) ont été centrifugés. 200 µL de la souche « helper » (*E. coli* GEB883 + pEVS104) ont été ajoutés au culot et centrifugés. 800 µL de culture de la souche receveuse *V. harveyi* ont été ajoutés au culot avant une dernière centrifugation. Le culot a été resuspendu avec 20 µL d'une solution stérile de LBS + DAP, puis déposé sur un filtre d'acétate 0,2 µm placé sur une gélose de LBS supplémentée en DAP et incubé 24 h à 28°C. Le filtre a été récupéré, placé dans un tube de 1,5 mL et le produit de conjugaison a été décroché à l'aide d'1 mL d'EMSF. Les cellules ont été concentrées par centrifugation et étalées sur milieu sélectif et incubées 24 h à 28°C.

8.4. MUTAGÈNE PAR DOUBLE RECOMBINAISON HOMOLOGUE CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

Les délétions de gènes au sein du génome de *V. harveyi* ORM4 ont été réalisées par double recombinaison homologue entre un plasmide suicide et le chromosome.

La construction des plasmides suicides a été effectuée par l'amplification des régions (environ 800 pb) en amont (dénommée « UP ») et aval (dénommée « DN ») du gène à déléter à l'aide d'une polymérase haute-fidélité et fusionnées par SOEing PCR (Splicing by Overlap Extension PCR). Le produit PCR obtenu a été inséré dans le vecteur pGEM-T par clonage A-T, le nouveau plasmide a par la suite été envoyé pour séquençage, afin de vérifier l'absence de mutation dans l'insert. Le fragment a par la suite été sous-cloné dans le vecteur suicide pLP12 par digestion enzymatique et ligation (Figure 21). Ce plasmide suicide nouvellement construit a été transformé dans *E. coli* DH5 α λ pir par choc thermique et après vérification par PCR et extraction a été transformé dans *E. coli* β 3914 ou *E. coli* GEB883.

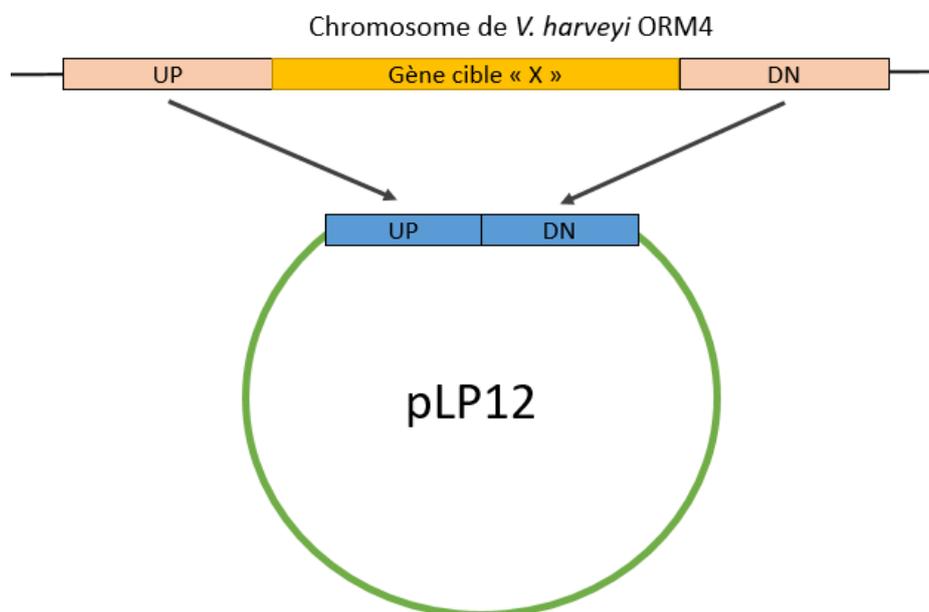


Figure 21 : Schéma de la construction du plasmide suicide dérivé du pLP12, utilisé pour la mutagénèse dirigée. Les régions situées en amont (UP) et en aval (DN) du gène d'intérêt sont clonées dans le plasmide suicide pLP12.

Une autre technique de clonage, basée sur la technologie Gibson, a été utilisée au cours de ces travaux de thèse et suit la méthode du kit NEBuilder HiFi DNA Assembly, permettant le clonage des fragments directement dans le plasmide suicide. Pour ce faire, les amplifications par PCR haute-fidélité des fragments UP, DN et du plasmide suicide ont été effectuées afin que les fragments PCR présentent des régions chevauchantes (Figure 22). Les produits PCR purifiés ont été par la suite mélangés et la réaction du kit permet leur assemblage par l'action d'une exonucléase, d'une polymérase et d'une ligase. Le produit de clonage obtenu correspond au plasmide suicide contenant les régions UP et DN, transformé chez *E. coli* DH5α λ pir puis après vérification par PCR, transformé dans *E. coli* β 3914 ou *E. coli* GEB883 (Figure 21 et Figure 22).

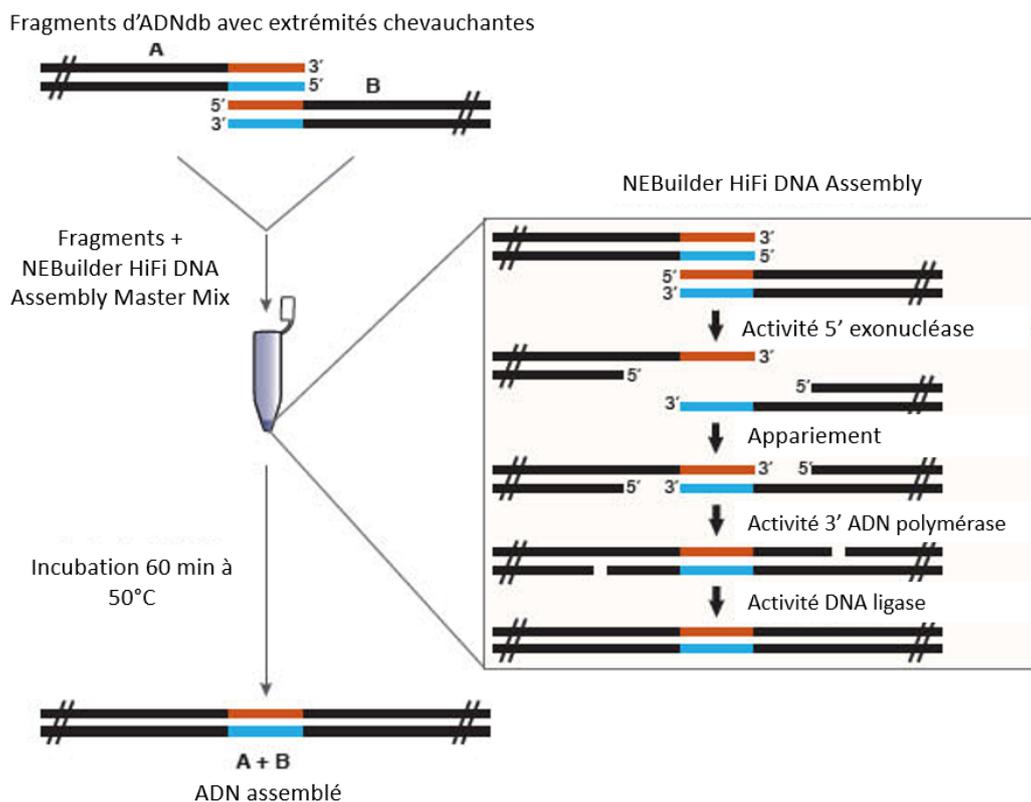


Figure 22 : Principe du clonage à l'aide du kit NEBuilder HiFi DNA Assembly.

Une conjugaison tri-parentale a ensuite été effectuée (paragraphe 8.3.3 page 86) afin d'insérer dans *V. harveyi* ORM4 le plasmide suicide modifié dérivé de pLP12. pLP12 (Cm^R) possède un

gène codant la toxine Vmi480 placé sous le contrôle du promoteur P_{BAD} , inducible par du L-arabinose et réprimé par le glucose (Figure 23). Dans *V. harveyi* ORM4 le plasmide suicide n'est pas répliatif et seul un évènement de recombinaison homologue entre les régions UP ou DN du plasmide et du chromosome de la bactérie est possible (Figure 23). De ce fait, les transconjugants *V. harveyi* ORM4 sont discriminés sur un milieu gélosé contenant du chloramphénicol et du glucose et une PCR permet de vérifier l'insertion du plasmide suicide dans le chromosome des bactéries.

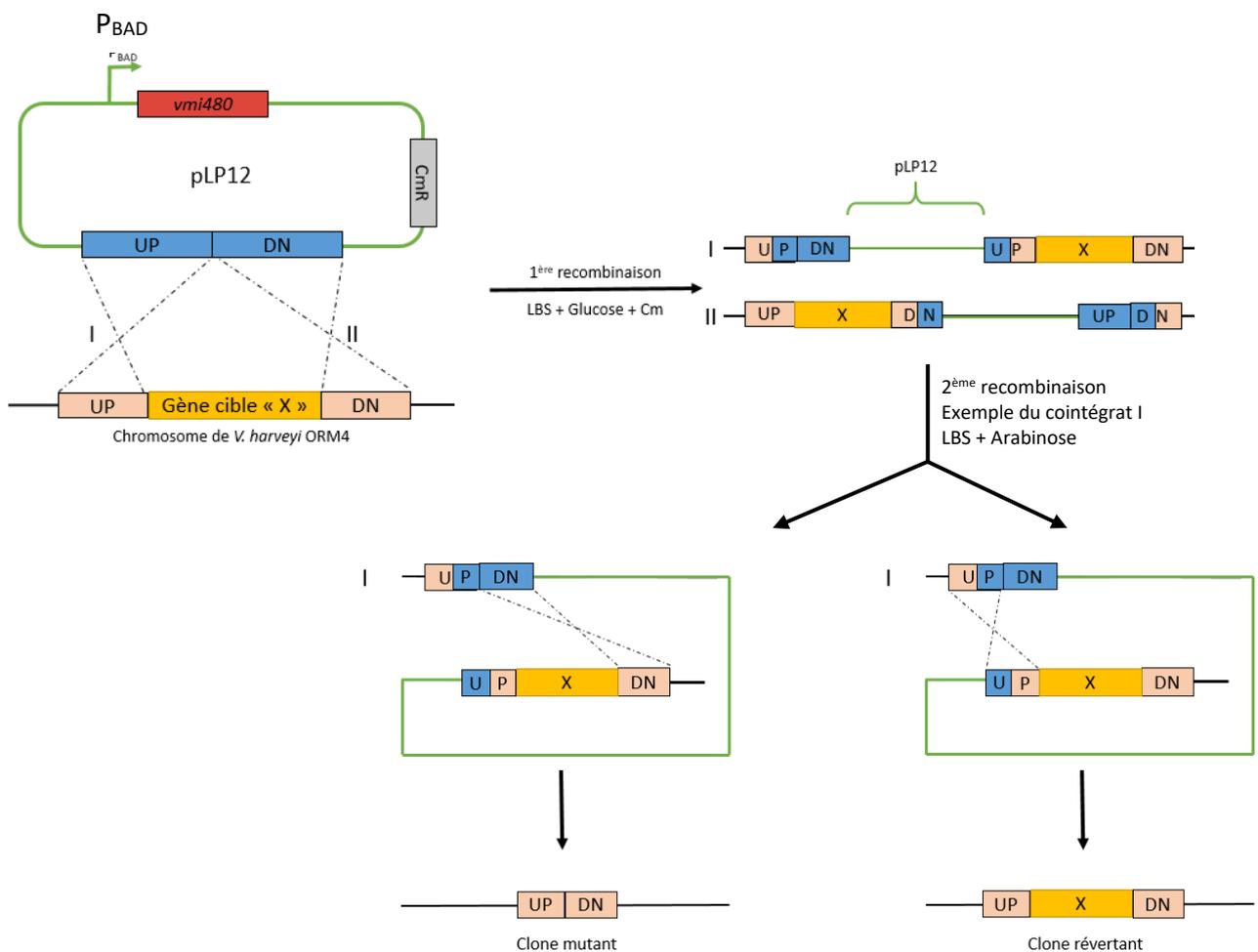


Figure 23 : Principe de la mutagenèse par double recombinaison homologue entre le plasmide suicide dérivé du pLP12 et le chromosome de *V. harveyi* ORM4. Au moment de l'insertion du plasmide suicide pLP12 dans le chromosome de *V. harveyi* ORM4 deux recombinaisons sont possible qui sont en UP (I) et en DN (II). *vmi480* : gène codant la toxine Vmi480 ; Cm : chloramphénicol.

La délétion du gène d'intérêt dans le chromosome de *V. harveyi* ORM4 est provoquée par une seconde recombinaison aboutissant à l'excision du pLP12 (Figure 23). Pour ce faire, les transconjugants ont été cultivés en milieu liquide et des dilutions en séries ont été effectuées puis étalées sur milieu LBS gélosé supplémenté en L-arabinose (0,2 %). La présence de L-arabinose induit le promoteur P_{BAD} retrouvé dans le pLP12 et la transcription du gène *vmi480* codant la toxine Vmi480, toxique pour la bactérie, favorisant une recombinaison intra-génomique et l'excision du plasmide suicide du chromosome. Celle-ci entraîne soit l'apparition d'un clone « mutant » dont le gène cible a été supprimé du génome ou un clone « révertant » avec le génotype sauvage (Figure 23). L'excision du plasmide suicide entraîne aussi la perte de la capacité de résistance au chloramphénicol de la part des clones, puisque le gène est retrouvé sur le plasmide suicide. Après vérification par PCR de la délétion de gène dans le génome de *V. harveyi* ORM4 et de la sensibilité des clones au chloramphénicol, les clones mutés ont été stockés au -80°C dans du glycérol (Tableau 2).

8.5. COMPLÉMENTATION

Afin de vérifier que le phénotype observé chez les souches mutées est bien la conséquence de la délétion du gène d'intérêt, ce dernier a été cloné dans un plasmide dans le but de rétablir le phénotype sauvage chez la souche mutante. Les gènes d'intérêt et leur promoteurs respectifs ont été amplifiés avec une polymérase haute-fidélité et insérés par clonage A-T dans le pGEM-T dans le but d'être séquencé pour vérifier l'absence de mutations. Après digestion enzymatique, les fragments ont été sous clonés dans un plasmide multicopie dérivé du pJLS199 possédant un gène de résistance au triméthoprim (Delavat *et al.*, 2018). Le plasmide nouvellement formé a été transféré dans la souche de *V. harveyi* ORM4 délétée du gène d'intérêt par électroporation ou conjugaison tri-parentale et les transformants ont été sélectionnés sur gélose de LBS + Trim. Après vérification de la transformation par PCR, les souches complémentées ont été stockées à -80°C dans du glycérol (Tableau 2).

8.6. BIORAPORTEURS

Les biorapporteurs sont des constructions génétiques permettant d'étudier l'activité du promoteur d'un gène d'intérêt dans différentes conditions.

8.6.1. CONSTRUCTION DE BIORAPORTEURS

Afin d'étudier la régulation du gène d'intérêt, son promoteur a été cloné en amont du gène *gfp*, permettant la production de la protéine GFP, dans un plasmide multicopie dérivé du pJLS199 (Delavat *et al.*, 2018). Pour ce faire, la région promotrice du gène d'intérêt a été amplifiée par PCR à l'aide d'une polymérase haute-fidélité et le fragment a été transformé par clonage A-T dans le pGEM-T afin d'être séquencé. Après séquençage et vérification de l'absence de mutation dans le fragment, ce dernier a été sous-cloné dans le pFD085 (Trim^R) un dérivé du pJLS199, en amont du gène *gfp* par digestion enzymatique et ligation (Delavat *et al.*, 2018 ; Morot *et al.*, 2021). Le nouveau plasmide construit a été transformé dans *V. harveyi* par électroporation ou conjugaison tri-parentale (paragraphe 8.3, page 85). Après sélection sur gélose LBS + Trim et vérification par PCR, la souche a été stockée à -80 °C dans du glycérol.

8.6.2. MICROSCOPIE A ÉPIFLUORESCENCE

Les souches de *V. harveyi* contenant les biorapporteurs ont été cultivées pendant 8 h dans 5 mL de LBS + Trim à 28°C et 100 µL de cette culture ont été utilisés pour inoculer 5 mL de LBS + Trim en triplicat, mise sous agitation à 28°C sur une nuit. Le lendemain, 5 µL de cette seconde culture ont été utilisés pour inoculer à nouveau 5 mL de LBS + Trim en triplicat, incubés à 28°C. Au temps 3, 6, 9, et 24 h de culture, correspondant aux différents stades de croissances, respectivement début, milieu et fin de phase exponentielle et phase stationnaire, au moins 5 images par réplicat ont été acquises en utilisant le microscope à épifluorescence Zeiss Axio Imager.M2 équipé d'un objectif à immersion 100X Apochromat, à 200 ms de temps d'exposition (avec 25 % d'intensité LED). La fluorescence des cellules uniques a été quantifiée à l'aide du logiciel Matlab (Delavat *et al.*, 2016).

CHAPITRE I :

IDENTIFICATION DE FACTEURS
IMPLIQUÉS DANS LA VIRULENCE
DE *V. HARVEYI* ORM4 LORS D'UNE
INFECTION DE L'ORMEAU EUROPÉEN
H. TUBERCULATA.

9. INTRODUCTION DE L'ÉTUDE

Les recherches sur les causes de mortalité des populations d'ormeaux européens ont permis l'identification de l'agent pathogène *V. harveyi* ORM4 (Nicolas *et al.*, 2002). La capacité de la bactérie à induire des mortalités est modulée par divers facteurs que sont la température de l'eau de mer, l'état physiologique et le statut immunitaire de l'animal. En contrôlant ces conditions, il est possible de reproduire en laboratoire les mortalités causées par *V. harveyi* ORM4 (Travers *et al.*, 2009a, 2008b). Bien que le cycle infectieux de la bactérie ait été étudié, aucune recherche ne s'était portée sur l'identification des systèmes impliqués dans sa pathogénicité. Une stratégie possible pour caractériser ceux impliqués dans la virulence d'une bactérie est la délétion de gènes et l'étude des phénotypes impactés. C'est avec cette approche que nous avons essayé d'apporter une première description des systèmes mis en jeu dans la virulence de *V. harveyi* ORM4 envers l'ormeau européen. En parallèle, la souche *V. harveyi* LMG 7890, isolée d'un requin gris *Carcharhinus plumbeus* présentant des ulcères, a été utilisée au cours de l'étude. Cette dernière n'induit aucune mortalité après infection par balnéation de l'ormeau européen et sert ainsi de contrôle (Travers *et al.*, 2009b). Cependant, *V. harveyi* LMG 7890 est capable d'induire des mortalités après injection directe dans l'animal, mais les taux enregistrés restent plus faible que ceux provoqués par *V. harveyi* ORM4 (Travers *et al.*, 2009b). Les résultats obtenus au cours de cette étude ont abouti à la publication d'un article dans *Environmental Microbiology*. Des résultats complémentaires présentant la caractérisation d'autres souches mutantes, ainsi que l'identification de divers gènes de *V. harveyi* ORM4 pouvant être liés à sa virulence seront présentés à la suite.

10. IDENTIFICATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA MODULATION DE LA VIRULENCE DE *V. HARVEYI* ORM4, PATHOGENÈ DE L'ORMEAU EUROPÉEN *H. TUBERCULATA*, PAR UNE APPROCHE DE MUTAGÉNÈSE CIBLÉE

10.1. RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

À travers cet article, nous avons voulu apporter une première identification de mécanismes moléculaires liés aux grandes étapes d'infection d'*H. tuberculata* par *V. harveyi* ORM4 avec une approche de mutagénèse ciblée. L'utilisation de cette technique est rendue possible par le développement d'outils génétiques chez *V. harveyi* ORM4 (Delavat *et al.*, 2018), ainsi que par le séquençage complet des génomes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 (Paillard, données non publiées, privées sur MicroScope (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope>)). Vu l'implication du quorum sensing dans la régulation de nombreux phénotypes tels que la formation de biofilm, la motilité ou la virulence, nous avons décidé de déléter le gène *luxO* dans le génome de *V. harveyi* ORM4. Le mutant $\Delta luxO$ a permis de démontrer l'importance du quorum sensing dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Additionné à ces résultats, nous avons pu attester que ce gène est impliqué dans la régulation de la motilité, la formation de biofilm et la production d'exopolysaccharides chez *V. harveyi* ORM4. De plus, la présence de sérum d'hémolymphe d'ormeau européen provoque une induction de formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. Cette induction est dépendante du quorum sensing, suggérant que la bactérie perçoit des signaux externes retrouvés dans l'hôte. En parallèle, un cluster de gènes impliqués dans la production d'un système de sécrétion de type III a été identifié dans le génome de *V. harveyi* ORM4. Ce cluster est nécessaire à la virulence de la bactérie, puisque la délétion du gène *exsA*, codant le régulateur principal de ce système, provoque une perte de virulence. Enfin, parmi les nombreux gènes que peut réguler le quorum sensing, nous avons démontré que la présence de LuxO affecte négativement l'expression du gène *exsA*.

Virulence of *Vibrio harveyi* ORM4 towards the European abalone *Haliotis tuberculata* involves both quorum sensing and a type III secretion system

Amandine Morot,^{1,2} Sahar El Fekih,¹ Adeline Bidault,¹ Alizée Le Ferrand,¹ Albane Jouault,² Javid Kavousi,¹ Alexis Bazire,² Vianney Pichereau,¹ Alain Dufour,² Christine Paillard^{1*} and François Delavat^{1,3*}

¹Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, Plouzané, France.

²Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, Lorient, France.

³UMR CNRS 6286 UFIP, University of Nantes, Nantes, France.

Summary

Environmental *Vibrio* strains represent a major threat in aquaculture, but the understanding of their virulence mechanisms heavily relies on the transposition of knowledge from human-pathogen vibrios. Here, the genetic bases of the virulence of *Vibrio harveyi* ORM4 towards the European abalone *Haliotis tuberculata* were characterized. We demonstrated that *luxO*, encoding a major regulator of the quorum sensing system, is crucial for the virulence of this strain, and that its deletion leads to a decrease in swimming motility, biofilm formation, and exopolysaccharide production. Furthermore, the biofilm formation by *V. harveyi* ORM4 was increased by abalone serum, which required LuxO. The absence of LuxO in *V. harveyi* ORM4 yielded opposite phenotypes compared with other *Vibrio* species including *V. campbellii* (still frequently named *V. harveyi*). In addition, we report a full type III secretion system (T3SS) gene cluster in the *V. harveyi* ORM4 genome. LuxO was shown to negatively regulate the promoter activity of *exsA*, encoding the major regulator of the T3SS genes, and the deletion of *exsA* abolished the virulence of *V. harveyi* ORM4. These results unveil virulence mechanisms set up by this environmentally important bacterial pathogen and pave the way for a

better molecular understanding of the regulation of its pathogenicity.

Introduction

Vibrio-associated diseases cause major economic and ecological plagues worldwide and are linked to extensive sanitary concerns. Global warming and the associated increase in seawater temperature are thought to amplify these phenomena. Studying *Vibrio* pathogens is therefore of prime importance in a future attempt to mitigate infections. Particularly, the molecular mechanisms involved during infection need to be better understood, and the key factors have to be deciphered. However, those factors have been most extensively studied in *Vibrio* models that are human pathogens such as *Vibrio cholerae*, while non-model (i.e. non-human) pathogens remain far less studied (Le Roux, 2017). Nevertheless, non-model *Vibrio* represent a major source of pathogenic bacteria in marine environments, causing high mortality both in natural environments and in aquaculture (Paillard *et al.*, 2004; Travers *et al.*, 2015; Ina-Salwany *et al.*, 2019) and the overall economic impact of marine pathogens is estimated in billions dollars yearly (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Among the pathogens of marine organisms, one can cite *Vibrio alginolyticus*, which can infect humans but also fishes, clams or shrimps (for review, see Ruwandeepika *et al.*, 2012), or *Vibrio parahaemolyticus*, which can also infect shrimps (Vandenberghe *et al.*, 1999). Finally, *Vibrio harveyi* is notoriously known to infect many economically important marine organisms, including fishes and shrimps (Lee *et al.*, 2002; Austin and Zhang, 2006).

In many bacteria, quorum sensing (QS) systems control collective bacterial behaviours including virulence (Miller and Bassler, 2001). Gene regulation by QS systems is dependent on the concentration of signal molecules called autoinducers, the concentration of which depends on bacterial density. This phenomenon was first described by Nealson *et al.* (1970) who analysed the regulation of bioluminescence production in *Vibrio fischeri*. In the *Harveyi* clade, the QS system of *V. harveyi* BAA-

Received 25 February, 2021; revised 15 April, 2021; accepted 8 May, 2021. *For correspondence. E-mail francois.delavat@univ-nantes.fr; Tel: 0033-251125643. E-mail christine.paillard@univ-brest.fr; Tel: 0033-298498650.

© 2021 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

2 A. Morot et al.

1116, reclassified as *Vibrio campbellii* BAA-1116 (Lin et al. 2010), has been largely described, and three types of autoinducers were identified. The binding of autoinducers to their respective histidine kinase receptor feeds a single regulatory signal transduction pathway involving the LuxO protein. At low cell density, the autoinducer concentrations are below the detection threshold of receptors, which induces their autophosphorylation. This autophosphorylation allows the phosphorylation of LuxU and then of LuxO. Phosphorylated LuxO, together with the alternative sigma factor σ^{54} , activates the transcription of genes encoding small non-coding regulatory RNAs (ncRNAs) (Milton, 2006). These ncRNAs, together with the RNA-binding protein Hfq, inhibit the translation of the major QS regulator gene *luxR* (Miyamoto et al., 2003; Ball et al., 2017). At high cell density, the autoinducer concentrations reach the detection threshold of receptors, leading to an inhibition of the kinase activities in the phosphorelay. As a consequence, the non-phosphorylated LuxO is unable to induce the expression of the ncRNAs, leading to an increased translation of *luxR* (Lorenz et al., 2017). The LuxR protein regulates directly or indirectly the expression of up to 625 genes in *V. campbellii* (van Kessel et al., 2013; Ball and van Kessel, 2019), notably triggering an increased virulence (Noor et al., 2019) and motility (Yang and Defoirdt, 2015), and a decreased biofilm formation (Anetzberger et al., 2009).

Importantly, while this above-described regulatory network is highly conserved among *Vibrio* (Ng and Bassler, 2009), the downstream genes regulated by the LuxR/HapR family of proteins and the phenotypical outcomes of this gene regulation can greatly differ from species to species (Ng and Bassler, 2009; Boyaci et al., 2016; Ball et al., 2017). Given the recent reclassification of *V. harveyi* BAA-1116 as *V. campbellii*, any conclusion using *V. campbellii* as a reference can lead to over- or mis-interpretation of the QS machinery system and regulation when studying true *V. harveyi* strains. This bias highlights the necessity to establish a new model for a true *V. harveyi* species to decipher the virulence mechanisms of this species. The strain ORM4 used in the present work is a true *V. harveyi*, as shown by pairwise genome comparisons (Supporting Information Table S1).

V. harveyi ORM4 is a potent pathogen of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a marine gastropod of high economic value. It was isolated during a severe disease outbreak, which resulted in the mortality of 50%–90% of the natural European abalone stock in Brittany and Normandy (France) in the late 90s (Nicolas et al., 2002). This strain also provokes massive abalone mortality in laboratory experiments, with between 70% and 90% of death occurring within 3 days post-infection (Travers

et al., 2008; Cardinaud et al., 2014a). It has been demonstrated that *V. harveyi* ORM4 is causing an immune-suppression in *H. tuberculata*, by reducing hemocyte activities (Cardinaud et al., 2015). Moreover, a host-centered RNA sequencing approach allowed the *de novo* assembly and annotation of the transcriptomic profiles of *H. tuberculata* under different conditions, including upon infection by *V. harveyi* ORM4 (Harney et al., 2016). Interestingly, earlier work showed that *V. harveyi* ORM4 is incapable of causing abalone death when the water temperature is below 17°C or when the abalone is immature, not ready to spawn and not stressed, while an increase of the seawater temperature by only 1° (18°C) is sufficient to trigger up to 80% of abalone mortality (Travers et al., 2009a; Cardinaud et al., 2014b). Global climate change and its associated increase in seawater temperature can therefore lead to rapid declines in bioresources, as already observed in Europe for *H. tuberculata* (Huchette and Clavier, 2004) and in the United States, where *Haliotis sorenseni* and *Haliotis cracherodii* are officially classified as endangered species (Hobday et al., 2001; Gruenthal and Burton, 2008). Thus, the *V. harveyi*–*H. tuberculata* system can be an ideal model to study the effect of global change on the pathogenicity of marine vibrios.

In summary, while knowledge about the response of the abalone upon infection is accumulating, our understanding of the molecular mechanisms of *V. harveyi* ORM4 during infection remains limited. Increasing our knowledge on this environmental strain requires us to set up appropriate genetic tools. The recent development of an efficient electroporation protocol allowed us to rapidly introduce exogenous DNA (replicative plasmids and mini-transposons) within *V. harveyi* ORM4 (Delavat et al., 2018). Using this procedure, transcriptional fusions have been constructed and introduced into *V. harveyi* ORM4, which showed at the single-cell level that the expression of a flagellar gene is subjected to phenotypic heterogeneity within an isogenic population of *V. harveyi* ORM4 (Delavat et al., 2018). Despite these advances, the key bacterial factors important for abalone infection remain unknown, hampering our understanding of their lifestyle and behaviour during infection.

The objectives of this study were to unveil the genetic bases involved in the virulence of *V. harveyi* ORM4 towards abalone and to shed a new light on similarities and differences with established knowledge on *V. campbellii* BAA-1116. To reach these objectives, we report here the *in vitro* and *in vivo* phenotypic characterizations of both an *exsA* mutant and a *luxO* mutant, affected in their type III secretion system and quorum sensing system, respectively. Our results pave the way for a better molecular understanding of the regulation of its pathogenicity in response to climate change.

© 2021 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Experimental procedures

Strains and culture conditions

Unless otherwise stated, *Escherichia coli* strains were routinely grown at 37°C in LB, and *V. harveyi* strains were cultivated at 28°C in LBS [LB containing 20 g l⁻¹ NaCl (final concentration)]. If necessary, agar (15 g l⁻¹), kanamycin (Km, 100 µg ml⁻¹ for *E. coli*, 250 µg ml⁻¹ for *V. harveyi*), chloramphenicol (Cm, 5 µg ml⁻¹), trimethoprim (Trim, 10 µg ml⁻¹), ampicillin (Amp, 100 µg ml⁻¹), glucose (Glc, 0.3 g l⁻¹), diaminopimelic acid (DAP, 0.3 mM), L-arabinose (L-ara, 0.2%), Congo Red (40 µg ml⁻¹) or Coomassie Blue (15 µg ml⁻¹) were added to the media. Strains and plasmids used in this study are listed in the Supporting Information Tables S2 and S3 respectively.

Doubling times of the different *Vibrio* strains were determined by spectrophotometry. Briefly, one colony of each strain was used to inoculate 5 ml of LBS in tubes, which were incubated for 8 h at 20°C or 28°C with shaking. A total of 100 µl were subsequently used to inoculate 5 ml LBS in tubes, in triplicates, and tubes were incubated overnight with shaking at their respective temperatures. The 50 µl of each triplicate was then used to inoculate 100 ml Erlenmeyers containing 20 ml LBS, and OD_{600nm} was measured regularly over 10 h. Doubling times were calculated from the exponential growth phase of each culture.

Strain constructions and DNA techniques

Molecular techniques were performed according to standard procedures and by following the recommendations of the reagent suppliers. Targeted chromosomal deletions were performed by double homologous recombination between a suicide plasmid and the chromosome. Briefly, around 800 bp of the upstream and downstream regions of each gene [*luxO* (HORM4v2_520006) and *exsA* (HORM4v2_240097)] to be deleted were amplified by PCR (Supporting Information Table S4), and a Splicing by Overlap Extension PCR (SOEing PCR) was performed to fuse the two fragments. The obtained fragment was cloned in the pGEM-T vector (Promega), sequenced to verify the absence of point mutation, and subcloned into pLP12 (Luo *et al.*, 2015), using unique cloning sites. These newly constructed suicide plasmids were transformed in *E. coli* β-3914 (Le Roux *et al.*, 2007) carrying a RP4 origin of transfer. Matings were performed by growing the *E. coli* donor strains (strain β-3914 carrying each suicide plasmid pFD067 or pFD083), *V. harveyi* ORM4 and, if necessary, an *E. coli* helper strain carrying the pEVS104 plasmid (Dunn *et al.*, 2006), overnight. The latter strain increases the chance of the suicide plasmid to conjugate from the donor strain to the recipient strain.

After overnight growth, 200 µl of the *E. coli* donor strain culture was centrifuged, 200 µl of the *E. coli* helper strain were added to the pellet, centrifuged again, and 800 µl of *V. harveyi* ORM4 was added to the pellet, before a final centrifugation. The pellet was resuspended with 20 µl of a LBS + DAP+Glc solution, which was spotted in a single drop on a 0.2 µm acetate filter placed on a LBS + DAP+Glc plate. Matings were allowed to incubate for 24 h at 28°C. Filters were subsequently removed, rinsed with 1 ml filter-sterilized seawater (FSSW), and the cell suspension was concentrated by centrifugation and plated on LBS + Glc + Cm plates. After 24–48 h incubation, colonies were restreaked on LBS + Glc + Cm, and the integration of the suicide plasmid in *V. harveyi* ORM4 was verified by colony-PCR. At least one colony with an integration of the suicide plasmid in the ‘upstream’ region and one in the ‘downstream’ region were grown overnight in 5 ml LBS, before being serially diluted and plated on LBS + L-ara. Colonies obtained after overnight incubation were restreaked on LBS + L-ara and LBS + Cm to control their Cm-sensitivity. The genetic background (revertant wild type or deletion mutant) of the Cm-sensitive clones was determined by colony-PCR. Deletion mutants were finally stored at –80°C in glycerol stocks.

Complementations of the *exsA* and *luxO* mutants were obtained by amplifying the corresponding genes and their respective promoters and cloning them into the multi-copy plasmid pJLS199 and derivatives. The amplified fragments were cloned in the pGEM-T vector and sequenced to verify the absence of mutations. Fragments were then subcloned (NheI/BamHI digestion) into pJLS199 yielding pFD067 (for the *exsA* gene) or into pFD077 yielding pFD084 (for the *luxO* gene). The newly constructed plasmid pFD067 was transferred to the *exsA* mutant by electroporation, using a recently established protocol (Delavat *et al.*, 2018), but using MgCl₂, 6H₂O instead of MgCl₂. pFD084 was transferred by tri-parental mating, using strains *V. harveyi* ORM4 Δ*luxO* and two *E. coli* strains carrying pEVS104 and pFD084, respectively. Complemented mutants were stored at –80°C in a glycerol stock, and trimethoprim was always used to maintain the plasmid in these strains.

The *luxO* and T3SS annotated genomic regions of *V. harveyi* ORM4, and genes HORM4_520123 and HORM4_520124 were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) under the accession numbers LR992915, LR992914, HG993337 and HG993338, respectively.

mRNA assay by reverse transcription-quantitative PCR

RNA extractions were performed from LBS-grown cultures. One colony of *V. harveyi* ORM4, the Δ*exsA* and Δ*luxO* strains were used to inoculate 5 ml of LBS in

4 A. Morot et al.

tubes and incubated for 8 h at 20°C with shaking; 100 µl of each culture was used to inoculate in triplicate 5 ml LBS and tubes were incubated overnight at 20°C with shaking. The next morning, 50 µl were used to inoculate 20 ml LBS (in 100 ml Erlenmeyer). Cultures were harvested at OD_{600nm} 0.1 centrifuged, and pellets were subsequently resuspended in the same volume of LBS. Tubes were incubated at 20°C with shaking for 1 h. After incubation, tubes were centrifuged for 10 min at 4000 g at 4°C, and the supernatant was discarded. Total RNA were extracted with TRI reagent according to the manufacturer's procedure (Sigma-Aldrich). Residual DNA were eliminated using the Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific). A total of 1 µg of RNA was converted to single-stranded cDNA using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The concentration and quality of RNA before and after DNase treatment were, respectively, measured with a fluorometer (Qubit 4, Thermo Fisher Scientific) and by electrophoresis (Bioanalyzer Agilent 2100). mRNA of interest were quantified by real-time PCR of their cDNA. Each primer pair used to amplify within *HORM4v2_240099*, *HORM4v2_240127* and *HORM4v2_1190007* (Supporting Information Table S4) were validated by verifying that the PCR efficiency (E) was above 0.95. The 15 µl reactions contained 7.5 µl of 2X SYBR Green I Master Mix, 0.1 µg of cDNA and 0.3 µM of each primer. The conditions were 95°C for 7 min and 40 cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 20 s and 72°C for 20 s. PCR reactions were performed in triplicate (LightCycler 480 Instrument II, Roche Life Sciences). The relative quantification of mRNA was obtained by the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak and Schmittgen, 2001) using *hfq* mRNA as endogenous control as previously reported (Waters et al., 2010).

Motility

V. harveyi strains were grown overnight in LBS at 20°C or 28°C and diluted to a concentration of 5×10^8 CFU ml⁻¹ (Travers et al., 2008). The 2 µl of this concentration-adjusted suspension was plated on LBS containing 0.2% agar, or on 'poor motility plate' (0.2% agar, 1% tryptone, 2% NaCl and 35 mM MgSO₄) (Tischler et al., 2018). Halo diameters were measured regularly.

The complemented *exsA* and *luxO* mutants were grown in LBS + Trim and compared with *V. harveyi* ORM4 containing the empty pFD085 plasmid. After 10 h of incubation at their respective temperature, the halo diameters of each strain were recorded. Every strain was tested at least in triplicate.

Biofilm production

Biofilm production was measured from cultures grown in LBS + Trim or in serum + Trim. Serum was prepared by pipetting abalone haemolymph with a 2.5 ml syringe (Terumo) and a needle (Terumo, 25G, 0.5 × 16 mm). Haemolymph was centrifuged for 5 min at 1150 g at 4°C, and supernatant was filter-sterilized using a 0.22 µm filter to obtain the serum (kept on ice). Strains carrying either pFD085 (empty plasmid) or the plasmid used for complementation were grown overnight in LBS + Trim at 20°C or 28°C. Every suspension was diluted with LBS + Trim to OD_{590nm} 0.1, and aliquots of 200 µl were transferred to individual wells (in quadruplicate) of a 100-well polystyrene microplate (Bioscreen plates Honeycomb, Thermo Scientific) for the production of biofilms in LBS + Trim. For biofilm production in serum, 900 µl of this OD-adjusted suspension was centrifuged, and pellets were resuspended with 900 µl serum + Trim, before 200 µl were aliquoted in the microplate (in quadruplicate). Microplates were placed in a Bioscreen microplate reader (Labsystems) without shaking at 20°C or 28°C, and the OD_{590nm} was measured every 10 min. After 48 h, cell suspensions were removed by inversion, and 220 µl of a Crystal Violet (CV, 0.1%) solution were added in every well and left for 10 min. Wells were washed twice with distilled water and the microplate was left for drying at room temperature for 24 h. CV was dissolved by adding 30% acetic acid for 10 min, and OD_{590nm} was measured. The absorbance measured in every well was normalized, by dividing the OD_{590nm} measured after crystal violet staining by the maximal OD_{590nm} measured during the growing time of the corresponding well.

Polysaccharide production

Overnight cultures of strains carrying either pFD085 (empty plasmid) or pFD084 (complementation of *luxO*) were diluted 1:100 in fresh LBS + Trim medium, and exponentially growing suspensions were diluted to an OD_{600nm} at 0.2. The 10 µl of these OD-adjusted suspensions was spotted on LBS plates containing Congo Red and Coomassie Blue (Bassis and Visick, 2010). Plates were incubated for 24 h, before the colour of each spot was observed by eyes and pictures were acquired. The red/brown-shifted colour intensity of the spot is used as a proxy for EPS production (Bassis and Visick, 2010).

Fluorescence microscopy

Strains *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, carrying the P_{*exsA*}-*gfp* transcriptional fusion from the pFD090 plasmid were grown for 8 h in 5 ml LBS + Trim,

and 100 μ l was used to inoculate 5 ml LBS + Trim in tubes, in triplicates. The next morning, 5 μ l was used to inoculate 5 ml LBS + Trim in tubes (1/1000 dilution). At least five pictures per replicate were acquired from the overnight cultures, and after 3, 6 and 9 h of growth, using the Zeiss Axio Imager.M2 microscope equipped with a 100X Apochromat oil objective, at 200 ms exposure time (with 25% LED intensity). Fluorescence of single cells was quantified using an in-house written Matlab script (Delavat *et al.*, 2016), with at least 1209 cells per condition.

Infection experiments

Mature abalones (6–7 cm) were brought from France Haliotis (Plouguerneau, France) and left in a 1 m³ tank with circulating seawater (19.5°C \pm 1°C). After 2 weeks of acclimation, 12 abalones per condition (in triplicate) were placed in smaller tanks containing 10 l seawater at the same temperature, with a bubbling system. Tanks were infected for 24 h by balneation with 5 \times 10⁶ CFU ml⁻¹ (Travers *et al.*, 2008) of *V. harveyi* ORM4, of the different deletion mutants of *V. harveyi* ORM4 or of *V. harveyi* LMG 7890, an abalone-avirulent strain (Travers *et al.*, 2009b), all grown overnight in LBS. Balneation allows reproduction of the natural route of animal infection, since bacteria are inoculated into seawater and are not injected directly in the animal. For the second infection experiment using the complemented mutants, all strains carried either the empty plasmid pFD085 or the plasmid used for complementation and were all grown overnight in LBS + trimethoprim. Seawater was renewed every 24 h in every tank, and dead abalones were counted and removed daily.

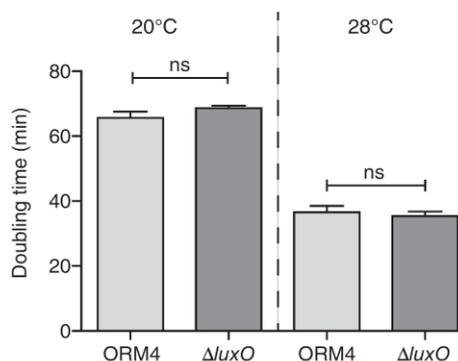


Fig 1. Doubling times of *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 1) and ORM4 $\Delta luxO$ (strain 243) were grown in Erlenmeyers with shaking at the indicated temperature, and OD_{600nm} was measured regularly to calculate the doubling time. An unpaired two-tailed t-test was performed for each temperature.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

The quorum sensing LuxO regulator does not affect the growth characteristics of V. harveyi ORM4

To unveil the role(s) of the QS system of *V. harveyi* ORM4, we inactivated the *luxO* gene, encoding the homologue of a major regulatory protein described extensively in *V. campbellii* BAA-1116. To obtain a $\Delta luxO$ mutant, we constructed the pFD083 suicide plasmid using the pLP12 vector, which has originally been designed for *Vibrio* strains and relies on the L-arabinose-inducible Vmi480 toxin to force the second recombination event and the excision of the cointegrate (Luo *et al.*, 2015). The pFD083 suicide plasmid, containing around 800 bp of each of the two regions flanking the *luxO* gene, could be integrated into the genome of *V. harveyi* ORM4, as observed by the growth of -chloramphenicol-resistant colonies and by dedicated colony-PCR. Induction of Vmi480 led to the excision of the vector from the genome, ultimately leading to the generation of a *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ deletion mutant in 7 out of the 15 clones tested by PCR.

V. harveyi ORM4 grew optimally at 28°C in LBS, displaying a doubling time of 36.5 \pm 1.9 min (Fig. 1), similarly (two-tailed t-test, *P* = 0.443) to the $\Delta luxO$ mutant (35.4 \pm 1.3 min at 28°C). A decrease in temperature to 20°C (permissive temperature for abalone infection; Travers *et al.*, 2009a) led to an about 1.9-fold longer doubling time, both for *V. harveyi* ORM4 and for *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (65.7 \pm 1.9 min and 68.7 \pm 0.7 min, respectively). Thus, despite the supposed pleiotropic effect of the QS system (van Kessel *et al.*, 2013), the absence of LuxO did not influence significantly the doubling time of *V. harveyi* ORM4 under these conditions. Moreover, a complementation of *luxO* in the $\Delta luxO$ mutant, through the use of the multi-copy plasmid pFD084, did not impair the growth phenotype (Supporting Information Fig. S1).

The luxO mutant showed an altered motility capacity

Bacteria from the genus *Vibrio* are frequently motile, and this swimming capacity could play a role during infection, by allowing the bacteria to swim toward their host and colonize it. Therefore, we tested whether *V. harveyi* ORM4 is motile, and whether the QS system regulates, via LuxO, the motility in this strain. Using 0.2% agar plates, we could demonstrate that the wild type strain

6 A. Morot et al.

was highly motile, both on rich (LBS) and ‘poor’ plates, with a higher motility level on ‘poor’ plate (Fig. 2). As expected, motility was higher on both plates at 28°C, the optimal growth temperature of *V. harveyi* ORM4, as compared to the motility at 20°C. Interestingly, the $\Delta luxO$ mutant was impaired in motility, with 1.5- to 2-fold decrease in the swimming diameters under every tested condition.

We subsequently complemented the deletion of *luxO* by introducing *in trans* the functional *luxO* gene and its own promoter on the pFD084 plasmid. Surprisingly, the standard electroporation protocol recently developed for *V. harveyi* ORM4 and other marine bacterial strains (Delavat *et al.*, 2018) was inefficient for the $\Delta luxO$ mutant, despite repeated attempts. The plasmid was therefore introduced into the $\Delta luxO$ strain by tri-parental mating. This complementation restored the motility phenotype to the wild-type level, at both temperatures on the two media (Supporting Information Fig. S2). Therefore, an intact QS system is required for full swimming motility of *V. harveyi* ORM4.

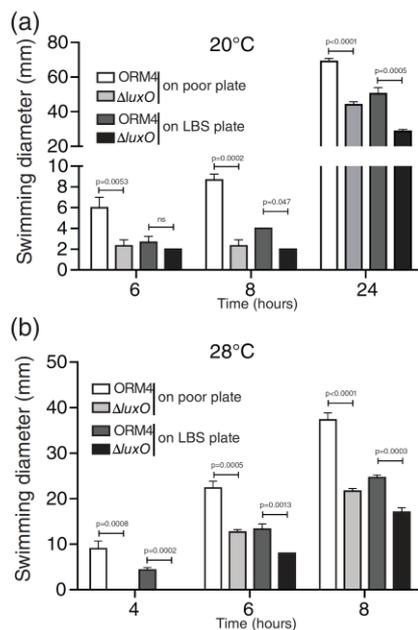


Fig 2. Motility of *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 1) and ORM4 $\Delta luxO$ (strain 243) were spotted on 0.2% agar plates, and swimming diameters were recorded every 2 hours, both at 20°C (A) and 28°C (B). Note that the swimming diameter at 24 h could not be recorded at 28°C (B), because the halos overlapped, and that no expansion of the colony diameter due to swimming was observed before 6 h (A) and 4 h (B). Unpaired two-tailed t-tests with equal variance were performed to compare *V. harveyi* ORM4 with the $\Delta luxO$ mutant for every condition, except for the condition LBS at 8 h at 20°C (non-parametric, Wilcoxon test).

The luxO mutant has an impaired biofilm formation capacity

Since biofilm formation could be important for the infection process and is likely QS-dependent, biofilms of *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ were grown in microtiter plates without shaking at 20°C and 28°C, and the biofilm amounts were quantified. *V. harveyi* ORM4 was able to form biofilms when grown in LBS, irrespective of the incubation temperature (Fig. 3), and this biofilm was mostly located at the bottom of the wells. Interestingly, the biofilm biomasses increased fivefold to 10-fold when cells were incubated in the presence of serum from abalone haemolymph, as compared to the one on LBS medium (Fig. 3E and F). This suggests that the serum somehow induces biofilm formation in *V. harveyi* ORM4. This induction of biofilm formation seems to be strain-specific, because biofilm production was not induced by serum when using *V. harveyi* LMG 7890, an abalone-avirulent strain (Nicolas *et al.*, 2002). *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ showed a twofold to threefold decrease in the amount of biofilm formed in LBS and a 10- to 200-fold decrease in serum (Fig. 3C and D), compared with *V. harveyi* ORM4 (Fig. 3A and B). Moreover, this mutant failed to produce more biofilm in the presence of serum (Fig. 3E and F), suggesting that the induction of biofilm formation in abalone serum is QS-dependent. As expected, a functional complementation in the $\Delta luxO$ mutant restored the production of biofilm and its induction in the presence of serum (Supporting Information Fig. S3).

Since exopolysaccharides (EPS) are major components of biofilms matrixes (Casillo *et al.*, 2018), we evaluated the EPS production of *V. harveyi* ORM4, the $\Delta luxO$ mutant and the *luxO* complemented mutant strains by spotting them onto LBS plates containing the Congo Red dye, which binds polysaccharide-containing structures. After 24 h of incubation, the spots corresponding to *V. harveyi* ORM4 showed a reddish colour and a red ring close to the extremity of the spot, indicating the presence of some EPS. On the same plate, the spot of the $\Delta luxO$ mutant is much paler and the reddish ring is basically absent, while complementing the deletion of *luxO* restored the wild-type phenotype (Fig. S4). The reduced EPS production by the $\Delta luxO$ mutant could be at least in part responsible for its decreased biofilm formation ability.

LuxO is crucial for virulence of V. harveyi ORM4

The decreased motility (Fig. 2) and biofilm formation capacities (Fig. 3) displayed by the $\Delta luxO$ mutant prompted us to examine whether the pathogenic properties are also affected in this mutant. To address this question, mature abalones (6–7 cm) were infected by balneation with *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* LMG 7890, or

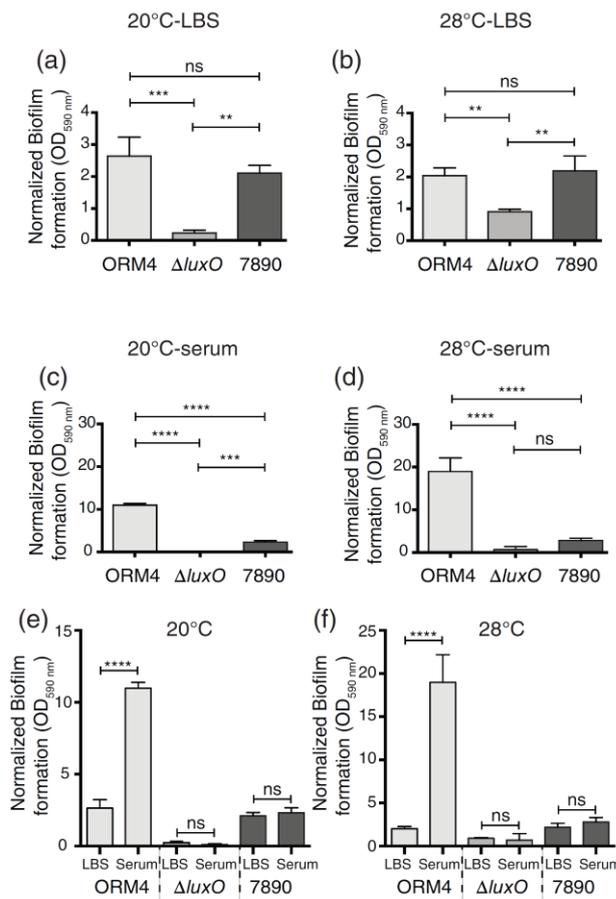


Fig 3. Biofilm production by *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ and *V. harveyi* LMG 7890. Strains ORM4 (strain 242), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 267) and LMG 7890 (strain 263) were grown in LBS (A and B) and in abalone serum (C and D), both at 20°C (A and C) and 28°C (B and D) without shaking in microplates, and biofilm was stained after 48 h using crystal violet. (E) and (F) Show the media effect (LBS vs. serum) for all three strains, at 20°C in (E) and 28°C in (F). A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition in panels A to D, and an unpaired two-tailed t-test was performed for to compare the media effect in panels E and F.

V. harveyi ORM4 $\Delta luxO$, and the number of surviving abalones was counted every day. *V. harveyi* ORM4 triggered rapid mortality, since only $44.4 \pm 19.2\%$ of abalones survived infection after 5 days, and only $25 \pm 8.3\%$ 5 days later (Fig. 4A). On the other hand, infection with *V. harveyi* LMG 7890 did not result in any abalone mortality, with 100% of survival after 10 days (Fig. 4A). When using *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, the mortality of abalones was abolished, since $95.8 \pm 5.9\%$ of abalones survived after 10 days of balneation (Fig. 4A). Thus, LuxO, and therefore a fully functional QS system, seems to be essential to the virulence of this strain.

Because variability between abalone killing may occur from experiment to experiment, we repeated the infection

experiment, and included the *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ mutant complemented with the wild-type *luxO* gene. This second infection experiment confirmed our previous findings, *i.e.* that *V. harveyi* ORM4 is a potent pathogen, that the abalones used in this second experiment were still sensitive to vibriosis, and that the deletion of *luxO* led to an impaired virulence of *V. harveyi* ORM4 (Fig. 4B). Moreover, the complementation restored the wild-type virulent phenotype, with $13.9 \pm 4.8\%$ of survivors after 10 days (two-way ANOVA at day 10, $P = 0.1831$ in comparison with the wild type). Host death was furthermore accelerated when using the complemented mutant, since only $22.2 \pm 4.8\%$ of abalones survived after 5 days, compared with $50 \pm 8.3\%$ for the wild type ($P < 0.0001$). This could be due to an overexpression of the *luxO* gene since the latter is carried by a multi-copy plasmid in the complemented strain. These results confirmed that the observed increase in survival rate was due to the *luxO* deletion. Thus, LuxO plays a key role in the regulation of the molecular mechanism(s) involved directly or indirectly in infection of the European abalone *H. tuberculata* by *V. harveyi* ORM4.

V. harveyi ORM4 harbours genes for a complete type III secretion system

An expert annotation of the genome sequence of *V. harveyi* ORM4 led to the identification of a 33-kb genetic region encoding a putative T3SS. This region is very similar to the region encoding the T3SS1 in *V. parahaemolyticus* strain RIMD2210633, responsible for the cytotoxicity in host cells during infection (Zhou *et al.*, 2010) (Fig. 5 and Table S5). All genes encoding the structural proteins and the regulators ExsA (HORM4v2_240097), ExsC (HORM4v2_240092), ExsD (HORM4v2_240098) and ExsE (HORM4v2_240091) are found in this region, suggesting a functional secretion system in *V. harveyi* ORM4 (Supporting Information Table S5).

Importantly, we identified in the genome of *V. harveyi* ORM4 orthologs for VopQ (HORM4v2_240119) and VPA0450 (HORM4v2_520123, which lies outside of the T3SS gene cluster), with 82.72% and 89.74% of amino acid identity, respectively. VopQ and VPA0450 are two of the four proteins known to be secreted by the T3SS1 in *V. parahaemolyticus* (VopQ, VPA0450, VopR and VopS). VopQ affects lysosomal homeostasis by deacidification (Sreelatha *et al.*, 2013) in *V. parahaemolyticus*, while VPA0450 is an inositol polyphosphatase that destabilizes plasma membranes (Broberg *et al.*, 2010). The translocation of VPA0450 requires VPA0451, a cargo chaperone protein (Waddell *et al.*, 2014) for which an orthologue was found in *V. harveyi* ORM4 outside the T3SS region and next to the gene for VPA0450 (HORM4v2_520124).

8 A. Morot et al.

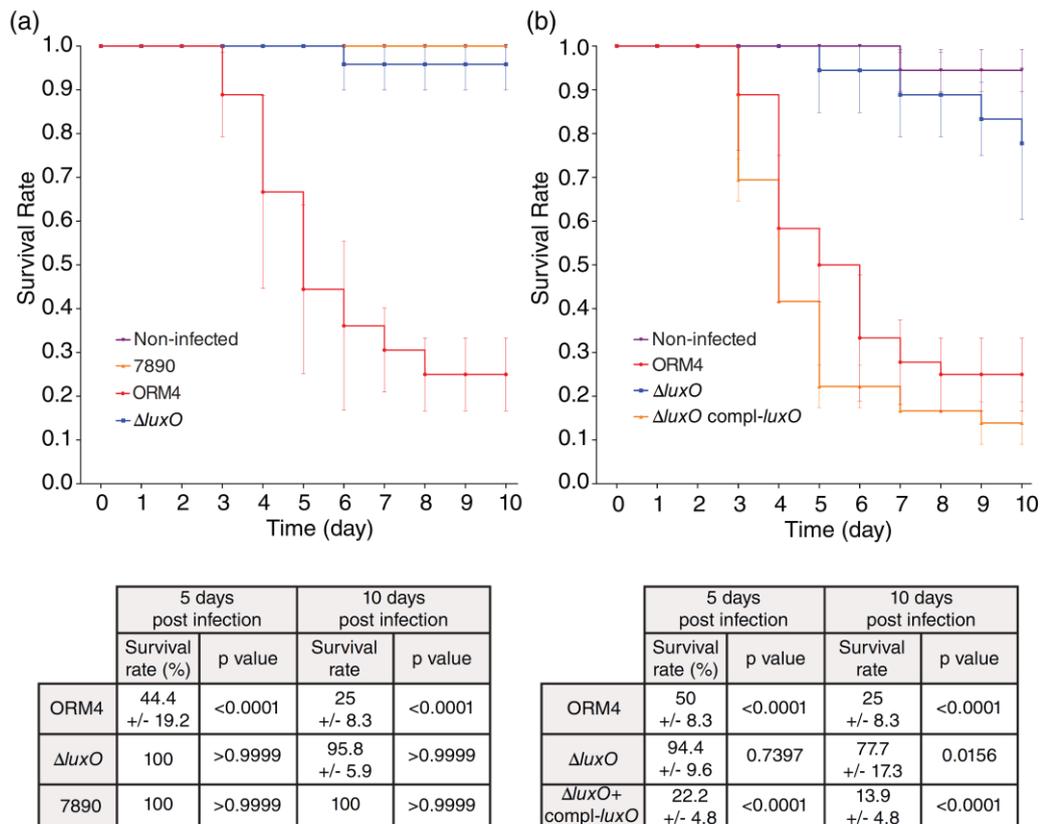


Fig 4. Survival rate of abalones in the presence of *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ and *V. harveyi* LMG 7890. A. ORM4 (strain 1), LMG 7890 (strain 45) and ORM4 $\Delta luxO$ (strain 243) were used to infect abalones by balneation, and surviving abalones were counted daily. Every experiment was performed in triplicate tanks, but one replicate for the *luxO* mutant was removed because of a bubbling problem. Note that purple (non-infected tanks) and orange (tanks infected with *V. harveyi* LMG 7890) curves overlap. Note that the results for ORM4, LMG 7890 and non-infected tanks are identical to the ones in Fig. 7A, because experiments were performed at the same time. B. Strains 256 (ORM4), 306 ($\Delta luxO$) and 272 ($\Delta luxO$ compl-*luxO*) were used for abalone infections by balneation. Note that the results for ORM4 and non-infected tanks are identical to the ones in Fig. 4B, because experiments were performed at the same time. A two-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition, and *P* values are relative to non-infected abalones. \pm was calculated using standard deviation. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In close vicinity to *vopQ*, a large ORF (963 codons) encoding an arginine ADP-ribosyltransferase was further identified in *V. harveyi* strain ORM4 (HORM4v2_240111). Once translocated in eucaryotic cells, the ADP-ribosyltransferase of *V. cholerae* catalyses the transfer of ADP-ribose to guanine nucleotide regulatory (G) proteins, ultimately leading to increased cAMP level, efflux of chloride ions into the lumen, causing diarrhoea (for a review, see Herrera and Satchell, 2020). This protein, possibly secreted by the T3SS of *V. harveyi* ORM4, may play a similar role in the virulence of this strain and would deserve further studies.

LuxO regulates the expression of the T3SS

To assess a possible link between LuxO and the T3SS of *V. harveyi* ORM4, the promoter activity of the

exsA gene, encoding the major activator of the T3SS genes, was quantified by epifluorescence microscopy at the single cell level. This was performed by following the expression of a P_{exsA} -*gfp* transcriptional fusion, expressed from the pFD090 plasmid introduced in *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, and by quantifying the GFP activity in single cells for both genetic backgrounds. We could demonstrate that *exsA* is expressed under *in vitro* condition in *V. harveyi* ORM4, as revealed by the fluorescence emission in this genetic background (Fig. 6B). Moreover, its expression was higher in early exponential phase, when cells were at low cell density (Fig. 6A, one-way ANOVA with Tukey test, comparing time 3 h with the other time points, *P* < 0.0001). Importantly, these results also showed that the P_{exsA} -*gfp* reporter gene was more expressed in the $\Delta luxO$ mutant, at all time

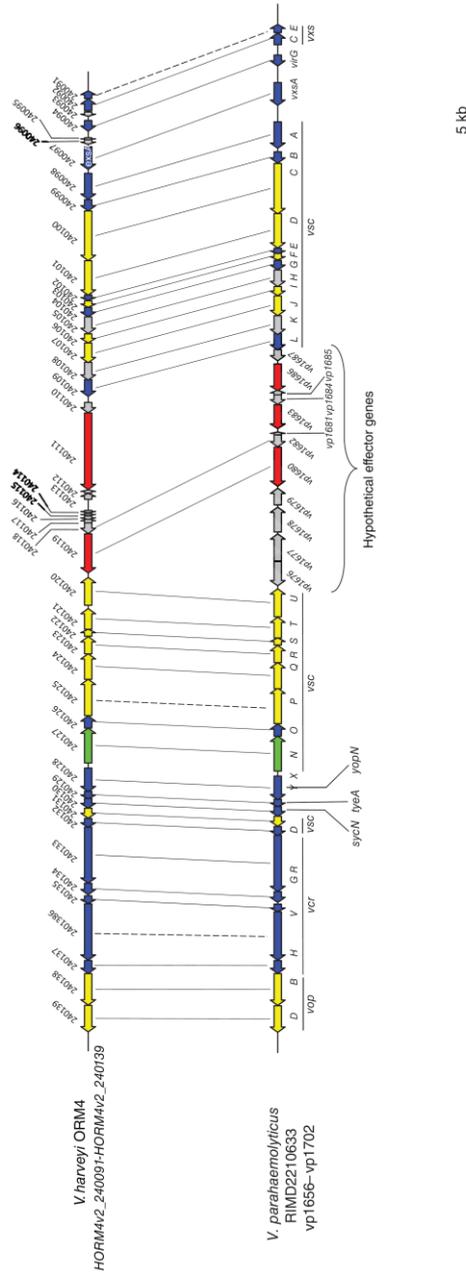


Fig 5. Comparison of the genetic organizations of the T3SS regions between *V. harveyi* ORM4 and *V. parahaemolyticus* RIMD2210633. MAGE Genoscope (<https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/home/index.php?>) was used to annotate the T3SS genes in *V. harveyi* ORM4 and to calculate the amino acid identity percentage between proteins of the two bacteria. Genes are classified according to the type of proteins produced: structure (blue), ATPase (green), regulator (yellow), effector (red), and non-identified (grey). In the T3SS1 loci of *V. parahaemolyticus* RIMD2210633, a region located between genes *vscU* and *vscL* is composed of genes encoding for VopQ (vp1680), VopR (vp1683), VopS (vp1686), and hypothetical proteins that could be potential effectors. Genes encoding proteins with amino acid identity >50% and query coverage >50% are linked with a full line and genes encoding proteins with amino acid identity between 30% and 50%, and a query coverage >50% are linked with a dotted line. The percentage of amino acid identity between *V. harveyi* ORM4 and *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 for every gene of the T3SS, and their predicted function, can be found in Table S5, together with a previously proposed unified nomenclature (Hueck, 1998). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

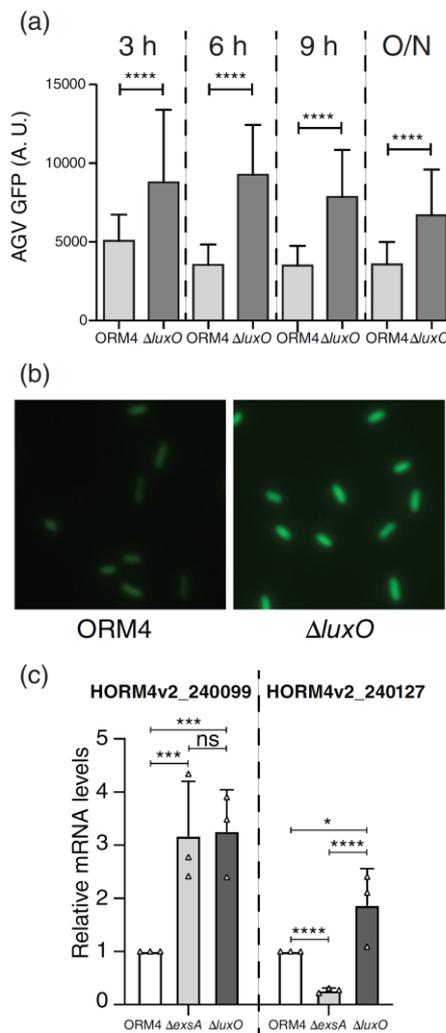


Fig 6. Regulation of T3SS genes in *V. harveyi* ORM4 and derivative mutants.
A. GFP fluorescence produced in ORM4 (strain 249) and ORM4 $\Delta luxO$ (strain 332) from the P_{exsA} -*gfp* transcriptional fusion, quantified at different growth phases (3 h: early exponential-phase. 6 h: mid-exponential phase. 9 h: late exponential-phase. O/N: Overnight, stationary phase). An unpaired two-tailed t-test with equal SD was performed to compare the fluorescence from both genetic backgrounds at each time point.
B. Illustration of the higher fluorescence of GFP emitted from the $\Delta luxO$ background. Images were obtained at time 6 h and scaled to the same maximal Average Grey Value (found in the image from the $\Delta luxO$ background).
C. RT-qPCR experiments on targeted T3SS genes, when cells are at low-cell density (OD_{600nm} 0.1). White histograms correspond to *V. harveyi* ORM4, while pale and dark grey ones correspond to the $\Delta exsA$ and $\Delta luxO$ mutants, respectively. HORM4v2_240099 encodes a T3SS chaperone, YscB family; HORM4v2_240127 encodes the ATPase VscN. A multiple-comparison two-way ANOVA (with Tukey test) was performed for both genes, using the \log_2 values of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

points (Fig. 6A), demonstrating that the QS system regulates the expression of the *exsA* gene. In addition, RT-qPCR experiments showed that the core T3SS

genes HORM4v2_240099 and HORM4v2_240127 are both overexpressed in the $\Delta luxO$ mutant (Fig. 6C), demonstrating the T3SS regulation by QS, either directly or indirectly, in *V. harveyi* ORM4.

The T3SS-regulator ExsA is essential for the virulence of V. harveyi ORM4

Since LuxO plays a key role in the virulence of *V. harveyi* ORM4 toward abalones and regulates the expression of the T3SS via *exsA*, the *exsA* gene has been deleted in strain *V. harveyi* ORM4. We first demonstrated by RT-qPCR experiments that *ExsA* regulates genes of the T3SS, since HORM4v2_240099, encoding a protein from the YscB family involved in preventing the secretion of effectors through the T3SS (Plano and Schesser, 2013), is induced in the $\Delta exsA$ mutant, while the T3SS ATPase (HORM4v2_240127) is repressed (Fig. 6C).

Importantly, apart from the inactivation of the T3SS, the $\Delta exsA$ mutant showed physiological characteristics, which are similar to those of the wild-type *V. harveyi* ORM4. Indeed, its doubling time (67.3 ± 1.6 min at 20°C and 34.7 ± 1.1 min at 28°C) appeared indistinguishable from that of the wild type (Supporting Information Fig. S5), its motility was similar to the motility of the wild type (Supporting Information Fig. S6), and this mutant was not impaired in biofilm formation (Supporting Information Fig. S7).

However, when abalones were infected with *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$, the mortality was abolished, as no abalone had died after 10 days, a result identical to non-infected abalones (two-way ANOVA, $P > 0.9999$; Fig. 7A). This experiment thus demonstrated that the T3SS is essential for *V. harveyi* ORM4 to induce mortality in abalones. To confirm this result, we complemented the deletion of *exsA* in *V. harveyi* ORM4 by transferring the pFD067 plasmid, containing the *exsA* gene and its own promoter, in *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$. Complementing the deletion of *exsA* restored the virulence of *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$, since $55.6 \pm 19.2\%$ of abalones survived after 5 days (two-way ANOVA, $P = 0.9188$ comparing with *V. harveyi* ORM4) and $33.3 \pm 22\%$ ($P = 0.7726$) after 10 days (Fig. 7B).

Taken together, these experiments demonstrated that the T3SS of *V. harveyi* ORM4 is essential for the virulence of this strain.

Discussion

Although *V. harveyi* is a major marine pathogen, the mechanical details involved in the virulence of true *V. harveyi* strains are scarce since the best-known strain within this species, *V. harveyi* BAA-1116, has been reclassified within the *V. campbellii* species (Lin et al., 2010).

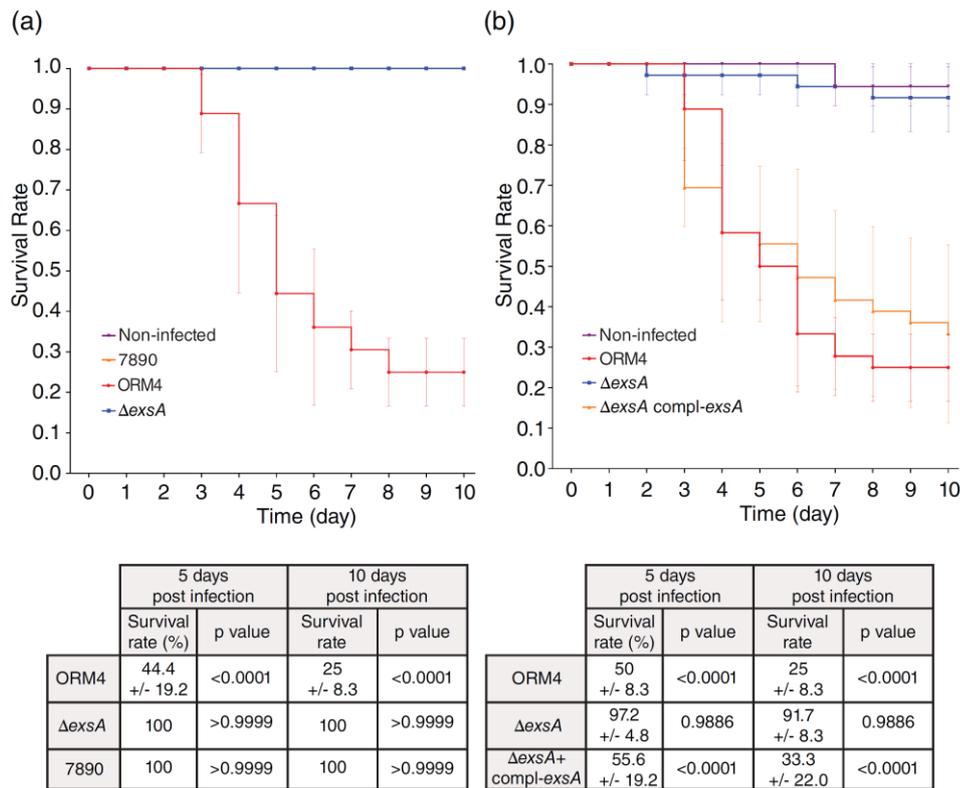


Fig 7. Survival rate of abalones in the presence of *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$ and *V. harveyi* LMG 7890. A. ORM4 (strain 1), (LMG 7890 (strain 45) and ORM4 $\Delta exsA$ (strain 131) were used to infect abalones by balneation, and surviving abalones were counted daily. Every experiment was performed in triplicate tanks, but one replicate for the *exsA* mutant was removed because of a bubbling problem in one replicate. Note that purple (non-infected tanks), orange (tanks infected with *V. harveyi* LMG 7890) and blue (tanks infected with *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$) curves overlap. Note that the results for ORM4, LMG 7890 and non-infected tanks are identical to the ones in Fig. 4A, because experiments were performed at the same time. B. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta exsA$ (strain 293) and ORM4 $\Delta exsA$ compl-exsA (strain 162) were used for abalone infections by balneation. Note that the results for ORM4 and non-infected tanks are identical to the ones in Fig. 4B, because experiments were performed at the same time. A two-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition, and *P* values are relative to non-infected abalones. \pm was calculated using standard deviation. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In this study, we aimed at filling this gap, by deploying a dual genetic and functional approach to assess the role of potential major molecular regulators of virulence in *V. harveyi* ORM4, which is a true *V. harveyi* strain (Supporting Information Table S1). We first focused on *luxO*, encoding a major regulator of the QS system (Miyamoto *et al.*, 2003), regulating the translation of LuxR and ultimately modulating the expression of up to 625 genes in *V. campbellii* (van Kessel *et al.*, 2013; Ball and van Kessel, 2019).

In strains belonging to various species from the genus *Vibrio*, including *V. campbellii* BAA-1116 (Tu and Bassler, 2007), *V. cholerae* like El Tor strain C6706 (Ng and Bassler, 2009), *V. fischeri* strains (Miyashiro and Ruby, 2012) and *V. parahaemolyticus* BB22 (Gode-Potratz and McCarter, 2011), a *luxO* deletion locks the cells in a ‘high cell density’-like state, with an increased production of LuxR. Given the conserved QS network

architecture, it is widely accepted that it is conserved among *Vibrionaceae*. The following discussion will therefore refer to the physiological state of the *luxO* mutant of ORM4 as a ‘high cell density’-like state. A thorough future study will be however necessary to confirm this hypothesis, by the construction and physiological characterization of various mutants including, but not restricted to, *luxR*.

In this study, we deleted the *luxO* gene of *V. harveyi* ORM4, and the mutant was physiologically characterized. Despite the supposedly pleiotropic effect of LuxO, the deletion of its gene did not affect the growth rate of *V. harveyi* ORM4 under *in vitro* conditions, and the mutant as well as the wild-type strain grew faster at 28°C than at 20°C (Fig. 1). This absence of difference between *V. harveyi* ORM4 and the $\Delta luxO$ mutant is rather surprising, since a mutant of *V. campbellii* BAA-1116 in which the *luxO* gene has been inactivated by a Tn5 transposon

12 A. Morot et al.

grows twice slower than the parental strain (Nackerdien *et al.*, 2008). This difference might be due to the fact that *V. campbellii* BAA-1116 is a luminescent bacterium, and that locking cells in a 'high cell density'-like state by inactivating *luxO* leads to a constitutive overproduction of luminescence, which is energetically costly for the cells. However, it might also be because *V. campbellii* BAA-1116 is genetically and physiologically different from *V. harveyi* ORM4, and so might be their QS.

In contrast to the absence of growth phenotype, *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ shows a clear decrease in motility, as compared to the wild-type motility measured on swimming plates both at 20 and 28°C (Fig. 2). It should be noted that motility was not completely abolished in the $\Delta luxO$ mutant, which could be explained by the presence of lateral flagella in *V. harveyi*, which is mainly responsible for swimming (Montanhez and Kaberdin, 2020). This observation is opposite to what is known for *V. campbellii* BAA-1116, where locking cells in a 'high cell density'-like state (by the D47A mutation in LuxO) leads to a significant increase in motility compared with the motility of cells producing the wild type LuxO, while a constitutively inactive QS (by the D47E mutation in LuxO) leads to a decreased motility (Yang and Defoirdt, 2015). Thus, LuxO seems to have opposite effects on motility in *V. harveyi* ORM4 and *V. campbellii* BAA-1116.

Of note, 'temperature' and 'quantity of nutrients' are two important factors for *V. harveyi* ORM4 motility, since cells swim faster at 28°C than at 20°C, and twice faster on a 'poor plate' than on a rich plate (Fig. 2). This can be explained by the necessity for cells to prospect for nutrients on the 'poor plate' experiment (Adler, 1966).

Motility and biofilm formation are tightly linked. Indeed, work on *V. cholerae* showed that mutants impaired in motility also have a decreased capacity in biofilm formation (Watnick and Kolter, 1999), and that blocking flagellar rotation leads to an inhibition of expression of the *vps* cluster involved in *Vibrio* polysaccharide production (Lauriano *et al.*, 2004). In addition, biofilm production can be an important process for host colonization. Indeed, *V. fischeri* colonization of its squid host *Euprymna scolopes* is dependent on the symbiosis polysaccharide (*syp*) gene locus, the expression of which leads to biofilm formation (Yip *et al.*, 2005). In our study, we demonstrated that *V. harveyi* ORM4 is able to form biofilms, and that the biofilm amount does not change, whether cells were grown at 20 or 28°C (Fig. 3). Interestingly, this biofilm formation is dependent on an intact QS system, since the $\Delta luxO$ mutant forms much less biofilm (Fig. 3) and less EPS (Supporting Information Fig. S4) as compared to the wild type. It means that locking cells of *V. harveyi* ORM4 in a 'high cell density'-like state (in the $\Delta luxO$ mutant) is detrimental to biofilm formation. This observation is similar to what is known from *V. campbellii*

BAA-1116. Indeed, a *luxO* deletion in BAA-1116 leads to a decrease in biofilm production, and this decrease is linked with the generation of a more homogeneous population, highlighting that phenotypic heterogeneity is important for biofilm formation (Anetzberger *et al.*, 2009). In addition, a $\Delta luxO$ mutant of *V. cholerae* also leads to a decreased biofilm production (Zhu *et al.*, 2002). This is due to the overproduction of HapR (the LuxR homologue in *V. cholerae*) in this mutant strain, which is a repressor of the *Vibrio* polysaccharide synthesis (*vps*) operons (Zhu and Mekalanos, 2003).

Interestingly, the quantity of biofilm formed by *V. harveyi* ORM4 is fivefold to 10-fold higher when cells grew in the presence of serum from abalone haemolymph as compared with the quantity of biofilm formed in LBS (Fig. 3). Moreover, this induction by abalone serum is abolished in the *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ mutant. This suggests that LuxO is activated, either through a signalling molecule found in serum or through a yet-unknown mechanism, and this activation is relayed via the QS system to the biofilm production regulatory machinery. However, we also demonstrated that serum induction of biofilm formation is absent in *V. harveyi* LMG 7890, an abalone-avirulent strain. This would suggest that the induction of biofilm formation by molecules found in the abalone serum is a specific response of the abalone-pathogen strain *V. harveyi* ORM4.

In line with these findings, we monitored the virulence of the *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ mutant by comparing the survival rates of abalones following infection by either this mutant or the ORM4 wild-type strain. *V. harveyi* ORM4 triggered a high mortality level, with 75% of death occurring within 10 days (Fig. 4). This mortality rate is similar to earlier results, confirms that *V. harveyi* ORM4 is a potent abalone pathogen, and that the abalones used in this study were mature and sensitive to *V. harveyi* ORM4 (Travers *et al.*, 2009a,b). Interestingly, when bathed with *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, the survival rate of abalones drastically increased. This demonstrates that locking cells in a 'high cell density'-like state is detrimental for full virulence of *V. harveyi* ORM4. This is the exact opposite to observations recently reported for *V. campbellii* BAA-1116. In this strain, locking cells in a 'maximally active QS' state (by the amino acid substitution D47A in LuxO) leads to a much lower survival rate of tiger grouper larvae (*Epinephelus fuscoguttatus*), as compared to larvae infected by the wild type strain. In contrast, locking cells to a 'low cell density' state (by the amino acid substitution D47E in LuxO) leads to an increased survival rate of these larvae (Noor *et al.*, 2019).

QS is known to regulate virulence, notably through the regulation of secretion systems. Various secretion systems are thought to be involved in the pathogenicity of *Vibrio* toward molluscs, such as the T3SS in

V. campbellii BAA-1116 (Ruwandeeepika *et al.*, 2015), or the type IV secretion system in *Vibrio tapetis* (Dias *et al.*, 2018; Rahmani *et al.*, 2021). Interestingly, the genome of *V. harveyi* ORM4 harbours a complete set of T3SS genes (Fig. 5), but the role of the T3SS in the virulence of this strain and its QS-dependent regulation have never been addressed prior to this study. In *V. campbellii* BAA-1116, T3SS genes, such as *exsA*, encoding the major regulator of the T3SS (Zhou *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2010), or *vopD*, *vcrD* and *vscP*, encoding proteins involved in the structure and functioning of the T3SS, are repressed when cells are at 'high cell density'-like state (Waters *et al.*, 2010; Ruwandeeepika *et al.*, 2015). To assess the link between QS and T3SS-mediated virulence in *V. harveyi* ORM4, we first monitored the expression of its *exsA* gene and compared it to its expression in the $\Delta luxO$ background. Single-cell microscopy experiments showed that *exsA* is expressed in *V. harveyi* ORM4 under the tested conditions, and RT-qPCR confirmed that core T3SS-genes are expressed in this strain (Fig. 6). Moreover, expression of *exsA* is higher in early exponential phase, when cells are still at low cell density, as already demonstrated for *V. campbellii* BAA-1116 (Waters *et al.*, 2010). However, the expression of *exsA* is also higher in the $\Delta luxO$ mutant, as compared to the expression in the wild type, under all growth phases. This is rather surprising, given that this mutant is thought to be locked in a 'high cell density'-like state, while in *V. campbellii* BAA-1116, *exsA* expression is higher when cells are locked at low cell density (Waters *et al.*, 2010). Indeed, in the latter strain, LuxR directly represses *exsA* (Chaparian *et al.*, 2020) by binding to its promoter, at both low and high cell densities (van Kessel *et al.*, 2013). Our experiment shows that the regulation of the T3SS by QS is different between *V. harveyi* ORM4 and *V. campbellii* BAA-1116.

To further confirm that the T3SS is important for the virulence of *V. harveyi* ORM4, we subsequently constructed a derivative of *V. harveyi* ORM4 deficient in T3SS, by the deletion of the *exsA* gene. This strain has similar physiological characteristics as the wild type and is still able to form biofilms (Supporting Information Figs. S5–S7), but fails to express T3SS genes (Fig. 6C). Importantly, when used *in vivo* by balneation with mature abalones, we observed that the $\Delta exsA$ mutant is unable to induce mortality (Fig. 7A), while functional complementation restored the virulent phenotype in a similar level as the wild-type one (Fig. 7B). These results demonstrate that the T3SS of *V. harveyi* ORM4 is essential for its virulence, similar to its role in *V. parahaemolyticus* (Zhou *et al.*, 2010).

Taken together, our results suggest a different infection strategy between *V. harveyi* ORM4 and *V. campbellii* BAA-1116. Indeed, *V. campbellii* BAA-1116 is thought to have a so-called frontal attack strategy, where the

expression of the T3SS operons of *V. campbellii* BAA-1116 is induced within 12 h after infection of brine shrimps when cells are at low cell density, before expression decreases, at least 1 day before host death (Ruwandeeepika *et al.*, 2015). In contrast, *V. harveyi* ORM4 would express T3SS genes later in the process, when cells are at high cell density, possibly after biofilm formation. In this scenario, locking cells at 'high cell density'-like state through the deletion of *luxO* is detrimental for ORM4 virulence, because of an incorrect timing of T3SS expression. Alternatively, the fact that the *luxO* mutant, despite overexpressing *exsA*, and an *exsA* deletion mutant are both avirulent toward abalone might imply that another, but yet-unknown, pathway is involved in the virulence. This pathway would be inactivated in the *luxO* mutant, rendering cells avirulent, independently of the presence of a functional T3SS.

Genetic and transcriptomic comparisons between *V. harveyi* ORM4, the *luxO* mutant and the avirulent strain LMG 7890, as well as the physiological characterization of a double *exsA-luxO* deletion mutant will allow unveiling the genetic basis of virulence of *V. harveyi* ORM4 and its link with QS, and this will be the subject of a future work..

In conclusion, the molecular mechanisms involved during infection of the European abalone *H. tuberculata* by *V. harveyi* ORM4 were investigated. Using genetic and functional approaches, we could demonstrate that the virulence of *V. harveyi* ORM4 is dependent on an intact QS system. This loss of virulence is correlated with a decreased motility and a lower ability to produce biofilm. Moreover, we could demonstrate that this loss of virulence is associated with a deregulation of the expression of the T3SS-regulator ExsA, and that the T3SS is essential to induce abalone mortality. Finally, we observed marked difference in phenotypes in the $\Delta luxO$ mutant, as compared to what is known from the literature for *V. campbellii* BAA-1116 (formerly called *V. harveyi*; Lin *et al.*, 2010). Thus, previously raised conclusions on the virulence mechanisms and strategy of *V. harveyi* strains using data from *V. campbellii* BAA-1116 may be over-extrapolated, and new *V. harveyi* model strains have to be established. With this study, we propose to use *V. harveyi* ORM4 as a new model strain to study the virulence mechanism of the *V. harveyi* species.

Acknowledgements

The authors would like to thank Frederique Le Roux for supplying strain *E. coli* β -3914. The authors also would like to thank the Genoscope for hosting the preliminary genome sequences of *V. harveyi* ORM4. Finally, the authors are grateful to Oceanopolis for the maintenance of abalones. This work was supported by the 'Laboratoire d'Excellence'

LabexMER (ANR-10-LABX-19), by the 'Ecole Universitaire de Recherche' ISblue (ANR-17-EURE-0015) and co-funded by a grant from the French government under the programme 'Investissements d'Avenir', and by a grant from the Regional Council of Brittany. This project received grants from the H2020 VIVALDI project (grant agreement n°678589), and the CNRS Prematuration (CoMAq project) and EC2CO (ViViMar project) programmes. The LBCM is supported by the Région Bretagne and European FEDER. A.M. and A.J. are the recipient of doctoral fellowships co-funded by the Région Bretagne, France, and the Université de Bretagne-Sud.

References

- Adler, J. (1966) Chemotaxis in bacteria. *Science* **153**: 708–716.
- Anetzberger, C., Pirch, T., and Jung, K. (2009) Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **73**: 267–277.
- Austin, B., and Zhang, X.H. (2006) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett in Appl Microbiol* **43**: 119–124.
- Ball, A.S., and van Kessel, J.C. (2019) The master quorum-sensing regulators LuxR/HapR directly interact with the alpha subunit of RNA polymerase to drive transcription activation in *Vibrio harveyi* and *vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **111**: 1317–1334.
- Ball, A.S., Chaparian, R.R., and van Kessel, J.C. (2017) Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in *Vibrios*. *J Bacteriol* **199**: e00105–e00117.
- Bassis, C.M., and Visick, K.L. (2010) The cyclic-di-GMP phosphodiesterase BinA negatively regulates cellulose-containing biofilms in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **192**: 1269–1278.
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., et al. (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol* **132**: 249–272.
- Boyaci, H., Shah, T., Hurley, A., Kokona, B., Li, Z., Ventocilla, C., et al. (2016) Structure, regulation, and inhibition of the quorum-sensing signal integrator LuxO. *PLoS Biol* **14**: e1002464.
- Broberg, C.A., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M. A., and Orth, K. (2010) A *vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science* **329**: 1660–1662.
- Cardinaud, M., Offret, C., Huchette, S., Moraga, D., and Paillard, C. (2014a) The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*. *Fish Shellfish Immunol* **36**: 1–8.
- Cardinaud, M., Dheilly, N.M., Huchette, S., Moraga, D., and Paillard, C. (2015) The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection. *Dev Comp Immunol* **51**: 287–297.
- Cardinaud, M., Barbou, A., Capitaine, C., Bidault, A., Dujon, A.M., Moraga, D., and Paillard, C. (2014b) *Vibrio harveyi* adheres to and penetrates tissues of the european abalone *Haliotis tuberculata* within the first hours of contact. *Appl Environ Microbiol* **80**: 6328–6333.
- Casillo, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., and Corsaro, M.M. (2018) Exopolysaccharides from marine and marine Extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. *Mar Drugs* **16**: 69.
- Chaparian, R.R., Ball, A.S., and van Kessel, J.C. (2020) Hierarchical transcriptional control of the LuxR quorum-sensing regulon of *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **202**: e00047-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00047-20>.
- Delavat, F., Mitri, S., Pelet, S., and van der Meer, J.R. (2016) Highly variable individual donor cell fates characterize robust horizontal gene transfer of an integrative and conjugative element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E3375–E3383.
- Delavat, F., Bidault, A., Pichereau, V., and Paillard, C. (2018) Rapid and efficient protocol to introduce exogenous DNA in *Vibrio harveyi* and *Pseudoalteromonas* sp. *J Microbiol Methods* **154**: 1–5.
- Dias, G.M., Bidault, A., Le Chevalier, P., Choquet, G., Der Sarkissian, C., Orlando, L., et al. (2018) *Vibrio tapetis* displays an original type IV secretion system in strains pathogenic for bivalve Molluscs. *Front Microbiol* **9**: 227.
- Dunn, A.K., Millikan, D.S., Adin, D.M., Bose, J.L., and Stabb, E.V. (2006) New rfp- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and lux expression in situ. *Appl Environ Microbiol* **72**: 802–810.
- Gode-Potratz, C.J., and McCarter, L.L. (2011) Quorum sensing and silencing in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **193**: 4224–4237.
- Gruenthal, K.M., and Burton, R.S. (2008) Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* leach, 1814), a candidate for endangered species status. *J Exp Mar Bio Ecol* **355**: 47–58.
- Harney, E., Dubief, B., Boudry, P., Basuyaux, O., Schilhabel, M.B., Huchette, S., et al. (2016) De novo assembly and annotation of the European abalone *Haliotis tuberculata* transcriptome. *Mar Genomics* **28**: 11–16.
- Herrera, A., and Satchell, K.J.F. (2020) Cross-kingdom activation of vibrio toxins by ADP-Ribosylation factor family GTPases. *J Bacteriol* **202**: e00278-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00278-20>.
- Hobday, A.J., Tegner, M.J., and Haaker, P.L. (2001) Over-exploitation of a broadcast spawning marine invertebrate: decline of the white abalone. *Rev Fish Biol Fish* **10**: 493–514.
- Huchette, S.M.H., and Clavier, J. (2004) Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *J Shellfish Res* **23**: 951–955.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
- Ina-Salwany, M.Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M.N.A., et al. (2019) Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *J Aquat Anim Health* **31**: 3–22.
- Lauriano, C.M., Ghosh, C., Correa, N.E., and Klose, K.E. (2004) The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **186**: 4864–4874.

- Le Roux, F. (2017) Environmental vibrios: "a walk on the wild side". *Environ Microbiol Rep* **9**: 27–29.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counter-selectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* **73**: 777–784.
- Lee, K.K., Liu, P.C., and Chuang, W.H. (2002) Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar Biotechnol (NY)* **4**: 267–277.
- Lin, B.C., Wang, Z., Malanoski, A.P., O'Grady, E.A., Wimpee, C.F., Vuddhakul, V., et al. (2010) Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol Rep* **2**: 81–89.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lorenz, N., Shin, J.Y., and Jung, K. (2017) Activity, abundance, and localization of quorum sensing receptors in *Vibrio harveyi*. *Front Microbiol* **8**: 634.
- Luo, P., He, X.Y., Liu, Q.T., and Hu, C.Q. (2015) Developing universal genetic tools for rapid and efficient deletion mutation in vibrio species based on suicide T-vectors carrying a novel Counterselectable marker, *vmi480*. *PLoS One* **10**: e0144465.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165–199.
- Milton, D.L. (2006) Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* **296**: 61–71.
- Miyamoto, C.M., Dunlap, P.V., Ruby, E.G., and Meighen, E. A. (2003) LuxO controls luxR expression in *Vibrio harveyi*: evidence for a common regulatory mechanism in vibrio. *Mol Microbiol* **48**: 537–548.
- Miyashiro, T., and Ruby, E.G. (2012) Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **84**: 795–806.
- Montanhez, I., and Kaberdin, V.R. (2020) *Vibrio harveyi*: a brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Mar Environ Res* **154**: 104850.
- Nackerdien, Z.E., Keynan, A., Bassler, B.L., Lederberg, J., and Thaler, D.S. (2008) Quorum sensing influences *Vibrio harveyi* growth rates in a manner not fully accounted for by the marker effect of bioluminescence. *PLoS One* **3**: e1671.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313–322.
- Ng, W.L., and Bassler, B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**: 197–222.
- Nicolas, J.L., Basuyaux, O., Mazurie, J., and Thebault, A. (2002) *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Organ* **50**: 35–43.
- Noor, N.M., Defoirdt, T., Alipiah, N., Karim, M., Daud, H., and Natrah, I. (2019) Quorum sensing is required for full virulence of *Vibrio campbellii* towards tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) larvae. *J Fish Dis* **42**: 489–495.
- Paillard, C., Le Roux, F., and Borrego, J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat Living Resour* **17**: 477–498.
- Plano, G.V., and Schesser, K. (2013) The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol Res* **57**: 237–245.
- Rahmani, A., Delavat, F., Lambert, C., Le Goic, N., Dabas, E., Paillard, C., and Pichereau, V. (2021) Implication of the type IV secretion system in the pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of Brown ring disease affecting the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Front Cell Infect Microbiol* **11**: 634427. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.634427>.
- Ruwandeeepika, H.A.D., Karunasagar, I., Bossier, P., and Defoirdt, T. (2015) Expression and quorum sensing regulation of type III secretion system genes of *Vibrio harveyi* during infection of Gnotobiotic brine shrimp. *PLoS One* **10**: e0143935.
- Ruwandeeepika, H.A.D., Jayaweera, T.S.P., Bhowmick, P.P., Karunasagar, I., Bossier, P., and Defoirdt, T. (2012) Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi* clade. *Reviews Aquacult* **4**: 59–74.
- Sreelatha, A., Bennett, T.L., Zheng, H., Jiang, Q.X., Orth, K., and Starai, V.J. (2013) *Vibrio* effector protein, VopQ, forms a lysosomal gated channel that disrupts host ion homeostasis and autophagic flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11559–11564.
- Tischler, A.H., Lie, L., Thompson, C.M., and Visick, K.L. (2018) Discovery of calcium as a biofilm-promoting signal for *Vibrio fischeri* reveals new phenotypes and underlying regulatory complexity. *J Bacteriol* **200**: e00016-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00016-18>.
- Travers, M.A., Boettcher Miller, K., Roque, A., and Friedman, C.S. (2015) Bacterial diseases in marine bivalves. *J Invertebr Pathol* **131**: 11–31.
- Travers, M.A., BARbou, A., Le Goic, N., Huchette, S., Paillard, C., and Koken, M. (2008) Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiol Lett* **289**: 34–40.
- Travers, M.A., Basuyaux, O., Le Goic, N., Huchette, S., Nicolas, J.L., Koken, M., and Paillard, C. (2009a) Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob Chang Biol* **15**: 1365–1376.
- Travers, M.A., Le Bouffant, R., Friedman, C.S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., et al. (2009b) Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J Cell Biochem* **106**: 152–160.
- Tu, K.C., and Bassler, B.L. (2007) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev* **21**: 221–233.
- van Kessel, J.C., Rutherford, S.T., Shao, Y., Utria, A.F., and Bassler, B.L. (2013) Individual and combined roles of the master regulators AphA and LuxR in control of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing regulon. *J Bacteriol* **195**: 436–443.
- Vandenbergh, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A., Balladares, M., et al. (1999)

- Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2592–2597.
- Waddell, B., Southward, C.M., McKenna, N., and Devinney, R. (2014) Identification of VPA0451 as the specific chaperone for the *Vibrio parahaemolyticus* chromosome 1 type III-secreted effector VPA0450. *FEMS Microbiol Lett* **353**: 141–150.
- Waters, C.M., Wu, J.T., Ramsey, M.E., Harris, R.C., and Bassler, B.L. (2010) Control of the type 3 secretion system in *Vibrio harveyi* by quorum sensing through repression of ExsA. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4996–5004.
- Watnick, P.I., and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a vibrio cholerae EI tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**: 586–595.
- Yang, Q., and Defoirdt, T. (2015) Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*. *Environ Microbiol* **17**: 960–968.
- Yip, E.S., Grublesky, B.T., Hussa, E.A., and Visick, K.L. (2005) A novel, conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and sigma-dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **57**: 1485–1498.
- Zhou, X.H., Konkel, M.E., and Call, D.R. (2010) Regulation of type III secretion system 1 gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* is dependent on interactions between ExsA, ExsC and ExsD. *Virulence* **1**: 260–272.
- Zhou, X.H., Shah, D.H., Konkel, M.E., and Call, D.R. (2008) Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Mol Microbiol* **69**: 747–764.
- Zhu, J., and Mekalanos, J.J. (2003) Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in vibrio cholerae. *Dev Cell* **5**: 647–656.
- Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B. L., and Mekalanos, J.J. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3129–3134.

Supporting Information

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

Fig. S1. Doubling time of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) were grown in erlenmeyers with shaking, and OD_{600nm} was measured regularly to calculate the doubling time. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

Fig. S2. Motility of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) were spotted on 0.2% agar plates, and swimming

diameter was recorded after 10 h at 20°C (A and B) and 28°C (C and D), on LBS (A and C) and 'poor' (B and D) swimming plates. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

Fig. S3. Biofilm production by *V. harveyi* strains. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306), ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) and LMG 7890 (strain 283) were grown at 28°C, both in LBS (A) and in abalone serum (B) without shaking in microplates, and biofilm was stained after 24 h using crystal violet. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

Fig. S4. Exopolysaccharide production of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) were spotted on LBS + Trim plates containing Congo Red, and incubated for 24 h.

Fig. S5. Doubling time of *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$. ORM4 (strain 1) and ORM4 $\Delta exsA$ (strain 131) were grown in erlenmeyers with shaking, and OD_{600nm} was measured regularly to calculate the doubling time. Note that the result for ORM4 is identical to the one in Fig. 1, because experiments were performed at the same time. An unpaired two-tailed t-test has been performed for each temperature.

Fig. S6. Motility of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta exsA$, and complemented ORM4 $\Delta exsA$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta exsA$ (strain 293) and ORM4 $\Delta exsA$ compl-*exsA* (strain 162) were spotted on 0.2% agar plates, and swimming diameter was recorded after 10 h, both at 20°C (A and B) and 28°C (C and D), both on LBS (A and C) and 'poor' (B and D) swimming plates. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

Fig. S7. Biofilm production by *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$ and *V. harveyi* LMG 7890. ORM4 (strain 242), ORM4 $\Delta exsA$ (strain 264) and LMG 7890 (strain 263) were grown at 20°C (A and B) and 28°C (C and D), both in LBS (A and C) and in abalone serum (B and D) without shaking in microplates, and biofilm was stained after 24 h using crystal violet. Note that the results for ORM4 and LMG 7890 are identical to the ones in Fig. 3, because experiments were performed at the same time. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

Table S1. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison (Richter et al., 2016).

Table S2. Strains used in this study.

Table S3. Plasmids used in this study. All *in silico* plasmid sequences and maps are available upon request.

Table S4. Primers used in this study.

Table S5. *V. harveyi* ORM4 T3SS proteins and amino acid percentage of identity with T3SS1 proteins of *V. parahaemolyticus* RIMD2210633.

11. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Conjointement à l'étude de l'implication du T3SS et du QS dans la virulence et la régulation de phénotypes chez *V. harveyi* ORM4, d'autres gènes codant pour des facteurs de virulence ont été recherchés dans le génome de la bactérie. Certains d'entre eux ont pu être délévés dans le chromosome de *V. harveyi* ORM4 dans le but d'étudier l'impact de leur délétion sur le pouvoir pathogène et la capacité de la bactérie à former du biofilm.

11.1. IDENTIFICATION DE GÈNES ASSOCIÉS À LA VIRULENCE CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

Les nombreuses recherches qui ont porté sur les espèces pathogènes du clade *Harveyi* offrent un ensemble de gènes et protéines identifiés comme étant impliqués dans la virulence de ces souches (paragraphe 1.3, page 14). Le génome complet de *V. harveyi* ORM4 a été séquencé et déposé sur la plateforme « MicroScope, Microbial Genome Annotation & Analysis » (MaGe, <https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/mage/>) qui a procédé à son annotation automatique. La capacité de *V. harveyi* ORM4 à coloniser l'ormeau européen réside dans sa faculté à contourner les actions du système immunitaire ou à acquérir les éléments essentiels à sa croissance (Travers *et al.*, 2009b ; Cardinaud *et al.*, 2015). Cette stratégie est partagée chez plusieurs autres espèces de *Vibrio* qui synthétisent des facteurs de virulence enzymatiques ou non-enzymatiques (Tableau 1) (Darshanee Ruwandeepika *et al.*, 2012 ; Ben Cheikh *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2019).

À l'aide de l'annotation automatique de ce génome par MaGe et des données déjà connues chez d'autres espèces (Tableau 1), il est possible d'établir une liste de gènes candidats pouvant être impliqués dans la virulence de *V. harveyi* ORM4 (Tableau 5).

Tableau 5 : Identification de gènes dans le génome de *V. harveyi* ORM4 par comparaison du pourcentage d'identité nucléotidique de ceux associés à la multiplication, invasion et aux dommages provoqués chez l'hôte par les espèces de *Vibrio* appartenant au clade *Harveyi*.

Espèce de référence	Gène ou opéron		Produit	Gène ou opéron chez <i>V. harveyi</i> ORM4		Identité nucléotidique
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>pvsABCDE</i>	Sidérophore-vibrioferrine	HORM4v2_830055-830059	74 - 84 %	> 99%	
<i>V. harveyi</i>						
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>psuA-pvuABCDE</i> <i>pvuA1A2BCDE</i>	Système de transport, récepteur de la vibrioferrine	HORM4v2_830047-830054	81 - 87 %	> 99 %	
<i>V. harveyi</i>						
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Hémolysine thermostable direct (TDH)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>trh</i>	TDH-related hemolysin	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tIh</i>	Hémolysine thermostable	HORM4v2_1110005	86%	-	
<i>V. harveyi</i>	<i>vhh</i>	Hémolysine	-	-	-	
<i>V. harveyi</i>	<i>pap6</i>	Métalloprotéase	-	-	-	
<i>V. harveyi</i>	<i>degP</i>	DegP Sérine protéase	HORM4v2_130061	> 99 %	-	
<i>V. harveyi</i>	<i>degQ</i>	DegQ Sérine protéase	-	-	-	
<i>V. harveyi</i>	<i>degS</i>	DegS outer membrane-stress sensor serine endopeptidase	HORM4v2_130059	> 99 %	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1680</i>	VopQ ou VP1680 (Effecteur T3SS1)	HORM4v2_240119	83%	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1686</i>	VopS ou VP1686 (Effecteur T3SS1)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vpa0450</i>	VPA0450 (Effecteur T3SS1)	HORM4v2_520123	89%	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vp1683</i>	VopR (Effecteur T3SS1)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopA</i>	VopA (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopT</i>	VopT (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopL</i>	VopL (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopV</i>	VopV (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopC</i>	VopC (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vopZ</i>	VopZ (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>vpa1380</i>	VPA1380 (Effecteur T3SS2)	-	-	-	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>val1680</i>	Val1680 (Effecteur T3SS)	HORM4v2_240119	81%	-	
<i>V. alginolyticus</i>	<i>val1686</i>	Val1686 (Effecteur T3SS)	-	-	-	

Les sidérophores sont des molécules à faible poids moléculaires impliquées dans l'acquisition de fer par les bactéries, participant à leur maintien au sein de l'hôte qu'elles infectent. Chez *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus*, deux clusters de gènes sont impliqués dans la production de sidérophores et de leur récepteurs (Tanabe *et al.*, 2003, 2011 ; Oyanedel *et al.* 2023). La recherche de ces gènes dans le génome de *V. harveyi* ORM4 révèle que la bactérie possède la totalité des gènes nécessaires à l'acquisition de fer par l'utilisation de sidérophores (Tableau 5). Associés à l'invasion de l'hôte, les bactéries pathogènes produisent des facteurs de virulence avec une activité enzymatique causant des dommages cellulaires et tissulaires sur l'hôte infecté. Précédemment, nous avons identifié chez *V. harveyi* ORM4 tout un cluster de gènes associé à la production du T3SS ainsi que deux gènes codant les protéines homologues à celles sécrétées par le T3SS1 de *V. parahaemolyticus* (Tableau 5) (Morot *et al.*, 2021). *V. parahaemolyticus* synthétise un second T3SS dont les protéines sécrétées sont impliquées dans l'inactivation de la réponse immunitaire et la modulation du cytosquelette d'actine des cellules de l'hôte (Li *et al.*, 2019). Les gènes codant ce second système ainsi que les protéines sécrétées sont totalement absents du génome de *V. harveyi* ORM4 (Tableau 5). D'autres gènes, retrouvés dans le génome de *V. harveyi* ORM4, codent des enzymes associées à la virulence des bactéries appartenant au clade *Harveyi*. C'est notamment le cas pour le gène HORM4v2_1110005 qui partage 86 % d'identité nucléotidique avec le gène *thl* qui code une hémolysine thermolabile chez *V. parahaemolyticus*. Cette protéine est capable de lyser les érythrocytes humains et de poissons grâce à une activité phospholipase (Wang *et al.*, 2012b, 2015). En revanche, l'hémolysine codée par le gène *vhh* retrouvée chez plusieurs souches de *V. harveyi* pathogènes de poissons n'est pas présente dans le génome de *V. harveyi* ORM4 (Zhang *et al.*, 2001 ; Bai *et al.*, 2010). En parallèle, les gènes HORM4v2_130061 et HORM4v2_130059 ont été identifiés comme étant respectivement *degP* et *degS*, deux gènes codant pour des sérines protéases associées à la virulence (Zhang *et al.*, 2008)

11.2. Caractérisation D'AUTRES SOUCHES MUTANTES DE *V. HARVEYI* ORM4

Les travaux décrits dans ce premier article nous ont permis de montrer que le quorum sensing et le T3SS sont essentiels à la virulence de *V. harveyi* ORM4. Parallèlement, d'autres souches mutantes ont été construites par François Delavat et moi-même, chacune portant une délétion dans un gène susceptible d'être associé à la virulence de la bactérie.

11.2.1. AUTRES GÈNES ASSOCIÉS AU QUORUM SENSING

Au vu des résultats présentés dans l'article, le quorum sensing régule de nombreux phénotypes chez *V. harveyi* ORM4. C'est pour cela que nous avons choisi de déléter un second gène de la voie de signalisation du quorum sensing : le gène *luxR*. Pour rappel, chez *V. campbellii* BB120, l'expression du gène *luxR* est indirectement régulée par la protéine LuxO. Parmi les 600 gènes régulés par LuxR sont retrouvés ceux associés à la motilité, synthèse de protéase ou l'opéron *luxCDABE* (Figure 8) (Ball and van Kessel, 2019 ; Chen *et al.*, 2020 ; Yang and Defoirdt, 2015). Du fait que *V. campbellii* BB120 soit régulièrement dénommée *V. harveyi* dans les articles scientifiques, une confusion persiste entre ce qui est connu ou non concernant la régulation du quorum sensing chez les souches appartenant à l'espèce *V. harveyi*. C'est pourquoi la construction de la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxR$ (HORM4v2_420032) a été réalisée par Lilac Becdelièvre, encadrée par François Delavat lors de son stage de Master 1 en 2019, par double recombinaison homologue. Ce mutant ne présente aucune différence de croissance par rapport à la souche parentale ORM4. La complémentation de ce mutant à l'aide d'un plasmide répliatif, conduisant à la présence de plusieurs copies de *luxR*, engendre un défaut de croissance de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxR$ complémenté. À l'été 2020, une expérimentation d'infection par balnéation d'ormeaux européens en conditions contrôlées a été entreprise avec le mutant $\Delta luxR$. Les mortalités enregistrées se sont révélées similaires à celles obtenues avec une infection par la souche sauvage. L'étude transcriptomique réalisée au cours de la dernière

année de thèse (Chapitre 3), a révélé que le gène *luxR* est cinq fois plus exprimé chez la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ que chez la souche parentale en condition de culture planctonique. LuxO régule donc indirectement ou directement l'expression du gène *luxR* chez *V. harveyi* ORM4, comme cela a été démontré chez *V. campbellii* BB120 (Ball *et al.*, 2017).

En parallèle, les autres gènes impliqués dans le quorum sensing de *V. campbellii* BB120 ont été recherchés dans le génome de *V. harveyi* ORM4. Les gènes codant pour les différentes protéines appartenant aux trois systèmes retrouvés chez *V. campbellii* BB120 partagent au minimum 80 % d'identité nucléotidique avec ceux du génome de *V. harveyi* ORM4 (Tableau 6). De plus, les gènes associés à la production des petits ARN régulateurs ont aussi été retrouvés. La totalité de ces gènes a été recherchée dans les données transcriptomiques qui ont permis la comparaison des gènes exprimés chez *V. harveyi* ORM4 et le mutant $\Delta luxO$ en conditions planctoniques (Chapitre 3). Les analyses ont révélé que l'expression des gènes *cqsA*, *luxN*, *luxS* et *rpoN* est réduite de moitié chez le mutant $\Delta luxO$. En contrepartie, les gènes codant LuxU et LuxP sont respectivement deux et sept fois plus exprimés chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ en comparaison à la souche sauvage en condition de culture planctonique. L'identification des différents gènes du quorum sensing retrouvés chez *V. campbellii* BB120 dans le génome de *V. harveyi* ORM4 suggère que cette voie de signalisation soit similaire entre ces deux bactéries. Cette hypothèse est renforcée par le fait que chez *V. harveyi* ORM4, la protéine LuxO régule l'expression du gène *luxR*, ce qui a précédemment été démontré chez *V. campbellii* BB120 (Figure 8) (Lilley and Bassler, 2000). En se basant sur la voie de signalisation du quorum sensing de *V. campbellii* BB120 (Figure 8), nous pouvons émettre l'hypothèse que la virulence de *V. harveyi* ORM4 envers *H. tuberculata* nécessite la présence de la protéine LuxO, contrairement à la protéine LuxR, qui elle n'est pas essentielle à la pathogénicité de la souche.

Tableau 6 : Gènes identifiés chez *V. harveyi* ORM4 appartenant au système du quorum sensing et pourcentages d'identité nucléotidique partagés avec ceux retrouvés chez *V. campbellii* BB120.

Nom du gène	<i>V. campbellii</i> BB120	<i>V. harveyi</i> ORM4	% identité nucléotidique
<i>cqsA</i>	VIBHAR_06088	HORM4v2_830068	93 %
<i>cqsS</i>	VIBHAR_06089	HORM4v2_830069	90 %
<i>luxM</i>	VIBHAR_02765	HORM4v2_530027	98 %
<i>luxN</i>	VIBHAR_02766	HORM4v2_530026	89 %
<i>luxS</i>	VIBHAR_03484	HORM4v2_420009	96 %
<i>luxP</i>	VIBHAR_05351	HORM4v2_930034	94 %
<i>luxQ</i>	VIBHAR_0532	HORM4v2_930033	95 %
<i>luxO</i>	VIBHAR_02959	HORM4v2_520006	97 %
<i>luxU</i>	VIBHAR_02958	HORM4v2_520007	80 %
<i>rpoN</i>	VIBHAR_03664	HORM4v2_380006	97 %
<i>qrr</i>	VIBHAR_02960	HORM4v2_miscRNA32	-
	VIBHAR_04846	HORM4v2_miscRNA42	-
	VIBHAR_05322	HORM4v2_miscRNA45	-
	VIBHAR_06697	HORM4v2_miscRNA48	-
	VIBHAR_05886	HORM4v2_miscRNA53	-
<i>hfq</i>	VIBHAR_00094	HORM4v2_1190007	98 %
<i>luxR</i>	VIBHAR_03459	HORM4v2_420032	98 %
<i>aphA</i>	VIBHAR_00046	HORM4v2_1230010	98 %

11.2.2. [APhB](#)

AphB est un régulateur transcriptionnel impliqué dans la régulation de gènes de virulence en réponse à des stimuli environnementaux tels qu'une acidification ou une diminution de tension en oxygène dans l'environnement (Kovacikova and Skorupski, 1999 ; Kovacikova *et al.*, 2010). Chez *V. cholerae*, AphB interagit avec le régulateur du quorum sensing à faible densité cellulaire AphA afin d'activer l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du pilus TCP (toxin-coregulated pilus) et de la toxine cholérique notamment (Kovacikova and Skorupski,

2001). Le gène codant la protéine AphB (HORM4v2_490001) a été délété chez *V. harveyi* ORM4 par double recombinaison homologue à l'aide du plasmide suicide pFD068. Excepté un temps de doublement plus important observé en microplaque sous agitation, pouvant être expliqué par l'implication de la protéine dans la réponse à une baisse de tension en oxygène (Kovacikova *et al.*, 2010), aucune altération n'a été observée concernant la capacité du mutant à être motile, à former du biofilm en microplaque en polystyrène ou à induire des mortalités auprès d'ormeaux européens par rapport à la souche parentale. Chez *V. harveyi* ORM4 le gène *aphB* est régulé par la protéine LuxO puisque ce dernier est deux fois moins exprimé chez le mutant en condition de culture planctonique en comparaison à la souche sauvage. Aucune différence d'expression du gène *aphA* n'est observée dans cette condition de culture entre les deux bactéries. Bien que la protéine LuxO soit essentielle à la virulence de *V. harveyi* ORM4, l'expression des gènes sous la dépendance de la protéine AphB et AphA ne semble pas être nécessaire.

11.2.3. PROTÉINE DE LA MEMBRANE EXTERNE : OMPV

Une première analyse transcriptomique ayant pour but d'identifier les gènes exprimés par *V. harveyi* ORM4 au cours d'une infection de l'ormeau européen ainsi que ceux associés à la formation de biofilm en présence d'échantillons provenant de l'hôte (hémolymphe et mucus de branchies) a été réalisée au cours de l'année 2019. Parmi les différents échantillons envoyés, seuls les ARNs extraits à partir de biofilm de *V. harveyi* ORM4 formés en chambre à flux en présence ou non de mucus de branchies sur la lamelle ont pu être séquencés et analysés. Sur les 98 gènes induits lorsque la bactérie forme du biofilm en présence de mucus de branchies (FDR < 0,05), nous avons sélectionné 8 gènes codant des protéines connues ou inconnues et présentant toutes un peptide signal associé à l'exportation de protéines par le système Sec qui a été prédit à l'aide de l'outil SignalP (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Dans le but d'étudier

leur implication dans la formation de biofilm de *V. harveyi* ORM4 et établir un potentiel lien entre ce mode de vie et la virulence de la bactérie envers l'ormeau européen, la délétion de ces gènes a été entreprise. Par manque de temps, seule la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta ompV$ a pu être produite. Le gène codant la protéine OmpV (HORM4v2_1070102), présente quatre fois plus d'expression en présence de mucus de branchies, suggérant que OmpV soit impliquée dans l'interaction de la bactérie avec ces organes et pourrait ainsi jouer un rôle dans la colonisation de l'ormeau européen. Chez *Salmonella enterica*, cette protéine participe à l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales chez l'Homme (Kaur and Mukhopadhaya, 2020). *V. harveyi* ORM4 $\Delta ompV$ ne présentant aucune différence de croissance par rapport à la souche sauvage, elle a été mise en culture en chambre à flux en présence de LBS seul afin d'évaluer l'impact de sa délétion sur la formation de biofilm. En parallèle, sa capacité à induire des mortalités auprès d'ormeaux européens en conditions contrôlées a été testée. Les résultats obtenus pour ces deux expérimentations sont similaires à ceux obtenus avec la souche parentale et indiquent donc que OmpV n'est pas impliquée ni dans la virulence ni dans la formation de biofilm de la bactérie.

11.2.4. [RÉGULATEUR DE LA SYNTHÈSE DU FLAGELLE POLAIRE CHEZ LES *VIBRIO* : FLAK](#)

Dans l'environnement aquatiques, les bactéries atteignent et colonisent les hôtes qu'elles infectent grâce à leur capacité à se déplacer. L'étude du génome de *V. harveyi* ORM4 montre qu'elle présente la totalité des gènes associés à la production du flagelle polaire et des flagelles latéraux chez les *Vibrio* (McCarter, 2001 ; Stewart and McCarter, 2003). Et en effet, à l'aide de géloses de nage, nous avons pu observer une forte motilité (Morot *et al.*, 2021). Dans le but d'établir le lien entre motilité et virulence chez *V. harveyi* ORM4, le gène *flaK* (HORM4v2_460055) a été délété du génome de la bactérie par double recombinaison homologue à l'aide du plasmide suicide pFD071. La protéine FlaK est le régulateur principal

des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle polaire. L'expression des gènes de classe II est sous la dépendance de cet activateur transcriptionnel qui possède un domaine d'activation du facteur σ^{54} (Figure 5) (McCarter, 2001). La synthèse du flagelle polaire et la motilité sont des processus énergétiquement coûteux pour la cellule (Khan *et al.*, 2020). Ceci est confirmé chez *V. harveyi* ORM4 puisque la délétion du gène *flaK* provoque une diminution du temps de doublement significativement différente de ce qui est enregistré chez la souche parentale (test de Wilcoxon, p -value < 0,05). En effet à 28°C, température optimale de croissance, les temps de doublements sont de $36,5 \pm 1,9$ min chez la souche sauvage et de $32,06 \pm 0,83$ min chez le mutant. Une diminution de température à 20°C (température permissive pour l'infection de l'ormeau) entraîne des temps de doublements environ 2 fois plus long pour les deux bactéries. Néanmoins, celui mesuré chez *V. harveyi* ORM4 Δ *flaK* ($61,96 \pm 0,13$ min) reste significativement plus faible que celui de la souche parentale ($65,7 \pm 1,9$ min). Ainsi, la bactérie privée de flagelle polaire, du fait de la délétion du gène *flaK*, a la possibilité de rediriger l'énergie initialement allouée à ce processus vers celui de production de biomasse. À l'aide de géloses de nage (0,2 % d'agar), nous avons pu confirmer que *flaK* est impliqué dans la motilité de *V. harveyi* ORM4, puisque la délétion de ce gène engendre un diamètre de motilité deux fois moins important que celui observé chez la souche sauvage (Figure 24A). Précédemment, nous avons démontré que la délétion du gène *luxO* entraîne une perte de motilité de la bactérie. En comparant l'expression des gènes entre ce mutant et la souche parentale en condition planctonique, le gène *flaK* ainsi que 36 autres gènes impliqués dans la synthèse du flagelle polaire présentent entre 2 et 5 fois moins d'expression chez *V. harveyi* ORM4 Δ *luxO* (FDR < 5). Cette diminution d'expression des gènes associés à la synthèse du flagelle polaire corrobore ce que nous avons précédemment observé chez le mutant *luxO* et la diminution de motilité qu'il présente (Morot *et al.*, 2021).

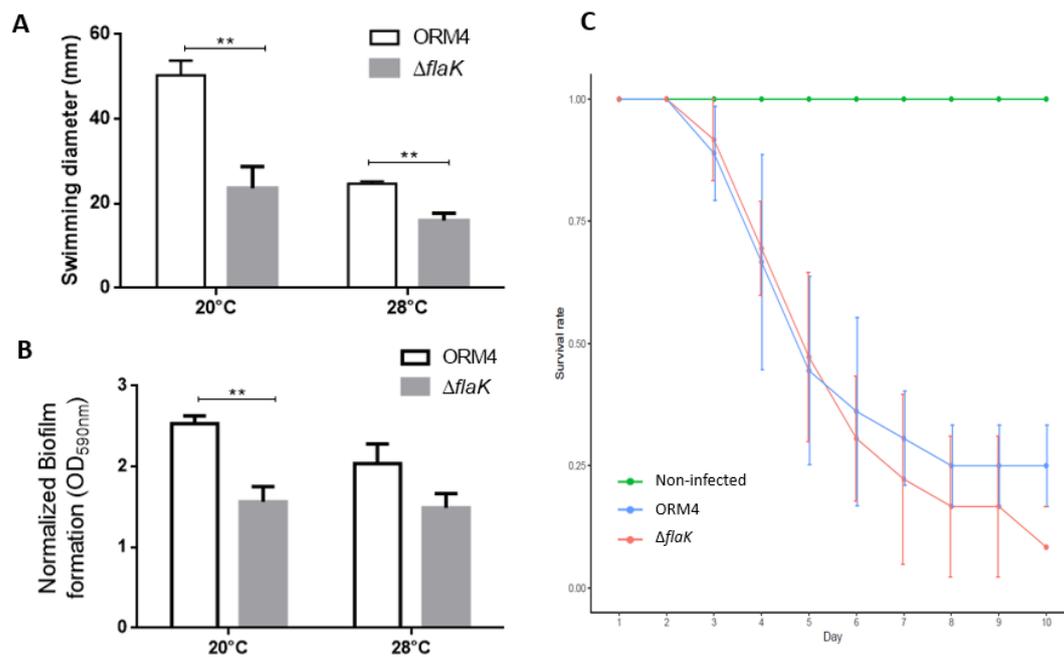


Figure 24 : Étude des phénotypes impactés par la délétion du gène *flaK* chez *V. harveyi* ORM4. Diamètres de motilité mesurés chez *V. harveyi* ORM4 et le mutant *V. harveyi* ORM4 $\Delta flaK$ en gélose de nage (0,2 % d'agar) à 20°C et 28°C (A). Quantification de la production de biofilm par les deux bactéries après 48 h de culture en microplaque en présence de LBS après coloration au Crystal Violet (0,1 %) (B). Suivi de mortalité de *H. tuberculata* après infection à 20°C avec *V. harveyi* ORM4 et le mutant *flaK* (C). Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives sont indiquées à l'aide d'une étoile (** p -value<0.01).

En parallèle, nous avons souhaité étudier l'implication de cet appendice filamenteux dans la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. Au moment de l'adhésion bactérienne, première étape dans ce processus, la présence de flagelles est nécessaire à la bactérie pour se maintenir sur la surface colonisée et surmonter les forces de répulsions (Bruzard *et al.*, 2015). Chez *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm en microplaque à 28°C l'absence du gène *flaK* n'impacte pas ce phénotype. Néanmoins, une diminution de la température à 20°C provoque une différence dans la production de biofilm entre les deux bactéries, le mutant $\Delta flaK$ produisant significativement moins de biofilm (Figure 24B). L'étude des gènes exprimés par *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm en chambre à flux, en comparaison à une culture planctonique à une même température de 20°C (chapitre 3), révèle que *flaK* ne présente aucune différence d'expression entre ces conditions. Néanmoins, 16 gènes participant à la synthèse du flagelle polaire sont entre 2 à 5 fois moins exprimés en biofilm (FDR < 0,05), suggérant que cet

appendice filamentueux n'intervient pas chez un biofilm mature de *V. harveyi* ORM4. Chez *V. alginolyticus*, la délétion du gène *flrA*, homologue de *flaK*, a quant à lui engendré une perte de production de biofilm en microplaque à 28°C (Luo *et al.*, 2016). En parallèle, l'implication du flagelle polaire dans la virulence de *V. harveyi* ORM4 a été examinée. Nous avons ainsi pu montrer que le défaut de motilité présent chez *V. harveyi* ORM4 Δ *flaK* n'impacte pas sa capacité à induire des mortalités chez *H. tuberculata* (Figure 24C).

12. CONCLUSION

Au cours de ces dernières années, de nombreuses données ont été acquises sur le couple d'infection *V. harveyi* ORM4-*H. tuberculata*. Cependant les facteurs de virulence produits par la bactérie sont restés jusqu'à ce jour inconnus. Une technique pour identifier ceux nécessaires au pouvoir infectieux d'une bactérie est la délétion de gènes candidats et l'étude des phénotypes impactés chez les mutants. Le génome complet de *V. harveyi* ORM4 étant disponible, il est possible de cibler des gènes candidats à partir des données acquises chez d'autres espèces. Cette technique a donc été utilisée dans ce chapitre. Des gènes codant pour les régulateurs de systèmes de virulence ont été délétés avec pour objectif de déréguler ces systèmes et ainsi potentiellement les inactiver. La délétion de certains de ces gènes n'a pas induit de changements dans les phénotypes étudiés. Cependant, les mutants impactés dans le quorum sensing (*V. harveyi* ORM4 Δ *luxO*) et le T3SS (*V. harveyi* ORM4 Δ *exsA*) apportent une première identification de systèmes essentiels à la virulence de *V. harveyi* ORM4 envers l'ormeau européen. Les potentielles cibles et la chronologie de l'utilisation du T3SS au cours du cycle infectieux de la bactérie restent encore à définir. Cependant, vu que ce système est similaire au T3SS1 de *V. parahaemolyticus*, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il ait une action de lyse cellulaire envers des cellules de l'hôte, par injection de protéines cytotoxiques (Calder *et al.*, 2014b ; Li *et al.*, 2019). Deux gènes codant des orthologues des protéines, VopQ et VPA0450 sécrétées

par le T3SS1 chez *V. parahaemolyticus* et impliquées dans la virulence de la bactérie, ont été retrouvés dans le génome de *V. harveyi* ORM4. En culture liquide par l'utilisation de biorapporteurs, nous avons montré que le gène *exsA* présente une expression plus importante à faible densité cellulaire (début de phase exponentielle), et que sa régulation est dépendante de la protéine LuxO. En effet, la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ présente une expression du gène *exsA* deux fois plus importante que la souche sauvage. La caractérisation de cette souche montre l'implication du QS dans la régulation de divers phénotypes que sont la motilité, la formation de biofilm et la production d'exopolysaccharides. Ces différents phénotypes pourraient être nécessaires à l'infection causée par *V. harveyi* ORM4 et expliquer en quoi la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ n'induit pas de mortalité chez l'ormeau européen.

En revanche, la cinétique d'utilisation du QS et du T3SS par *V. harveyi* ORM4 reste encore à définir. En effet, les deux mutants associés à ces systèmes étant devenues non létales pour l'ormeau européen, il serait intéressant d'identifier à quelle étape du cycle infectieux ils sont éliminés. Cette question sera traitée dans le second chapitre de ce manuscrit.

CHAPITRE II :

ÉTUDE DE LA COLONISATION DE
L'ORMEAU EUROPÉEN PAR
V. HARVEYI ORM4

13. INTRODUCTION DE L'ÉTUDE

V. harveyi ORM4 est un agent pathogène opportuniste, profitant d'une faiblesse saisonnière de l'ormeau européen pour infecter ce dernier. Cette bactérie est retrouvée dans les tissus et l'hémolymphe de l'animal seulement trois heures après avoir été mise en contact, par baignade, avec celui-ci (Cardinaud *et al.*, 2014a). Cette rapidité de colonisation de l'hôte est observée chez plusieurs espèces de *Vibrio*. Par exemple, après infection par voie orale de crevettes Kuruma *Penaeus japonicus*, l'agent pathogène *Vibrio* sp. PJ est détecté après seulement 3 heures dans l'hémolymphe et l'estomac de l'animal (Pena *et al.*, 1995). Suite à une infection de *P. monodon* par une souche pathogène de *V. harveyi*, une analyse de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité a montré une réponse de la part des hémocytes seulement six heures après infection, suggérant la présence de la bactérie dans l'hémolymphe de l'animal (Somboonwiwat *et al.*, 2006).

Les études de l'infection de *H. tuberculata* par *V. harveyi* ORM4 indiquent que les branchies sont les premiers organes colonisés par la bactérie (Travers *et al.*, 2008a ; Cardinaud *et al.*, 2014a ; Dubief *et al.*, 2017). Les branchies sont en contact direct avec l'environnement extérieur et sont recouvertes de mucus, qui représente une barrière physique et chimique face aux agressions externes (Allam and Pales Espinosa, 2015). Cependant, ce fluide visqueux présente aussi un pouvoir chimio-attractant et une source de nutriments pour les microorganismes (Bordas *et al.*, 1998 ; Staroscik and Nelson, 2007). Dans de nombreuses infections causées par des espèces de *Vibrio*, les branchies représentent malgré tout une voie d'entrée pour les pathogènes (Sawabe *et al.*, 2007a ; Cabello *et al.*, 2005). Après colonisation des branchies, *V. harveyi* ORM4 est retrouvée dans l'hémolymphe, fluide dans lequel elle est capable de proliférer et d'induire une septicémie malgré la présence d'hémocytes (Travers *et al.*, 2009b). La présence de la bactérie pathogène provoque une réponse immunitaire inefficace, qui se traduit par une absence de phagocytose par rapport à ce qui est enregistré en présence de la

souche non pathogène *V. harveyi* LMG 7890 (Travers *et al.*, 2009b). Au cours d'expérimentations *in vitro*, lorsque *V. harveyi* ORM4 est mise en contact avec des cultures de cellules branchiales dans lesquelles sont retrouvées des cellules hémocytaires, cette même absence de phagocytose est enregistrée (Pichon *et al.*, 2013). Chez l'ormeau européen, l'inhibition de la réponse immunitaire est corrélée à un retard d'activation de la voie des MAP kinases p38 par *V. harveyi* ORM4 (Travers *et al.*, 2009b). De plus, il est possible que *V. harveyi* ORM4 induise une lyse hémocytaire, puisque la concentration en hémocytes diminue au cours de l'infection (Cardinaud *et al.*, 2015). Ainsi, l'aptitude de *V. harveyi* ORM4 à coloniser l'ormeau européen résulte de sa capacité à perturber les défenses immunitaires de l'animal. En opposition à cette observation, *V. harveyi* LMG 7890, bactérie non létale pour *H. tuberculata*, n'engendre aucune inhibition de la voie des MAP kinases (Travers *et al.*, 2009b). Ainsi, la mise en contact de cette bactérie avec les hémocytes présents dans les branchies et hémolymphe aboutit à sa phagocytose (Travers *et al.*, 2009b ; Pichon *et al.*, 2013). Néanmoins, même si *V. harveyi* LMG 7890 est non pathogène pour *H. tuberculata*, nous ne savons pas à ce jour si cette bactérie est capable de coloniser ou non l'ormeau européen.

Dans ce second chapitre, nous avons essayé de déterminer les raisons pour lesquelles *V. harveyi* ORM4 est mortelle pour l'ormeau européen alors que *V. harveyi* LMG 7890 ne l'est pas, en se concentrant sur les premières étapes de l'infection. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié la colonisation des branchies et de l'hémolymphe de *H. tuberculata* par ces deux bactéries et étudié la réponse immunitaire des hémocytes présents dans l'hémolymphe. En parallèle, et grâce à l'obtention de mutants de *V. harveyi* ORM4 non létaux pour l'ormeau européen, une analyse plus fine du rôle du QS et du T3SS dans la virulence de la bactérie, et notamment l'aptitude des mutants à coloniser les branchies et l'hémolymphe de l'animal, a été entreprise.

14. ÉTUDE DE LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPÉEN PAR UNE SOUCHE PATHOGÈNE ET UNE SOUCHE NON-PATHOGÈNE DE *V. HARVEYI*

Au cours de l'été 2021, des ormeaux européens matures ont été infectés par balnéation à 20°C par *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 transformés par le plasmide pFD085 leur conférant une résistance au triméthoprime (Trim). Des animaux non infectés représentent la condition contrôle. Les branchies ont été échantillonnées 24 et 48 h post-infection, temps auxquels la présence de *V. harveyi* ORM4 a été démontrée dans ces tissus (Cardinaud *et al.*, 2014b). Un dénombrement bactérien sur gélose de LBS + Trim a été effectué à partir de l'hémolymphe et de branchies broyées. Ces échantillons ont aussi été utilisés dans le but de quantifier les souches de *V. harveyi* utilisées, dans les branchies et hémolymphe par une qPCR TaqMan, en ciblant les gènes *toxR* et *parA* (Schikorski *et al.*, 2013), mais aucune amplification n'a été détectée, probablement parce que les ARN bactériens étaient très minoritaires par rapport aux ARN des ormeaux. Après l'obtention des résultats de dénombrements, une seconde infection a été effectuée dans les mêmes conditions l'été suivant. Cette fois-ci seule l'hémolymphe a été prélevée aux temps 24 et 48 h post-infection dans le but d'étudier la réponse immunitaire de l'animal à l'infection par différentes souches de *V. harveyi*. Ces échantillons ont été utilisés pour dénombrer les bactéries sur gélose de LBS + Trim et étudier les paramètres hématocytaires par cytométrie en flux. En parallèle de ces expérimentations, un suivi de mortalité des ormeaux a été effectué. Les taux de survie des animaux étant similaires à ceux présentés dans le Chapitre 1, nous pouvons conclure que les résultats présentés par la suite sont cohérents avec le pouvoir pathogène ou non de la bactérie étudiée.

14.1. COLONISATION DES BRANCHIES

Les capacités de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 transformées par pFD085 à coloniser les branchies ont été évaluées par dénombrements des bactéries résistantes au triméthoprimine (résistance portée par pFD085). Aucune bactérie n'a été dénombrée chez les animaux non infectés (Figure 25C), montrant que la résistance au triméthoprimine est un mode de sélection approprié. Par contre, après 24 heures d'infection, les deux souches de *V. harveyi* sont retrouvées dans les tissus branchiaux, mais *V. harveyi* ORM4 y est 18 fois plus abondante que *V. harveyi* LMG 7890 (Figure 25A et C). Après 48 heures d'infection, *V. harveyi* ORM4 est 2,5 moins abondante dans les branchies d'ormeaux européens qu'après 24 heures (Figure 25B et C). La concentration en *V. harveyi* LMG 7890 quant à elle diminue significativement entre 24 et 48 h post-infection, jusqu'à devenir nulle.

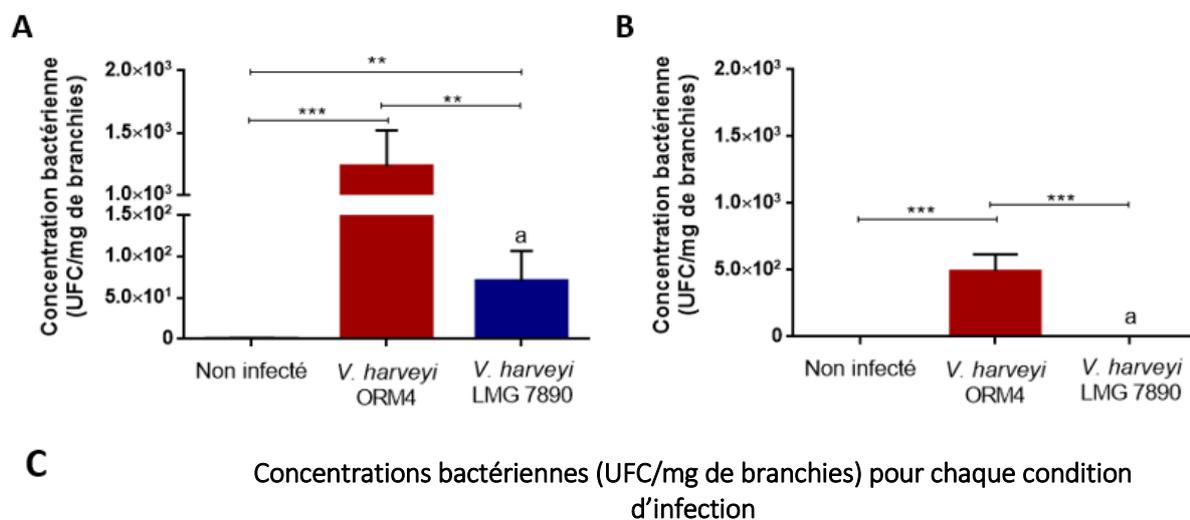


Figure 25 : Concentrations bactériennes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 transformées avec le pFD085 dans les branchies d'*H. tuberculata* après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 10 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une ou plusieurs étoiles (* p -value < 0,05 ; ** p -value < 0,01 ; *** p -value < 0,001) et les différences significatives entre les deux temps pour une même souche sont représentées par un a (p -value < 0,05).

14.2. COLONISATION DE L'HÉMOLYMPHE

Comme présenté pour la colonisation des branchies, la présence ou non des deux souches dans l'hémolymphe a été évaluée par dénombrement. De même qu'à partir des échantillons de branchies, aucune bactérie résistante au triméthoprimine n'a été détectée dans l'hémolymphe prélevée à partir d'animaux non infectés (Figure 26C). À chaque temps de prélèvement, les bactéries ont pu être détectées dans ce fluide provenant d'animaux infectés. Néanmoins, la concentration de *V. harveyi* ORM4 est significativement supérieure à celle de *V. harveyi* LMG 7890. En effet, 20 fois plus de *V. harveyi* pathogènes sont détectées après 24 d'infection en comparaison à la souche non pathogène (Figure 26A et C).

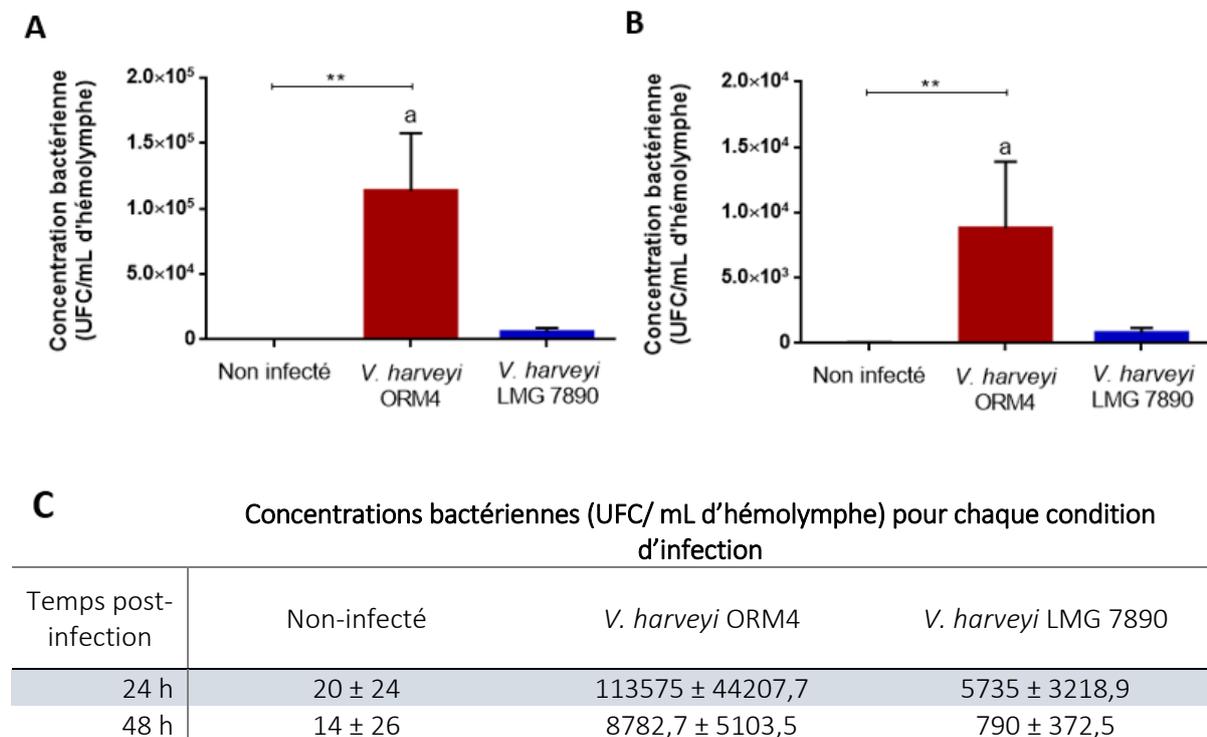


Figure 26 : Concentrations bactériennes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 transformées avec pFD085 dans l'hémolymphe d'*H. tuberculata*, après 24 h(A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Notez la différence d'échelle entre les différents panels. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 5 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par des étoiles (** p -value $<0,01$) et les différences significatives entre deux temps pour une même souche sont représentées par la lettre « a » (p -value $<0,05$).

Même si la concentration de *V. harveyi* ORM4 diminue d'un facteur 13 entre les deux temps de prélèvement, elle reste 11 fois plus importante que celle de *V. harveyi* LMG 7890 dans l'hémolymphe de l'ormeau européen (Figure 26B et C).

14.3. EFFET DE *V. HARVEYI* SUR LES PARAMÈTRES HÉMOCYTAIRES

Bien qu'elles ne présentent pas la même capacité à induire des mortalités chez les populations d'ormeaux européens (Chapitre 1), *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 sont toutes deux retrouvées dans l'hémolymphe aux premiers jours de l'infection (Figure 26). Afin de déterminer la réponse immunitaire de l'ormeau européen en présence de ces deux souches de *V. harveyi*, les échantillons d'hémolymphe, parallèlement aux dénombrements bactériens, ont été analysés par cytométrie en flux. Cette expérimentation a permis de mesurer la mortalité hémocytaire, la capacité des hémocytes à produire des ROS, ainsi qu'à phagocytter des billes fluorescentes. *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890 retrouvées dans l'hémolymphe ne provoquent pas de différences de mortalité hémocytaire, ni un changement dans la capacité des hémocytes à phagocytter des billes fluorescentes, en comparaison à une condition non infectée (Figure 27A et B).

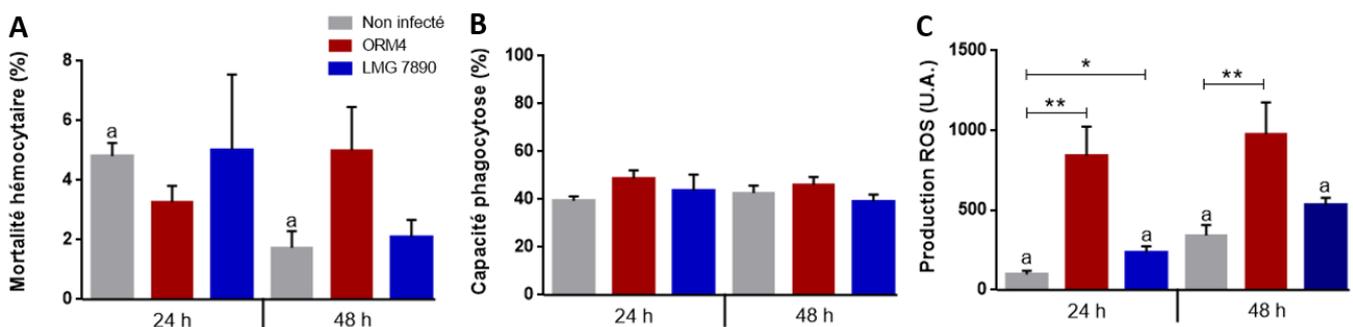


Figure 27 : Variations des paramètres hémocytaires mesurés en cytométrie en flux après 24 et 48 h d'infection de *H. tuberculata* avec deux souches de *V. harveyi*. La mortalité hémocytaire (A), la capacité de phagocytose (B) et la production de ROS (C) par les hémocytes ont été mesurées par cytométrie en flux à partir de l'hémolymphe prélevé chez 5 animaux pour chaque condition d'infection. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une ou plusieurs étoiles (* p -value < 0,05 ; ** p -value < 0,01) et les différences significatives entre les deux temps pour une même condition d'infection sont représentées par la lettre « a » (p -value < 0,05).

Néanmoins, la présence de ces bactéries induit une réponse hémostatique, qui se traduit par une production de ROS supérieure à ce qui est enregistrée dans une condition où les ormeaux ne sont pas infectés (Figure 27C). En effet, en présence de *V. harveyi* ORM4, la production de ROS par les hémocytes est respectivement 10 à 3 fois plus importante aux temps 24 et 48 h que par des hémocytes provenant d'animaux sains (Figure 27C). En parallèle, la production de ROS par les hémocytes mis en contact avec la souche non pathogène est 2,5 fois plus importante au temps 24 h, mais redevient similaire à ce qui est enregistré dans la condition non infectée à 48 h (Figure 27C).

Grâce à l'utilisation de deux souches de *V. harveyi*, nous avons pu observer une colonisation de l'ormeau européen différente selon la pathogénicité de la souche. La souche non pathogène *V. harveyi* LMG 7890 est retrouvée dans les branchies et l'hémolymphe de l'animal après 24 h à une concentration moins importante que la souche pathogène. La souche non pathogène est éliminée en 24 h des branchies, mais reste détectable dans l'hémolymphe après 48 h d'infection. *V. harveyi* ORM4 quant à elle, colonise les branchies et s'y maintient tout en passant dans l'hémolymphe, où elle induit une production de ROS par les hémocytes. Précédemment, nous avons démontré que le QS et le T3SS sont essentiels à *V. harveyi* ORM4 pour induire des mortalités chez une population de *H. tuberculata*. L'implication de ces systèmes dans la capacité de *V. harveyi* ORM4 à coloniser l'ormeau européen a été déterminée au cours d'infections réalisées en parallèle de celles présentées dans ce paragraphe.

15. IMPLICATION DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION TYPE III ET DU QUORUM SENSING DANS LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPÉEN PAR *V. HARVEYI* ORM4

Nous avons montré précédemment (Chapitre 1) que les délétions des gènes *exsA* et *luxO* ont eu pour conséquence de supprimer la capacité de *V. harveyi* ORM4 à induire des mortalités chez *H. tuberculata*. Cependant, les rôles de la voie de régulation du QS, dont LuxO est une protéine clé, et du T3SS, dont la synthèse est contrôlée par ExsA, dans le cycle infectieux de la bactérie restent encore indéfinis. C'est pourquoi la même étude a été effectuée avec ces deux souches mutantes de *V. harveyi* ORM4 transformées par pFD085, en parallèle de ce qui a été fait avec la souche sauvage et *V. harveyi* LMG 7890.

15.1. IMPLICATION DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION TYPE III DANS LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPÉEN

15.1.1. COLONISATION DES BRANCHIES

L'étude de l'impact de la délétion du gène *exsA*, codant le régulateur principal du T3SS, sur la capacité de *V. harveyi* ORM4 à coloniser les branchies a été faite par dénombrements bactériens à partir de tissus branchiaux d'ormeaux infectés par *V. harveyi* ORM4 Δ *exsA*. Bien que non mortel pour l'animal, ce mutant est retrouvé dans les branchies de l'animal à 24 et 48 h post-infection (Figure 28). Néanmoins, bien que le nombre d'UFC de *V. harveyi* ORM4 Δ *exsA* par mg de branchies reste stable entre les deux temps de prélèvement, il est respectivement 6 et 5 fois moins important que celui de la souche parentale après 24 et 48 h d'infection (Figure 28).

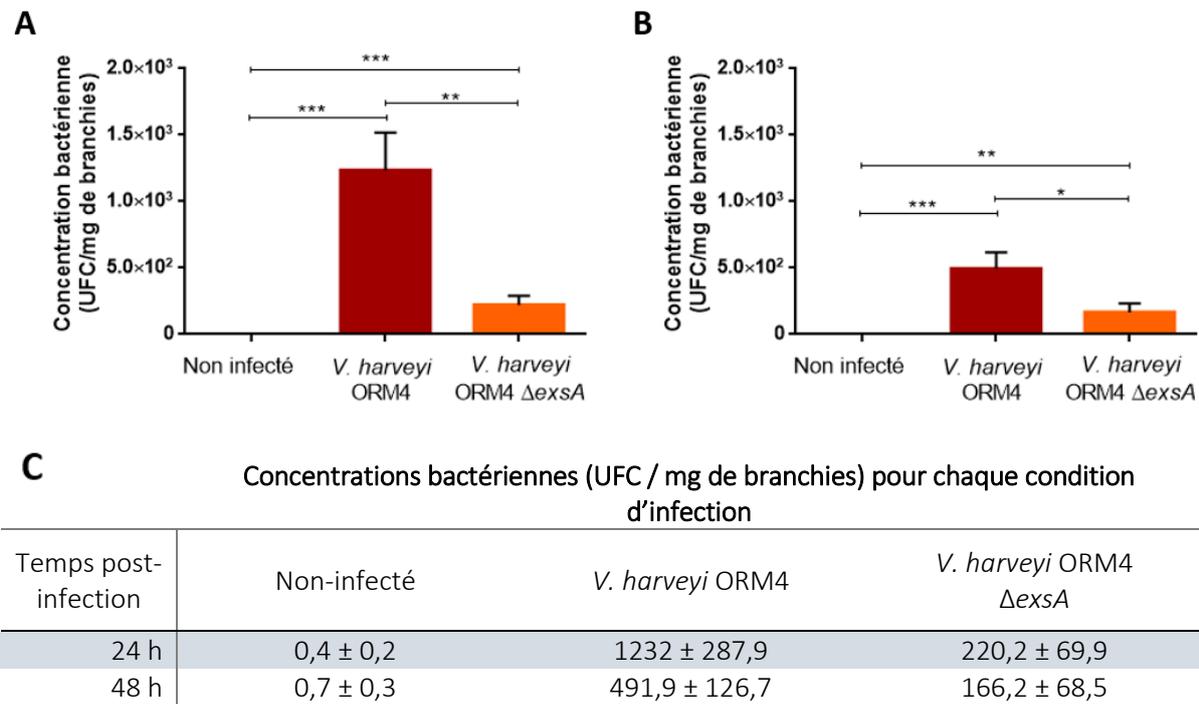


Figure 28: Concentrations bactériennes des souches *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 Δ exsA transformées par pFD085 dans les branchies d'*H. tuberculata*, après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 10 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une étoile (* p -value <0,05 ; ** p -value <0,01 ; *** p -value <0,001).

15.1.2. COLONISATION DE L'HÉMOlymphe

Les dénombrements bactériens réalisés à partir d'hémolymphe d'ormeaux européens infectés ont permis de montrer la présence de *V. harveyi* ORM4 Δ exsA dans ce fluide jusqu'à 48 heures après infection (Figure 29B). Alors que la concentration en *V. harveyi* ORM4 diminue significativement d'un facteur 13 entre les temps 24 h et 48 h, celle de *V. harveyi* ORM4 Δ exsA ne diminue que d'un facteur 3 sans que cette diminution ne soit significative (Figure 29). Après 24 h d'infection, *V. harveyi* ORM4 est plus abondante que le mutant du T3SS, mais l'inverse est observé à 48 h, sans que les différences d'abondance entre ces bactéries ne soient significatives.

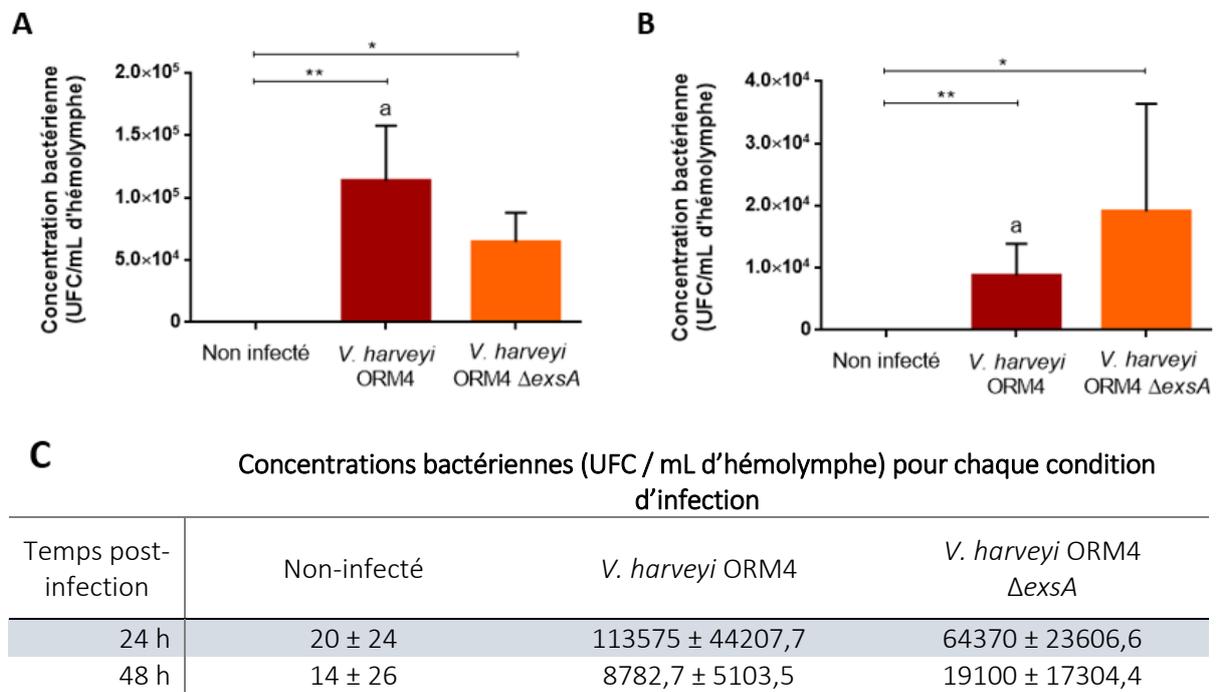


Figure 29 : Concentrations bactériennes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 Δ exsA transformées par pFD085 dans l'hémolymphe d'*H. tuberculata* après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Notez la différence d'échelle entre les différents panels. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 5 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infections sont représentées à l'aide (* p -value <0.05, ** p -value <0.01) et les différences significatives entre deux temps pour une même condition d'infection sont représentés par la lettre « a » (p -value <0.05).

15.2. INFLUENCE DU SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE III SUR LA RÉPONSE HÉMOCYTAIRE

Comme nous l'avons observé précédemment avec *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* LMG 7890, la présence du mutant du T3SS dans l'hémolymphe n'induit pas d'effet sur la mortalité hémocytaire et la capacité des hémocytes à phagocyter les billes fluorescentes (Figure 30A et B). Similairement à ce qui a été enregistré avec les deux souches de *V. harveyi*, la présence de *V. harveyi* ORM4 Δ exsA dans l'hémolymphe (Figure 29) engendre une surproduction de ROS de la part des hémocytes aux temps 24 et 48 h (Figure 30C).

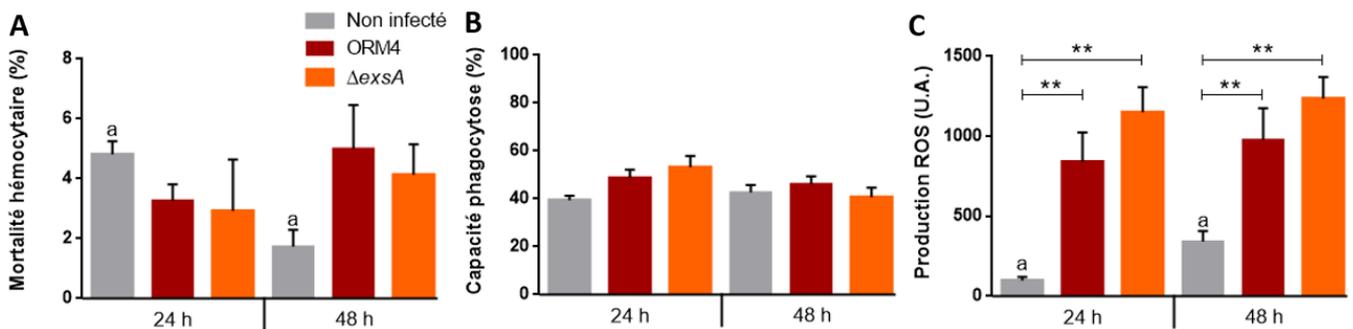


Figure 30 : Variations des paramètres cellulaires des hémocytes mesurés à partir d'hémolymphe d'ormeaux européens après 24 et 48 h d'infection par balnéations avec *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* $\Delta exsA$ transformées par pFD085. La mortalité hémocytaire (A), la capacité de phagocytose (B) et la production de ROS (C) par les hémocytes ont été mesurées par cytométrie en flux à partir de l'hémolymphe prélevé chez 5 animaux pour chaque condition d'infection. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infections sont représentées à l'aide (** p -value $< 0,01$; *** p -value $< 0,001$) et les différences significatives entre les deux temps pour une même condition d'infection sont représentés par la lettre « a » (p -value $< 0,05$).

15.3. IMPLICATION DU QUORUM SENSING DANS LA COLONISATION DE L'ORMEAU EUROPÉEN

En suivant les mêmes conditions d'expérimentation, l'étude de l'impact de la délétion du gène *luxO*, codant une protéine clé de la voie de signalisation du quorum sensing, sur la colonisation d'*H. tuberculata* a été effectuée. Ce mutant, comme *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$, présente un défaut de virulence envers l'ormeau européen. Plusieurs phénotypes (motilité, production du T3SS, formation de biofilm) étant impactés chez ce mutant (Morot *et al.*, 2021), il est intéressant d'étudier sa capacité à coloniser ou non l'animal au cours des premiers jours d'infection.

15.3.1. COLONISATION DES BRANCHIES

Comme décrit précédemment, la quantification bactérienne sur les branchies a été effectuée par dénombrements bactériens sur milieu sélectif. *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est détectée dans les branchies jusqu'à 48 heures post-infection (Figure 31B). Bien que détecté après 48 h, la concentration du mutant diminue drastiquement entre les deux temps de prélèvement, passant d'environ 400 UFC par millilitres d'hémolymphe à une quinzaine d'UFC/mL (Figure 31C).

Malgré cette diminution d'un facteur 26, la concentration en *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ reste statistiquement supérieure à la concentration bactérienne détectée chez des animaux non infectés. Aux deux temps, la concentration en *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est significativement inférieure (3 et 36 fois, respectivement à 24 et 48 h) à la concentration en *V. harveyi* ORM4 (Figure 31).

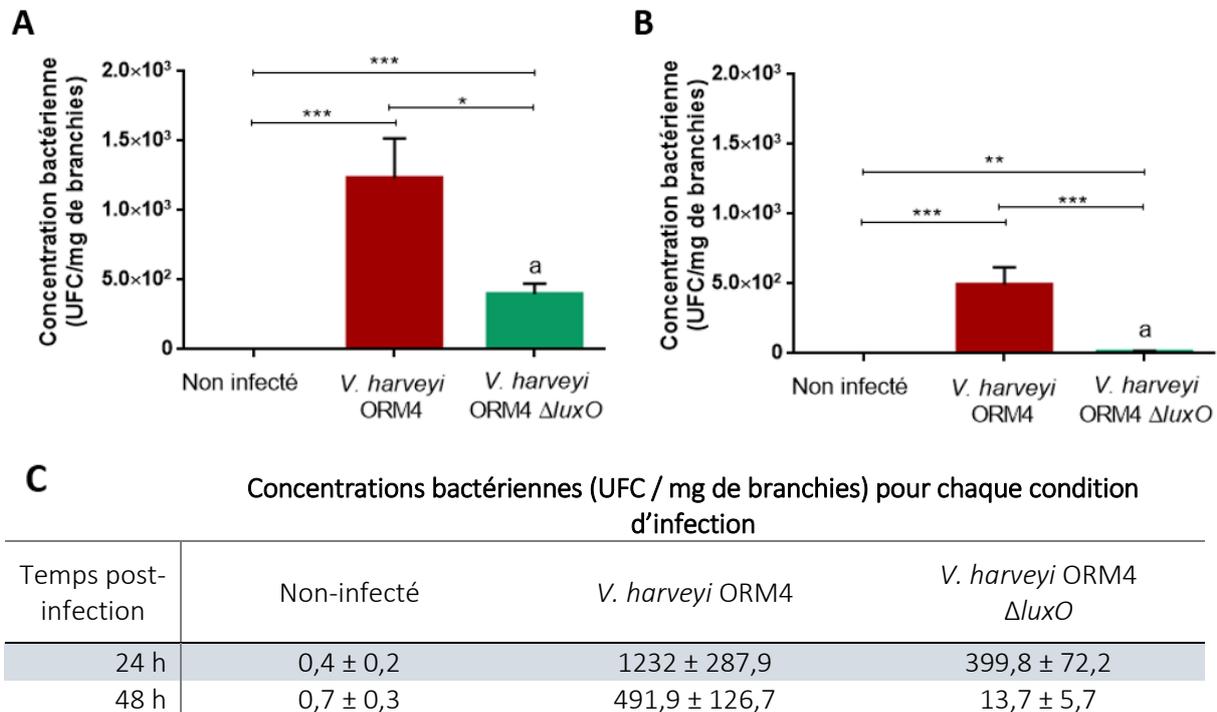


Figure 31 : Concentrations bactériennes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* $\Delta luxO$ transformées par pFD085 dans les branchies d'*H. tuberculata*, après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 10 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une étoile (* p -value <0,05 ; ** p -value <0,01 ; *** p -value <0,001) et les différences significatives entre deux temps pour une même condition d'infection sont représentées par la lettre « a » (p -value <0,05).

15.3.2. COLONISATION DE L'HÉMOLYMPHE

Le mutant du quorum sensing est détecté dans l'hémolymphe d'*H. tuberculata* après 24 heures d'infection (Figure 32). À ce temps d'infection, la concentration de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est 4 fois moins importante que celle de la souche parentale (Figure 32C). Après 48 h d'infection, la quantité d'UFC/mL de la souche mutante mesurée dans l'hémolymphe est

divisée par un facteur 15, atteignant une concentration non significativement différente de la concentration en bactéries résistantes au triméthoprimé dans l'hémolymphe d'animaux non infectés (p -value = 0,2) (Figure 32B et C).

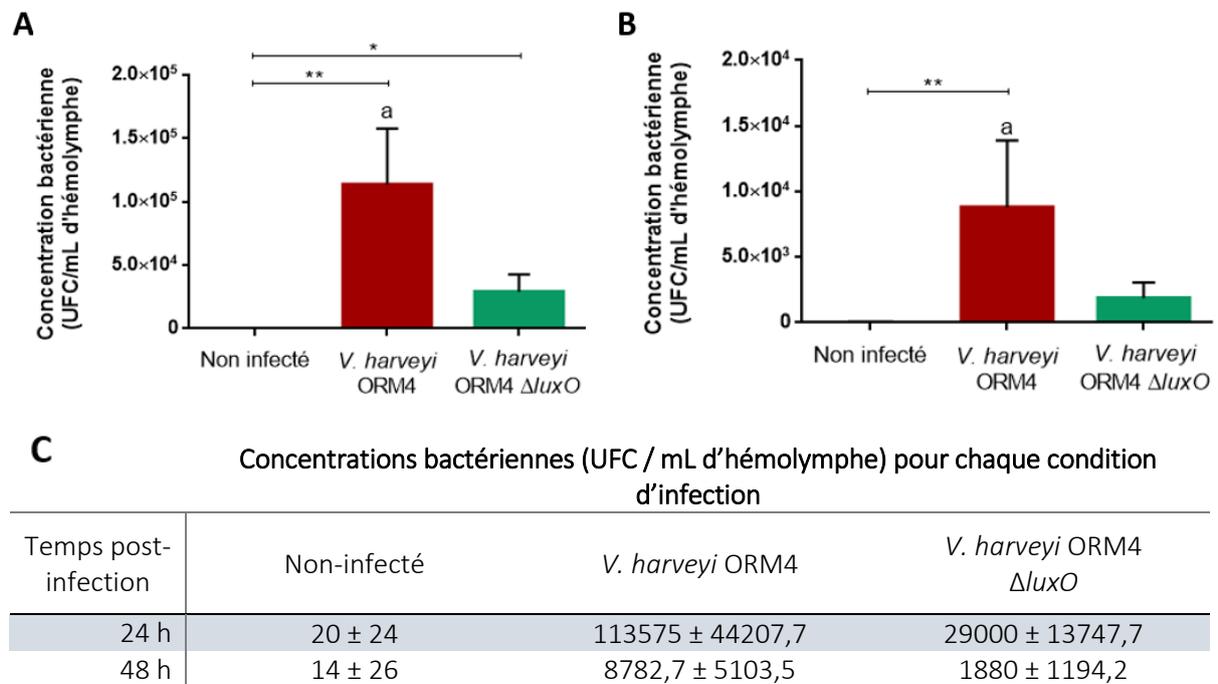


Figure 32 : Concentrations bactériennes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ transformées par pFD085 dans l'hémolymphe d'*H. tuberculata* après 24 h (A) et 48 h (B) d'infection par balnéation. Notez la différence d'échelle entre les différents panels. Les moyennes (\pm SE) des concentrations bactériennes pour chaque temps de prélèvement sont répertoriées dans le tableau (C). Les données représentent la moyenne des mesures obtenues à partir de 5 animaux. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une étoile (* p -value <0,05 ; ** p -value <0,01) et les différences significatives entre deux temps pour une même condition d'infection sont représentées par la lettre « a » (p -value <0,05).

15.4. INFLUENCE DU QUORUM SENSING SUR LA RÉPONSE HÉMOCYTAIRE

Après 48 h d'infection, la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, non létale pour l'ormeau européen, est absente de l'hémolymphe, bien qu'elle ait été détectée à 24 h post-infection (Figure 32B). Comme décrit pour les autres souches de *V. harveyi* utilisées au cours de cette étude, les paramètres hémoctaires ont été mesurés au cours de l'infection par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$.

De même que pour les autres souches, le mutant *luxO* n'engendre ni mortalité hémocytaire ni une modulation de la capacité des cellules à phagocyter des billes fluorescentes (Figure 33A et B). Cependant et en corrélation à sa présence dans l'hémolymphe, une production de ROS est enregistrée après 24 heures d'infection. Le niveau de production est alors significativement supérieur à celui des hémocytes d'ormeaux non infectés, et inférieur (différence non significative) à celui d'hémocytes d'animaux infectés par la souche sauvage. Au bout de 48 heures, lorsque la bactérie est absente de ce fluide, la production de ROS n'est plus significativement différente de celle des hémocytes d'animaux non infectés (p -value = 0,0625), bien que cette production reste proche de celle des hémocytes d'animaux infectés par la souche parentale (p -value = 0,8413) (Figure 33C). De manière équivalente à ce que nous avons précédemment enregistré avec les deux souches de *V. harveyi* et le mutant Δ *exsA*, la forte concentration de *V. harveyi* ORM4 Δ *luxO* dans l'hémolymphe après 24 h de mise en contact engendre une production de ROS. Néanmoins la diminution en UCF/mL du mutant Δ *luxO* observée entre 24 et 48 h (Figure 32) est associée à une production de ROS égale à ce qui est enregistré chez des animaux sains (p -value = 0,063) (Figure 33C).

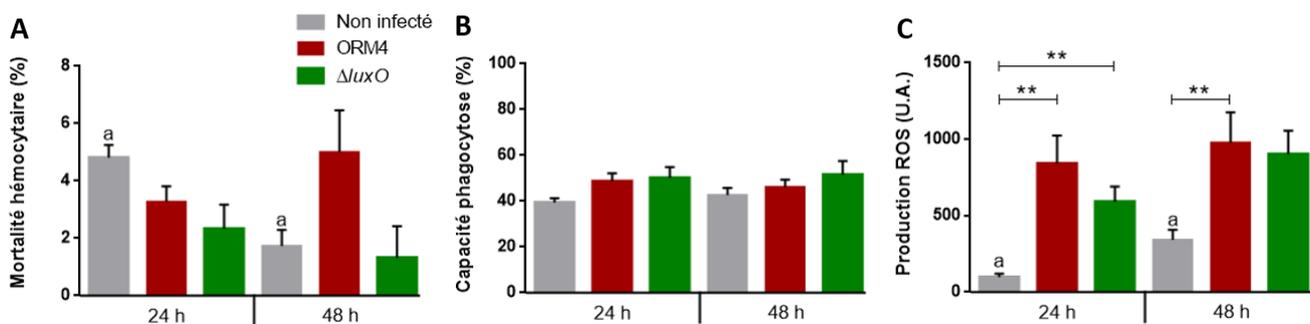


Figure 33 : Fluctuations des paramètres cellulaires des hémocytes mesurés à partir d'hémolymphe d'ormeaux européens après de 24 h et 48 h d'infection par baignades avec *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 Δ *luxO* transformées par pFD085. La mortalité hémocytaire (A), la capacité de phagocytose (B) et la production de ROS (C) par les hémocytes ont été mesurées par cytométrie en flux à partir de l'hémolymphe prélevé chez 5 animaux pour chaque condition d'infection. Les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique de Wilcoxon. Les différences significatives entre les conditions d'infection sont représentées par une étoile (p -value <0,01 ; *** p -value <0,001) et les différences significatives entre les deux temps pour une même condition d'infection sont représentées par la lettre « a » (p -value <0,05).**

16. CONCLUSION

Cette étude a eu pour but de comprendre la dynamique de colonisation de l'ormeau européen par deux souches de *V. harveyi*, ainsi que les rôles du quorum sensing et du T3SS dans la colonisation de l'animal par *V. harveyi* ORM4.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de démontrer que la souche non pathogène de l'ormeau européen, *V. harveyi* LMG 7890, ne se maintient pas dans les branchies de l'animal puisqu'elle n'est plus détectable après 48 h d'infection (Figure 25). Au sein des tissus branchiaux des mollusques, des cellules hémocytaires ont été retrouvées, indiquant qu'une activité immunitaire est présente (de Oliveira David *et al.*, 2008 ; Manganaro *et al.*, 2012 ; Pichon *et al.*, 2013). Chez la crevette *Marsupenaeus japonica*, l'activité antimicrobienne et la production de lysozyme est fortement élevée dans les branchies (Kaizu *et al.*, 2011). Chez *H. tuberculata*, des expérimentations *in vitro* ont montré qu'en présence de *V. harveyi* LMG 7890, une réponse immunitaire est enregistrée de la part des hémocytes présents dans ces tissus (Pichon *et al.*, 2013). Les observations faites au cours de notre expérimentation suggèrent donc que *V. harveyi* LMG 7890 est éliminée des branchies par les cellules hémocytaires entre 24 et 48 h d'infection. Parallèlement à ces observations, nous avons pu montrer que *V. harveyi* LMG 7890 est détectable dans l'hémolymphe de *H. tuberculata* après 24 et 48 h d'infection (Figure 26). Bien qu'en faible concentration, la présence de cette bactérie non pathogène engendre une production de ROS dans ce fluide (Figure 27C). Néanmoins, contrairement à ce qui a été observé suite à des expérimentations *in vitro* (Travers *et al.*, 2009b), aucune augmentation du taux de phagocytose n'a été mesurée dans l'hémolymphe après infection *in vivo* avec *V. harveyi* LMG 7890 (Figure 27B). Nos résultats suggèrent qu'une faible concentration de cette bactérie suffit à induire une production de ROS, mais reste insuffisante pour induire une phagocytose de la part des hémocytes.

D'autre part, nous avons montré que *V. harveyi* ORM4, contrairement à la souche non pathogène de l'ormeau européen, est en capacité de se maintenir au niveau des branchies (Figure 25). Les résultats de dénombrements obtenus à partir des expérimentations d'infections effectuées à l'aide des mutants, suggèrent que le T3SS tout comme le QS sont nécessaires à la colonisation des branchies de l'animal (Figure 28 et Figure 31). *V. harveyi* ORM4 Δ *exxA* présente un défaut dans la production du T3SS, ce qui provoque une perte de virulence envers l'ormeau européen (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021). Nous montrons ici que ce système est impliqué dans la colonisation des branchies par *V. harveyi* ORM4. Le T3SS de *V. harveyi* ORM4 étant similaire au T3SS1 de *V. parahaemolyticus*, il pourrait être impliqué dans la capacité de *V. harveyi* ORM4 à induire des mortalités auprès des cellules branchiales de l'ormeau européen (Pichon *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2019). En parallèle, la présence du mutant *luxO* sur les branchies en concentration significativement plus faible que celle de *V. harveyi* ORM4, témoigne de l'implication du QS dans la colonisation des branchies (Figure 31). Chez cette souche, plusieurs phénotypes sont impactés, dont la motilité (Morot *et al.*, 2021). Une souche de *V. parahaemolyticus* présentant une production du flagelle polaire déstabilisée et ainsi une motilité diminuée a montré un défaut de persistance au sein de l'huître creuse (Aagesen *et al.*, 2013). Bien que nos résultats d'infection avec *V. harveyi* ORM4 Δ *flaK* démontrent que la synthèse du flagelle polaire ne serait pas impliquée dans la mortalité d'ormeaux européens par *V. harveyi* ORM4 (Chapitre 1), il n'est pas exclu que ce dernier soit associé à la colonisation des branchies. Précédemment, nous avons aussi observé que *V. harveyi* ORM4 Δ *luxO* ne présente aucune formation de biofilm en microplaques de polystyrène (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021). Chez les bactéries appartenant au genre *Vibrio*, aucune étude n'a établi de lien entre ce mode de vie et leur pouvoir infectieux. Néanmoins, certains travaux ont montré que des gènes associés à la virulence de ces bactéries sont sur-exprimés au cours de la formation de biofilms (Rodrigues *et al.*, 2018 ; Gallego-Hernandez *et al.*, 2020). De plus, il

a été montré chez *V. cholerae* que la production d'exopolysaccharides nécessaires à la formation de biofilm sont aussi associés à la colonisation d'intestin de souris (Fong *et al.*, 2010). Ainsi, les absences de flagelle polaire et de formation de biofilm observées chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ pourraient être corrélées à la diminution de capacité de ce mutant à coloniser les branchies de *H. tuberculata* (Figure 28 et Figure 31).

En parallèle, nous avons aussi évalué l'impact du T3SS et du QS dans la colonisation de l'hémolymphe par *V. harveyi* ORM4, ainsi que leur rôle dans la modulation de la réponse immunitaire. Ainsi, nous avons montré que seuls *V. harveyi* ORM4 et le mutant du T3SS sont détectés dans l'hémolymphe après 48 h d'infection. Comme observé avec *V. harveyi* LMG 7890, la concentration de ces bactéries est insuffisante pour induire la mortalité hémocytaire ou provoquer une augmentation de phagocytose (Figure 27 et Figure 30). Néanmoins, la présence de ces deux bactéries est corrélée à une production de ROS dans l'hémolymphe qui est 10 fois supérieure à ce qui est enregistré chez des animaux non infectés (Figure 27C et Figure 30C). Par ailleurs, cette réponse immunitaire est insuffisante pour supprimer totalement *V. harveyi* ORM4 et le mutant $\Delta exsA$ de ce fluide en 48 h. Le T3SS étant essentiel à la mortalité des ormeaux infectés par *V. harveyi* ORM4 (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021), nos résultats suggèrent qu'il est nécessaire au maintien de la bactérie dans l'animal après les 48 premières heures d'infection. En parallèle, comme observé pour les autres souches de *V. harveyi*, la délétion du gène *luxO* n'engendre aucune mortalité hémocytaire ou phagocytose. Néanmoins à 24 h post-infection, *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ induit une surproduction de ROS dans l'hémolymphe (Figure 32A et Figure 33C). Contrairement à la souche parentale et au mutant du T3SS, aucune modification des paramètres hémocytaires n'est observée après 48 h d'infection par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (Figure 32A et Figure 33C). La prolifération de *V. harveyi* ORM4 dans l'hémolymphe est due à sa capacité à inhiber la réponse immunitaire et ainsi à ne pas être

reconnue (Travers *et al.*, 2009b ; Cardinaud *et al.*, 2014a), contrairement à la souche non pathogène *V. harveyi* LMG 7890 qui est éliminée. Précédemment, nous suggérions que chez *V. harveyi* ORM4, contrairement à *V. harveyi* LMG 7890, il y ait une reconnaissance de l'hôte médiée par le quorum sensing. En effet, une induction de production de biofilm en présence de sérum d'hémolymphe de l'hôte chez *V. harveyi* ORM4 avait été observée, alors que cette induction ne se produisait ni avec la souche non pathogène pour l'ormeau européen ni avec le mutant du quorum sensing (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021). Ici, les résultats obtenus avec *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ suggèrent que la capacité de *V. harveyi* ORM4 à se maintenir dans l'hémolymphe serait en partie modulée par son quorum sensing. De plus, il est possible que l'inhibition de la réponse immunitaire par *V. harveyi* ORM4 précédemment observée (Travers *et al.*, 2009b ; Cardinaud *et al.*, 2014a) soit modulée par ce système. En effet, dans un contexte d'infection humaine causée par *P. aeruginosa*, la liaison de l'interféron- γ de l'hôte à une protéine membranaire de la bactérie aboutit à l'expression de gènes sous la dépendance du quorum sensing de la bactérie (Wu *et al.*, 2005). En parallèle, les molécules signal produites par le quorum sensing au cours d'une infection peuvent moduler le système immunitaire. C'est ainsi que les auto-inducteurs produit par *V. vulnificus* inhibent la production de l'interféron- β (Lee *et al.*, 2018). Chez *P. aeruginosa*, les molécules signal ont quant à elles un effet inhibiteur sur la voie des NF- κ B (Kim *et al.*, 2010).

Pour conclure, nous avons montré au cours de cette étude que l'absence de virulence de *V. harveyi* LMG 7890 vis-à-vis de l'ormeau européen peut s'expliquer par une incapacité de la bactérie à persister dans l'animal. En opposition à ces observations, les résultats concernant la bactérie pathogène de l'ormeau européen *V. harveyi* ORM4 montrent que celle-ci est présente dans les différents compartiments étudiés et qu'une réponse immunitaire est mise en place dès les premiers jours d'infections, mais cette réponse est insuffisante pour éliminer cette souche.

En parallèle, l'étude démontre l'implication du T3SS dans la colonisation de l'animal, puisque la concentration de *V. harveyi* ORM4 Δ *exxA* sur les branchies reste inférieure à celle de la souche sauvage. Le quorum sensing est quant à lui essentiel à l'établissement de *V. harveyi* ORM4 dans l'hémolymphe. En effet, le mutant Δ *luxO* n'est quasiment plus détecté après 48 heures d'infection, ce qui s'accompagne d'une réponse immunitaire atténuée, similaire à celle enregistrée chez des animaux sains ou infectés par *V. harveyi* LMG 7890.

CHAPITRE III :

ÉTUDE DE LA FORMATION DE
BIOFILM CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

17. INTRODUCTION DE L'ÉTUDE

Les espèces bactériennes appartenant au genre *Vibrio*, ubiquitaires des environnements aquatiques, occupent une place importante parmi les pathogènes d'invertébrés marins. Ces habitats sont sujets aux fluctuations de paramètres physico-chimiques pouvant provoquer des stress auxquels la cellule bactérienne doit répondre pour se maintenir. L'une des stratégies adoptées pour se maintenir dans l'environnement est la conversion à un état viable mais non cultivable (VBNC, « viable but non-cultivable ») (Li *et al.*, 2014). Une autre stratégie adoptée est la formation de biofilms sur les surfaces. Chez les *Vibrio* ce mode de vie peut être associé à leur persistance dans les environnements en augmentant leur résistance au divers stress qu'ils peuvent subir (Hung *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2012). Il apparaît aussi que ce mode de vie est associé aux infections chroniques chez l'Homme causées par des espèces bactériennes n'appartenant pas au genre *Vibrio* (Vestby *et al.*, 2020). Chez les *Vibrio* le lien entre la formation de biofilm et les infections qu'elles causent n'est à ce jour pas encore établi. Néanmoins, il a été montré que ce mode de vie est nécessaire à l'initiation de relations symbiotiques entre la bactérie et son hôte. Ce processus a surtout été étudié chez *V. fischeri*. En effet, les souches incapables de former du biofilm ainsi que de synthétiser les polysaccharides codés par les gènes *syp* ne peuvent coloniser le calmar *E. scolopes* (Yip *et al.*, 2005, 2006). Dans un contexte de pathogénie, différentes études suggèrent que la colonisation de l'intestin de souris par *V. cholerae* est associée à la formation de biofilm. En effet, les gènes *vps* ou *rbm* sont nécessaires à la colonisation de l'intestin de souris (Fong *et al.*, 2010). En parallèle, l'analyse des selles de patients atteints du choléra ont révélé la présence de *V. cholerae* sous forme de cellules planctoniques et d'agrégats de type biofilm suggérant que ce mode de vie soit utilisé au cours de son cycle infectieux (Faruque *et al.*, 2006). Néanmoins, concernant les *Vibrio* pathogènes d'organismes marins, très peu d'études existent sur l'implication du biofilm dans

leur pathogénicité. L'étude de ce mode de vie s'est principalement axé sur l'identification des gènes et de la compréhension de leur implication dans la formation de biofilm (Yildiz and Visick, 2009; Fong *et al.*, 2010 ; Shibata *et al.*, 2012). De plus, la majorité des expérimentations de culture de biofilm menées chez ces bactéries ont été faites en microplaques de polystyrènes avec une quantification par coloration au cristal violet. Cette technique en plus d'être peu sensible, ne permet qu'une quantification globale du biofilm formé à un instant donné (Azeredo *et al.*, 2017). Plusieurs autres dispositifs ont été mis au point pour l'étude du biofilm. Parmi eux, le développement de techniques culturales en chambres à flux couplées à l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser (MCBL) permet une caractérisation plus complète (visualisation de la structure tridimensionnelle ; marquage des différents constituants des biofilms : bactéries, composants de la matrice ; quantification de différents paramètres : épaisseurs maximale et moyenne, biovolume), ainsi qu'un suivi de la formation du biofilm au cours du temps (Tolker-Nielsen and Sternberg, 2014).

C'est dans ce contexte que nous avons souhaité apporter une première description de la formation de biofilm chez une souche de *V. harveyi* pathogène d'organismes marins. Associé à la caractérisation de ce mode de vie chez *V. harveyi* ORM4, une étude transcriptomique a été entreprise dans le but d'étudier l'expression des gènes lorsque cette souche forme du biofilm en comparaison à ceux transcrit en condition planctonique. De plus, afin d'étudier l'implication du quorum sensing cette même étude transcriptomique a été faite chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$.

17.1. EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

La première étape de l'étude a été de déterminer les conditions permettant la production de biofilms. Les biofilms de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ ont été cultivés en milieu LBS. Concernant le temps d'incubation, après 48 heures, les biofilms étant devenus difficilement observables car trop épais, le choix s'est arrêté sur 24 heures de culture. Les

bactéries transformées avec pFD086 produisent la GFP et permettant ainsi une observation non destructive des biofilms en MCBL.

18. FORMATION DE BIOFILMS CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

Associé à la caractérisation de l'architecture du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4-GFP, la répartition des composants de la matrice a été explorée. Pour cela, les polysaccharides à liaisons β 1-3 et β 1-4, l'ADN extracellulaire et les protéines ont été marquées avec différents fluorochromes en fin de culture des biofilms. Les gènes identifiés comme étant impliqués dans la formation de biofilm seront présentés en parallèles des observations microscopiques.

18.1. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DU BIOFILM FORMÉ PAR *V. HARVEYI* ORM4

18.1.1. STRUCTURE

Le biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 a été observé après 24 heures de culture à 20°C en présence d'un flux constant de LBS (2,5 mL/h). Ce dernier apparaît non-uniforme sous la forme d'un dôme, ne recouvrant pas entièrement la surface sur laquelle il se développe (Figure 34A et B). En effet, nos observations montrent que les bactéries se concentrent au centre de la surface de la lamelle de verre, dans le sens de passage du flux de milieu. En s'éloignant de cette structure, les bactéries sont de moins en moins présentes, retrouvées en monocouche et jusqu'à devenir totalement absentes (Figure 34B). Cette formation a été retrouvée sur toute la longueur du canal, et observée au centre et à proximité des bords. Le biofilm formé atteint une épaisseur maximale de $27,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$, mais du fait de cette forme particulière, l'épaisseur moyenne est de $9,5 \pm 1 \mu\text{m}$, presque 3 fois inférieure à l'épaisseur maximale (Figure 34 C).

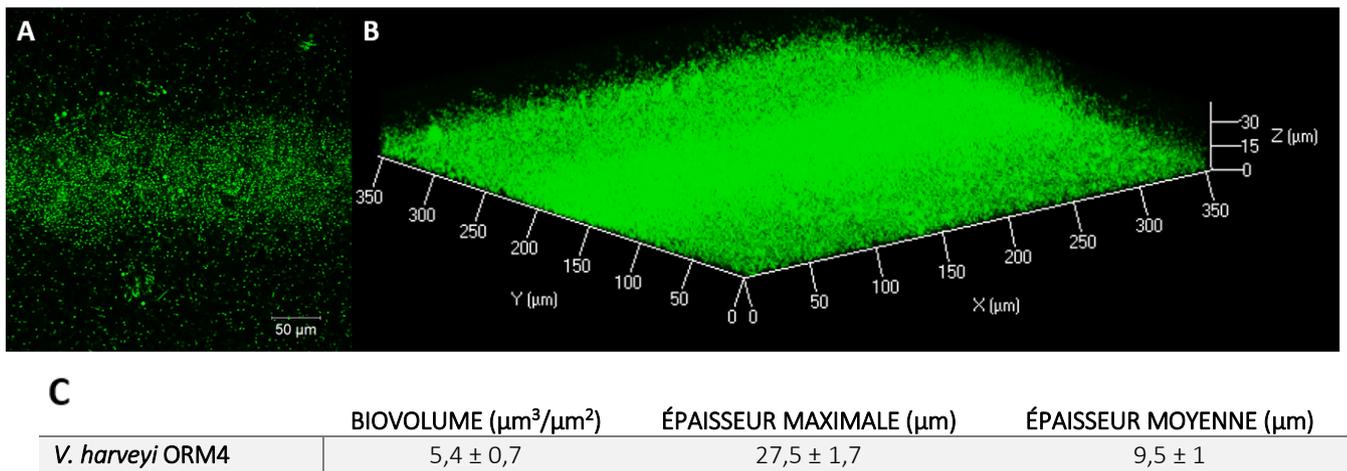


Figure 34 : Observation en microscopie confocale à balayage laser du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4-GFP après 24 h de culture à 20°C. 40 biofilms ont été observés et 3 clichés ont été pris par biofilm. Vue du dessus (A) et représentation tridimensionnelle (B). Les mesures de biovolume et des épaisseurs maximales et moyennes (C) ont été déterminées par une analyse des images avec le logiciel COMSTAT.

18.1.2. DISTRIBUTION DES COMPOSANTS DE LA MATRICE

Les bactéries formant du biofilm produisent une matrice extracellulaire apportant une stabilité à la structure tridimensionnelle et une cohésion entre les cellules. L'exploration de la matrice extracellulaire du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 a été possible par l'utilisation de fluorochromes spécifiques permettant la détection, la visualisation et la quantification de différents composants de la matrice. Nous nous sommes intéressés en particulier aux polysaccharides (avec liaisons β 1-3 et β 1-4), à l'ADN extracellulaire et aux protéines présentes dans la matrice. Des observations au MCBL ont permis de visualiser la répartition de ces différents composants. Ils sont répartis de manière homogène et principalement retrouvés à la base (premier tiers) du biofilm. (Figure 35). Les protéines et ADN extracellulaires sont localisés à la base du biofilm (Figure 35C et F), alors que les polysaccharides sont retrouvés sur l'ensemble de l'épaisseur du biofilm (Figure 35B). En effet les calculs de l'abondance relative de chaque composant, calculée par rapport au biovolume relatif, montrent que chaque composant représente entre 1/4 et 1/5 du biofilm total (Figure 35H).

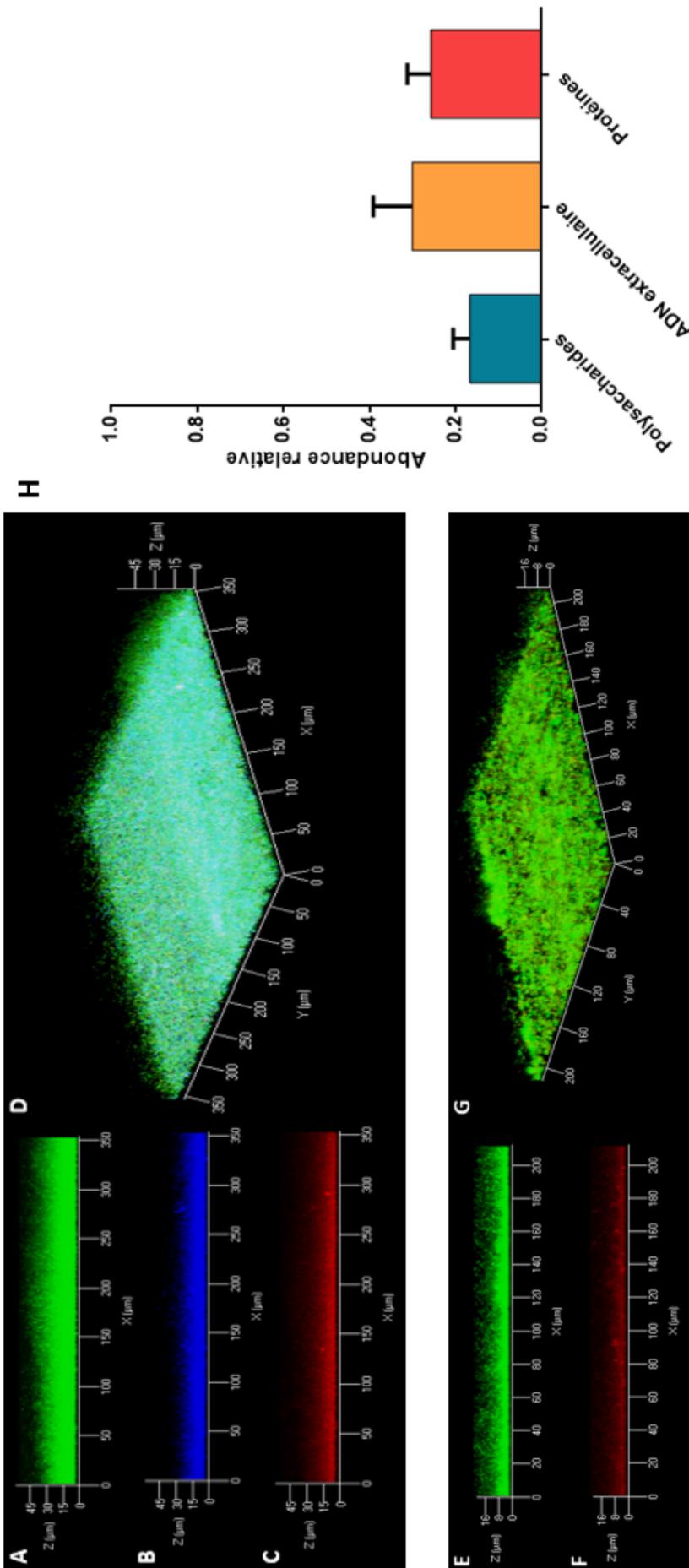


Figure 35 : Composants de la matrice d'un biofilm de 24 h de *V. harveyi* ORM4-GFP marqué au CalcoFluor White (polysaccharides β 1-3 et β 1-4), SyproRuby (protéines) ou DDAO (ADNe). Vues de côté des cellules exprimant la GFP (A et E) et des marquages des polysaccharides (B), protéines (C) et ADNe (F). Représentations tridimensionnelles de la superposition des différents marquages du biofilm (D et G). Abondances relatives des polysaccharides, ADN et protéines extracellulaires au sein du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 calculés par rapport au biovolume. Les barres représentent l'écart à la moyenne.

Ces résultats suggèrent que la structure particulière du biofilm de *V. harveyi* ORM4, ne soit pas due à une accumulation de matrice au niveau des dômes, mais soit formée par les bactéries elles-mêmes.

18.2. IDENTIFICATION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

Afin d'éliminer les cellules planctoniques ou détachées du biofilm et de ne conserver que les bactéries ayant formées du biofilm, le flux appliqué dans les chambres à flux a progressivement été augmenté de 2,5 mL/h à 25 mL/h et maintenu pendant 15 minutes. Par la suite, le biofilm a été décroché et récupéré des chambres à flux dans le but d'extraire les ARN totaux. En parallèle, nous avons fait le choix d'extraire les ARN de cellules planctoniques de *V. harveyi* ORM4 en début de phase stationnaire. En effet, nous estimons que le biofilm formé après 24 h de culture correspond à un biofilm mature et ainsi les bactéries retrouvées dans cette structure peuvent être assimilées à cette phase de croissance, permettant de ce fait la comparaison des gènes exprimés dans les deux conditions de culture par RNASeq. Les résultats de séquençage ayant été reçus seulement en septembre 2022, l'analyse s'est principalement portée sur l'identification des gènes pouvant être associés à la production de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. En outre, seuls les gènes possédant une p-value inférieure à 0,05 ont été sélectionnés et considérés comme différentiellement exprimés (DE) de manière significative. Les données de RPKM (reads per kilobase million) sont converties en z-score afin de faciliter la visualisation des résultats sous forme de heatmap. En parallèle, la sur- ou sous-expression de chaque gène exprimé lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm en comparaison à l'état planctonique, est rapportée en valeurs de fold-change (FC). De ce fait, un gène est sur-exprimé lorsque la bactérie produit du biofilm s'il possède un FC supérieur à 1 et sous-exprimé si cette valeur est inférieure à 1. Dans un premier temps, une analyse fonctionnelle a été réalisée en examinant la répartition des classes

fonctionnelles COG (Clusters of Orthologous Genes). Par ailleurs, une validation des résultats de RNASeq a été réalisée par une corrélation avec des données obtenues par RTqPCR.

18.2.1. OBSERVATION GLOBALE

La détermination des gènes DE dans la condition biofilm par rapport à la condition planctonique a été réalisée à l'aide du package R DESeq2 (Varet *et al.*, 2016). L'analyse des 12 millions de séquences obtenues pour chaque échantillon a permis de déterminer que 1565 gènes (33%) sont différentiellement exprimés, dont 868 (55 %) et 697 gènes (45 %) sont respectivement sous- et sur-exprimés lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm (p-value ajustée < 0,05). L'analyse fonctionnelle révèle que 36% des gènes DE ne sont pas assignés à une classe fonctionnelle ou présentent une fonction inconnue (catégories UC et S). La majorité des gènes DE affiliés, codent des protéines associées à la production et conversion d'énergie, ainsi qu'au métabolisme et transport des acides aminés, ions inorganiques et glucides (respectivement les classes C, E, P et G) (

Figure 36A).

Lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm, la majeure partie des gènes (au minimum 80%) codant pour des protéines associées au transport et métabolisme des coenzymes (classe H), à la traduction, biogénèse et structure des ribosomes (classe J) ainsi que ceux liés aux trafics intracellulaires, sécrétion et transport des vésicules (classe U) sont sur-exprimés. Au contraire, 82% des gènes intervenant dans les mécanismes de transduction de signaux (classe T) sont sous-exprimés (

Figure 36B).

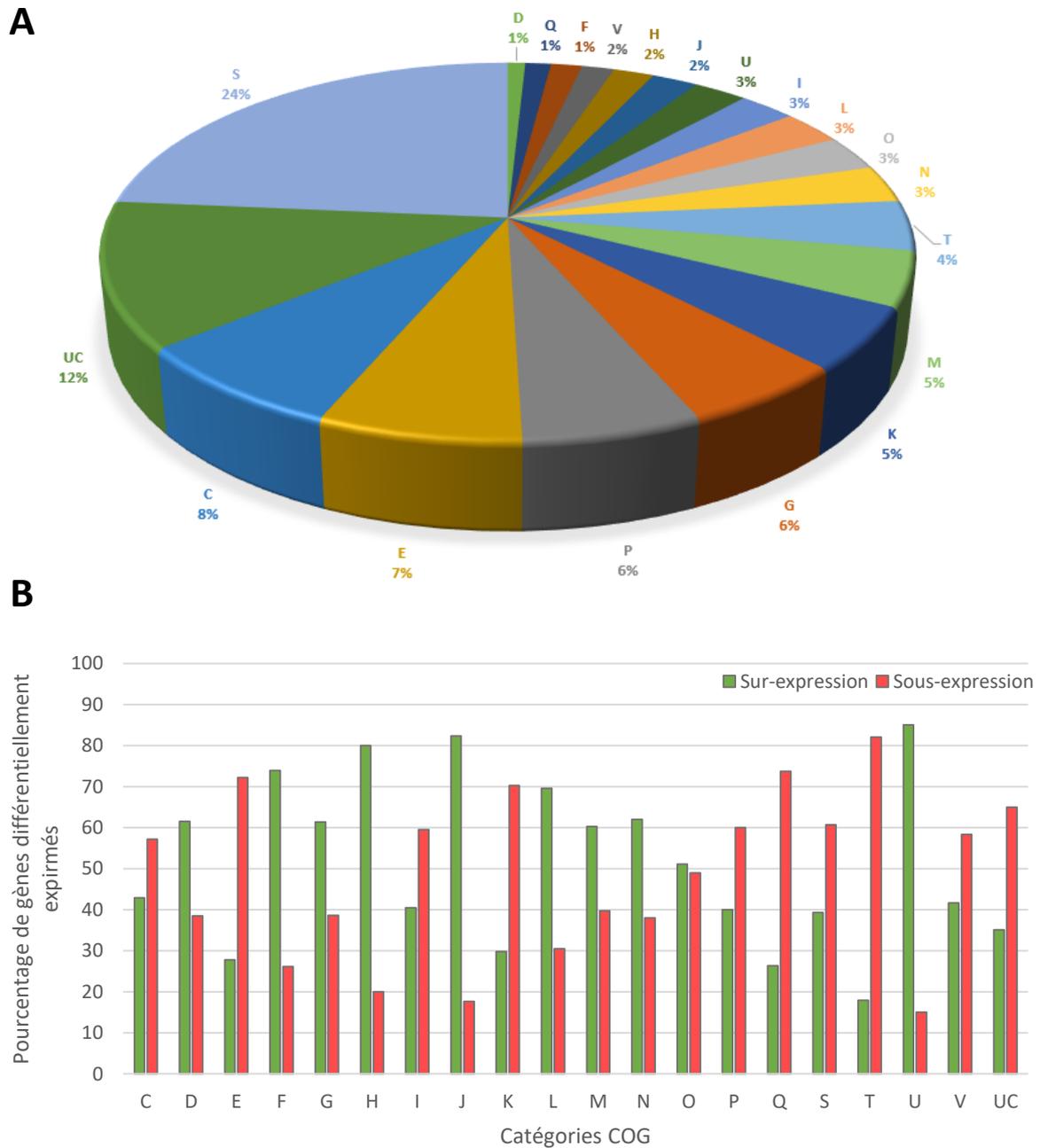


Figure 36 : Distribution des gènes différentiellement exprimés chez *V. harveyi* ORM4 en condition biofilm par classes fonctionnelles (COG) (A) et pourcentage de gènes sur- et sous-exprimés pour chaque classe COG (B) en condition biofilm comparé à la condition planctonique, utilisée comme référence. Catégories COG : C: Energy production and conversion. D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning. E: Amino acid transport and metabolism. F: Nucleotide transport and metabolism. G: Carbohydrate transport and metabolism. H: Coenzyme transport and metabolism. I: Lipid transport and metabolism. J: Translation, ribosomal structure and biogenesis. K: Transcription. L: Replication, recombination and repair. M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis. N: Cell motility. O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones. P: Inorganic ion transport and metabolism. Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism. R: General function prediction only. S:

Function unknown. T: Signal transduction mechanisms. U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. V: Defense mechanisms. UC: Unclassified.

18.2.2. GÈNES INTERVENANT DANS LA MOTILITÉ ET L'ATTACHEMENT

Sous forme planctonique les bactéries synthétisent les appendices filamenteux nécessaires à leur déplacement dans les fluides et à l'exploration des surfaces à coloniser. Au cours de l'attachement bactérien, considéré comme l'étape initiant la formation du biofilm, les cellules synthétisent divers appendices filamenteux, comme les flagelles ou les pili, dans le but de surmonter les forces répulsives et s'ancrer aux surfaces (Aagesen *et al.*, 2013 ; Frischkorn *et al.*, 2013 ; Berne *et al.*, 2018 ; Wang *et al.*, 2022) . Chez *V. harveyi* ORM4, les gènes associés à la motilité (classe COG N) représentent 3% des gènes différentiellement exprimés (Figure 36A) et 62 % d'entre eux sont sur-exprimés lorsque la bactérie forme du biofilm (Figure 36B). Ainsi, les gènes impliqués dans la synthèse des flagelles (polaire et latéraux), du P pilus et pili de type I et IV ont été recherchés dans le génome de *V. harveyi* ORM4 dans le but d'étudier leur expression lorsque la bactérie forme du biofilm.

L'analyse des transcriptomes de *V. harveyi* ORM4 dans chaque condition de culture, révèle que les gènes associés à la synthèse du flagelle polaire sont plus exprimés chez les cellules planctoniques en comparaison à celles ayant formé du biofilm pendant 24 h (Figure 37). En opposition à ces résultats, les gènes impliqués dans la synthèse des flagelles latéraux sont pour la majorité des échantillons sur-exprimés lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm (Figure 37) et présentent des valeurs de FC entre 2,4 et 17,8 lorsque les deux conditions de culture sont comparées (Annexe 1). Parallèlement à ces appendices filamenteux principalement associés au déplacement de la bactérie, nous avons recherché dans le génome de *V. harveyi* ORM4 ceux pouvant être associés à l'exploration et l'ancrage de la bactérie aux surfaces.

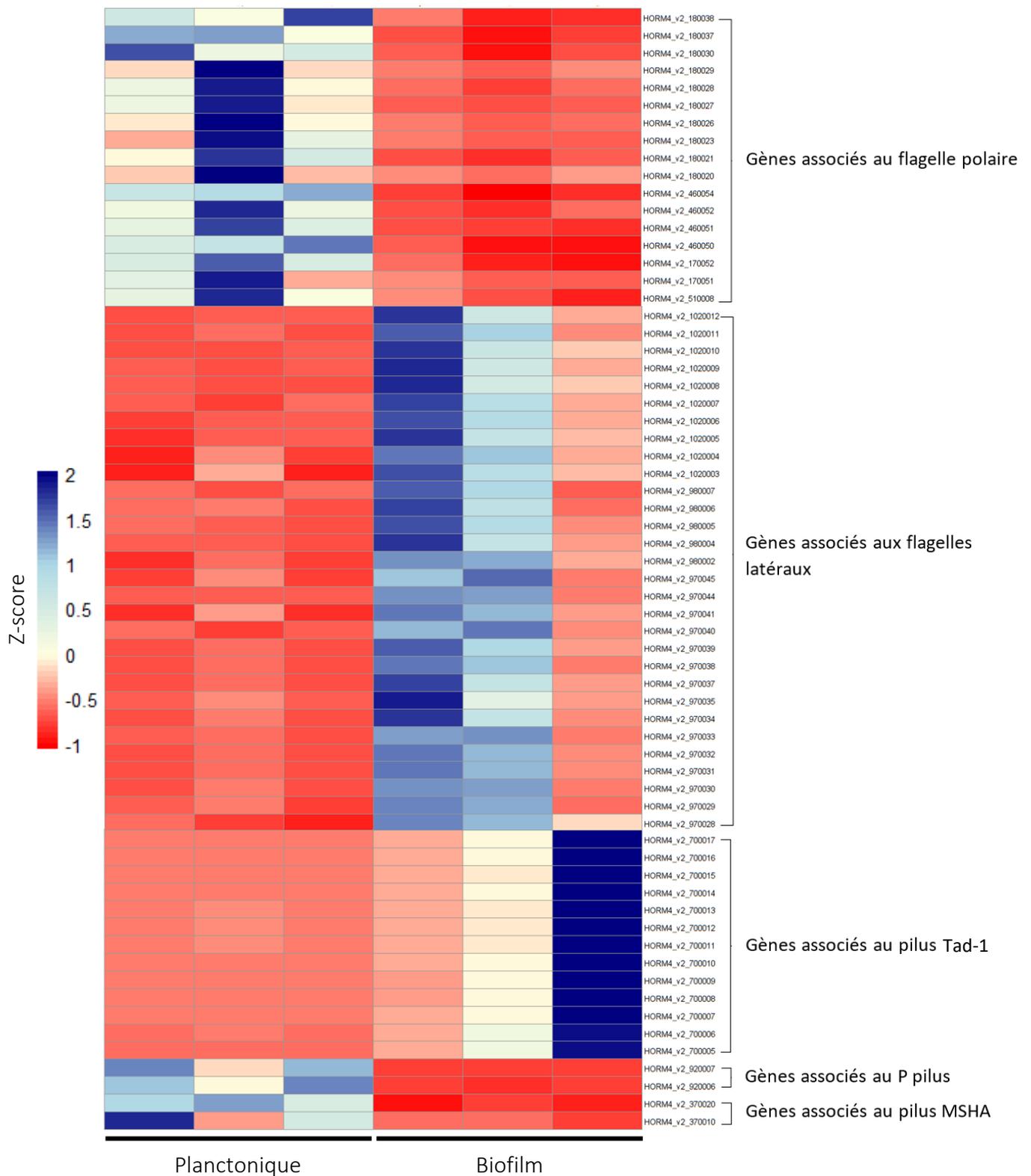


Figure 37 : Heatmap de l'analyse du transcriptome de *V. harveyi* ORM4 en conditions biofilm et planctonique sur une sélection de 64 gènes associés à la motilité et l'adhésion (p -value ajustée $< 0,05$). Chaque colonne et ligne représentent respectivement un réplicat biologique et un gène.

Ainsi, nous avons pu identifier un cluster de gènes impliqué dans la synthèse du pilus MSHA (hémagglutinine sensible au mannose) dans le génome de *V. harveyi* ORM4 (HORM4v2_370010 à HOMR4v2_370025). Ce pilus est utilisé par *V. parahaemolyticus* pour s'ancrer à des surfaces chitineuses et former du biofilm (Frischkorn *et al.*, 2013). Chez *V. harveyi* ORM4 ayant formé un biofilm de 24 h, les gènes HORM4_v2_370010 et HORM4_v2_370020 sont respectivement 2 et 4 fois moins exprimés en comparaison aux cellules planctoniques (Figure 37). En plus de ces gènes, deux autres (HORM4_v2_920006 et HORM4_v2_9200067) codant respectivement la porine PapC et la chaperone PapD du pilus P qui est impliqué dans l'adhésion bactérienne, sont sous-exprimés lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm et présentent respectivement des valeurs de FC de 0,026 et 0,014 (Figure 37). Différentes régions géniques ont quant à elles pu être associées à la synthèse d'un pilus de type IV, le pilus Tad (« tightly adhesion »), qui est associé à la formation de biofilm et la virulence de *V. vulnificus* par son implication dans la colonisation de l'hôte (Duong-Nu *et al.*, 2019). Chez *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm, le cluster *tad-1* est jusqu'à 50 fois plus exprimé qu'en condition planctonique (Annexe 1).

18.2.3. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE SYSTÈME DE QUORUM SENSING

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu identifier tous les gènes associés au quorum sensing de *V. campbellii* BB120 dans le génome de *V. harveyi* ORM4 (Chapitre 1, paragraphe 11.2.1, page 116). Les analyses transcriptomiques obtenues chez d'autres espèces de *Vibrio*, telles que *V. tapetis* ou *V. parahaemolyticus*, ont révélé que certains gènes du quorum sensing sont différentiellement exprimés lorsque les bactéries forment du biofilm (Rodrigues *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). Contrairement à ce qui a été montré chez ces espèces, l'expression des gènes du quorum sensing de *V. harveyi* ORM4 ne varie pas entre les cellules planctoniques et celles ayant formées du biofilm après 24 h de culture.

18.2.4. GÈNES ASSOCIÉS À LA SYNTHÈSE DE PROTÉINES EXTRACELLULAIRES

Au cours des observations microscopiques nous avons montré qu'au sein de la matrice du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 des protéines sont présentes et que ces dernières sont localisées au niveau des cellules (Figure 35C). Ces observations laissent penser que les appendices filamenteux retrouvés à la surface bactérienne représentent une part des protéines marquées par le SyproRuby (Figure 35C). L'étude transcriptomique a déjà révélé que les flagelles latéraux et le pilus Tad sont associés à la formation de biofilm puisque l'expression de leurs gènes est plus importante qu'en condition de culture planctonique (Figure 37).

Par ailleurs, parmi les 49 gènes associés à la production du T3SS identifiés chez *V. harveyi* ORM4, 18 sont également sur-exprimés par *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm (Tableau 7).

Tableau 7 : Expressions des gènes impliqués dans la synthèse du T3SS lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm.

ORF	GENE	FC	COG	PRODUIT
HORM4_V2_240099	vscB	3,255	UC	Type III secretion system chaperone, YscB family
HORM4_V2_240100	vscC	2,655	U	Type III secretion system secretin (VscC)
HORM4_V2_240101	vscD	2,16	S	Type III secretion inner membrane ring protein (VscD)
HORM4_V2_240103	vscF	2,81	U	Needle major subunit (VscF)
HORM4_V2_240104	vscG	3,123	S	Type III secretion system chaperone (VscG)
HORM4_V2_240105	vscH	3,8	S	Type III secretion effector, YopR family
HORM4_V2_240106	vscI	3,097	S	Type III secretion system inner rod protein (VscI)
HORM4_V2_240107	vscJ	2,117	U	Type III secretion bridge between inner and outer membrane lipoprotein (VscJ)
HORM4_V2_240109	vscL	2,69	N	Yop proteins translocation protein L (VscL)
HORM4_V2_240121	vscT	1,926	U	Type III secretion inner membrane protein (VscT)
HORM4_V2_240123	vscR	1,96	U	Type III secretion inner membrane protein (VscR)
HORM4_V2_240124	vscQ	2,636	N	Type III secretion inner membrane protein (VscQ)
HORM4_V2_240126	vscO	2,342	U	Putative type III secretion chaperone (VscO)
HORM4_V2_240127	vscN	3,517	N	ATPase (VscN)
HORM4_V2_240128	yopN	2,093	S	Type III secretion regulator (YopN)
HORM4_V2_240130	sycN	2,03	S	Type III secretion chaperone (SycN)
HORM4_V2_240131	vscX	2,583	U	Putative type III secretion protein (VscX)
HORM4_V2_240133	vcrD	2,822	U	Low calcium response protein (VcrD)

Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans la structure et la régulation du T3SS. Ainsi sont retrouvés les gènes codant les protéines VscC, VscD, VscI, VscJ, VscT, VscR et VscQ, formant le corps basal du T3SS et localisées au niveau des membranes interne et externe de la bactérie (Izoré *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2021). De plus, le gène *vscN* codant l'ATPase ainsi que le gène permettant la synthèse de l'aiguille VscF qui est retrouvée dans l'espace extracellulaire sont eux aussi sur-exprimés (Tableau 7) (Casselli *et al.*, 2008 ; Izoré *et al.*, 2011). Les gènes codant les protéines VopB et VopD, nécessaires à la translocation des effecteurs du T3SS à travers la membrane de la cellule hôte (Ono *et al.*, 2006), ne présentent quant à eux aucune différence d'expression entre les deux conditions de cultures. Ces résultats suggèrent ainsi que la majorité du T3SS soit assemblé lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm et pourrait ainsi faire partie des protéines marquées au SyproRuby (Figure 35C).

En outre, la sécrétion de protéines participe à la présence de protéines dans la matrice des biofilms. Chez les bactéries à Gram-négatif, une large variété de protéines sont transportées du cytoplasme bactérien vers l'espace extracellulaire à travers le système de sécrétion de type II (T2SS) (Korotkov *et al.*, 2012). Plusieurs gènes, codant pour des protéines de structure nécessaires à la synthèse des pseudopillines (EspH, GspI, GspJ, GspK) et de protéines localisées au niveau de la membrane interne (EspL et EspM) sont en moyenne deux fois plus exprimées chez *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm comparé à des cellules planctoniques. Chez *V. cholerae*, une partie des protéines sécrétées par ce système correspond à des enzymes ainsi que des protéines Rbm qui participent à la formation de biofilm (Fong and Yildiz, 2007 ; Sikora *et al.*, 2011 ; Johnson *et al.*, 2014)

Tableau 8 : : Expression des gènes impliqués dans la synthèse du T2SS lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm.

ORF	GENE	FC	COG	PRODUIT
HORM4_V2_90023	epsH	2,019	U	General secretion pathway protein H
HORM4_V2_90024	gspI	2,855	U	general secretion pathway protein I
HORM4_V2_90025	gspJ	2,247	U	general secretion pathway protein J
HORM4_V2_90026	gspK	2,158	U	general secretion pathway protein K
HORM4_V2_90027	epsL	1,999	U	General secretion pathway protein L
HORM4_V2_90028	epsM	1,775	U	General secretion pathway protein M
HORM4_V2_90029	epsN	1,726	U	General secretion pathway protein N

18.2.5. EXPRESSION DE GÈNES ASSOCIÉS À LA PRODUCTION DE POLYSACCHARIDES

Parallèlement à l'observation de protéines localisées à la base du biofilm, nous avons montré que le biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 est en partie composé de β -polysaccharides retrouvés sur toute l'épaisseur (Figure 35). Chez les *Vibrio*, divers clusters de gènes sont associés à la production et l'exportation de polysaccharides impliqués dans la formation de biofilm (Yildiz and Visick, 2009). Au sein du génome de *V. harveyi* ORM4, nous avons identifié un cluster de gènes (HORM4v2_940043 à HORM4v2_940054) partageant plus de 80% d'identité nucléotidique avec le cluster *cps* (capsular polysacharides) de *V. parahaemolyticus*. Cependant, aucun de ces gènes ne présente de différence d'expression entre les conditions biofilm et planctonique chez *V. harveyi* ORM4. Néanmoins, nous avons retrouvé dans le génome de la bactérie un autre cluster de gènes homologues au cluster *syp* (symbiosis polysacharides), initialement identifié chez *V. fischeri* mais conservé chez de nombreuses espèces de *Vibrio* pathogènes telles que *V. parahaemolyticus*, *V. tapetis* et *V. vulnificus* (Yildiz and Visick, 2009 ; Rodrigues *et al.*, 2018). Chez *V. harveyi* ORM4, la totalité de ces gènes est retrouvée (HORM4v2_640011 à HORM4v2_640026), exceptés les gènes codant pour les protéines SypE, SypF et SypM. SypE et SypF sont toutes deux des protéines régulatrices, la première est un répresseur, tandis que la seconde associée à la protéine RscS induit la production de biofilm (Morris and Visick, 2010, 2013 ; Ludvik *et al.*, 2021). Quant à la protéine

SypM, son rôle reste à définir. Parmi les 15 gènes identifiés, 6 sont sous-exprimés dans un biofilm de 24 h de *V. harveyi* ORM4 (Tableau 9). Ces résultats suggèrent que les β -polysaccharides marquées au CalcoFluor White (Figure 35B) ont pu être synthétisés par les gènes du cluster *syp* plus tôt dans la formation du biofilm ou que d'autres gènes encore non identifiés soient à l'origine de la production des polysaccharides observés.

Tableau 9 : Expression des gènes appartenant au cluster *syp* chez *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm.

ORF	GENE	FC	COG	PRODUIT
HORM4_V2_640012	sypB	0,121	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640013	sypC	0,151	M	Periplasmic protein involved in polysaccharide export
HORM4_V2_640014	sypD	0,244	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640015	sypG	0,305	T	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640016	sypH	0,154	T	putative LuxO repressor protein
HORM4_V2_640017	sypI	0,253	M	conserved protein of unknown function

18.3. VALIDATION DES RÉSULTATS DE SÉQUENÇAGE PAR RT-QPCR

La RT-qPCR est une méthode largement utilisée dans le but de valider les données de transcriptomique obtenues par RNAseq (Koch *et al.*, 2018). Dans un premier temps, nous avons sélectionné 8 gènes impliqués dans la formation de biofilm (attachement, motilité, quorum sensing, production de matrice), liés à la virulence de *V. harveyi* ORM4 (T3SS, HORM4_v2_520123) et codants des protéines de fonction inconnue (HORM4_v2_1130010 et HORM4_v2_920008). Les niveaux d'expression de ces gènes déterminés par RT-qPCR ont été comparés aux valeurs d'expressions différentielles obtenues en RNAseq. La corrélation de ces résultats déterminée par le coefficient de Pearson ($R^2=0,9273$) nous permet de valider les résultats de ce transcriptome (Figure 38A).

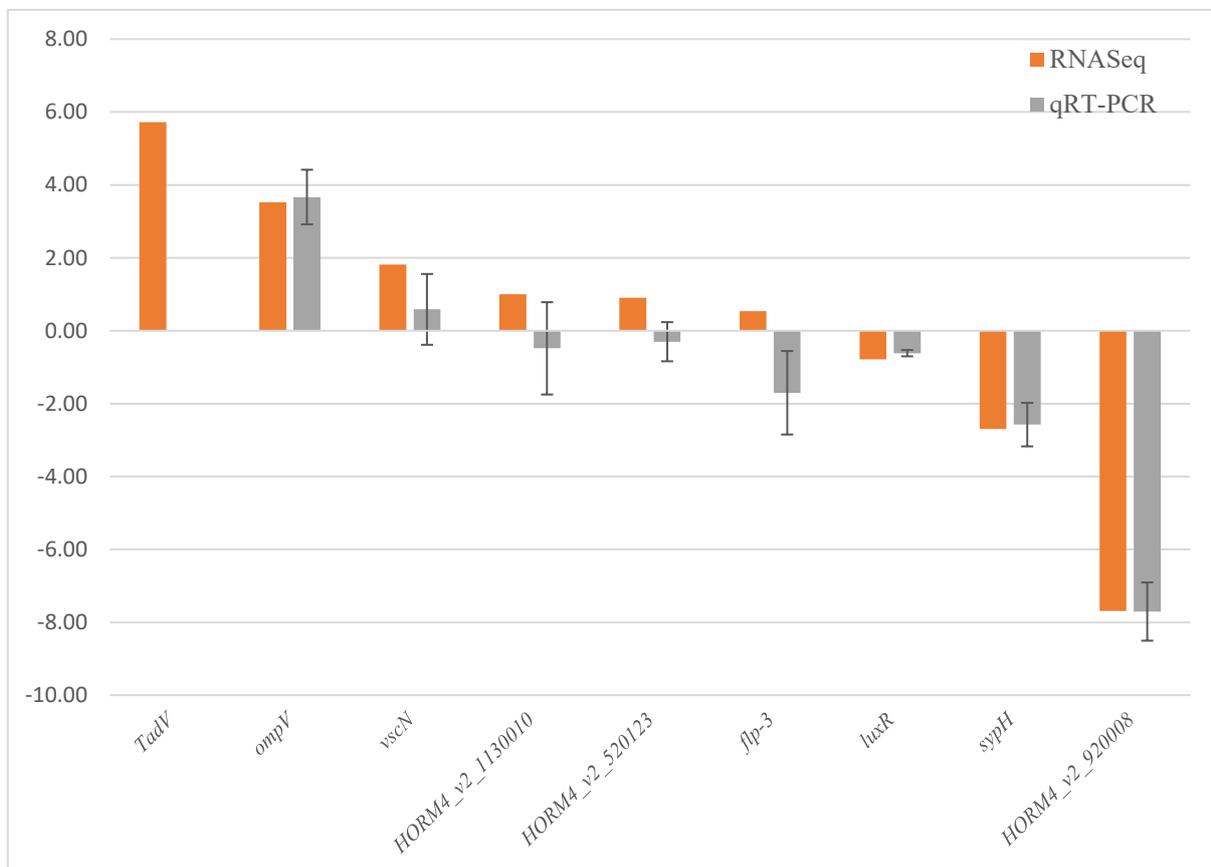
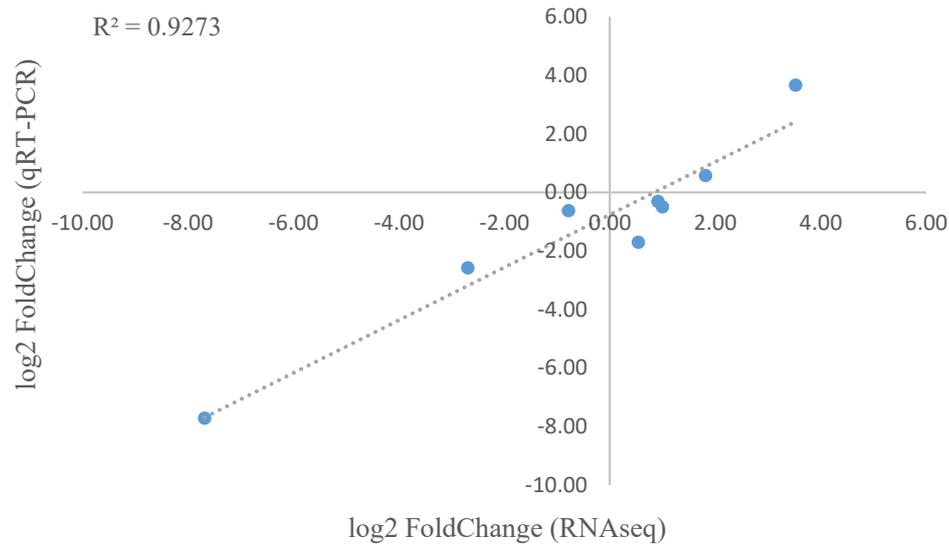


Figure 38 : Validation par RT-qPCR des valeurs d'expression différentielle de 8 gènes. Corrélation des valeurs de \log_2 fold change (\log_2 FC) d'expression de gènes obtenues en qRT-PCR et RNASeq (A). Valeurs de \log_2 FC obtenues après RNASeq et RT-qPCR chez *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm par rapport aux cellules planctoniques (B). Les valeurs de \log_2 FC des RT-qPCR ont été calculées par la méthode $Ct(2^{-\Delta\Delta})$ (Livak and Schmittgen, 2001) pour chaque gène en utilisant l'ARNr 16S comme contrôle endogène. Les moyennes des \log_2 FC de chaque gène obtenu par RT-qPCR sont présentées et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

19. INFLUENCE DU QUORUM SENSING SUR LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ *V. HARVEYI* ORM4

Comme observé chez *V. harveyi* ORM4, les biofilms sont des regroupements de bactéries associées à une matrice extracellulaire. De ce fait, une forte densité cellulaire est observée au sein des biofilms, suggérant qu'un système comme le quorum sensing y soit affilié. Chez de nombreuses espèces de *Vibrio*, telle que *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae*, des expérimentations menées en conditions statiques (microplaques en polystyrène) ont montré que le quorum sensing intervenait dans la formation de biofilm (Hammer and Bassler, 2003 ; Yildiz and Visick, 2009 ; Ray and Visick, 2012 ; Lorenz *et al.*, 2017). Chez *V. harveyi* ORM4 nous avons précédemment montré que la délétion du gène *luxO* engendrait un défaut de formation de biofilm lorsque celui-ci était cultivé en condition statique en microplaque en polystyrène, démontrant ainsi que le quorum sensing de la bactérie était lié au phénotype observé (Morot *et al.*, 2021). Afin d'étudier l'influence du quorum sensing sur la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4, les mêmes expérimentations que celles entreprises chez la souche sauvage ont été effectuées en parallèle chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. La caractérisation du biofilm formé par le mutant $\Delta luxO$ a été complétée par une analyse transcriptomique en condition planctonique et biofilm, ainsi que par des observations en microscopie confocale de biofilms formés en conditions dynamiques.

19.1. ÉTUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ *V. HARVEYI* ORM4 $\Delta LUXO$

19.1.1. IMPACT DU QUORUM SENSING DANS L'ADHÉSION DE *V. HARVEYI* ORM4

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier l'impact de la délétion du gène *luxO* sur la capacité de *V. harveyi* ORM4 à adhérer. Les observations par MCBL montrent qu'à la fois la souche sauvage et le mutant $\Delta luxO$ sont capables d'adhérer sur lamelle de verre après deux heures en absence de flux (Figure 39A). La délétion du gène *luxO* semble cependant favoriser

d'avantage l'adhésion de la bactérie puisque le pourcentage de recouvrement de la surface est augmenté d'un facteur 2 chez le mutant $\Delta luxO$ (Figure 39B).

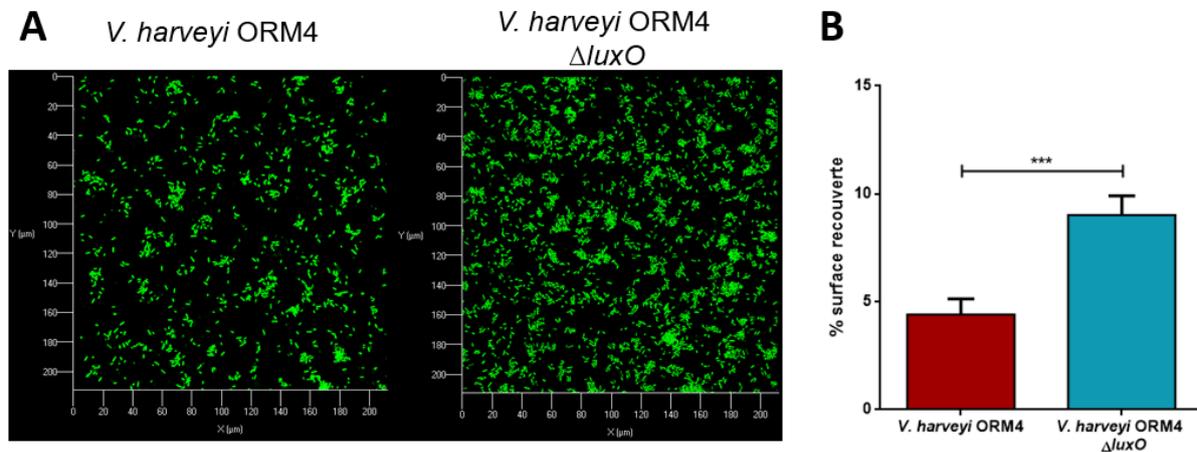


Figure 39 : Capacité d'adhésion de *V. harveyi* ORM4-GFP et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ -GFP après deux heures d'adhésion sur lamelle de verre en chambre à flux. Pourcentages de recouvrement calculés à l'aide du logiciel ImageJ (A) et observations de l'adhésion au MCBL (B). Les barres représentent l'écart à la moyenne et les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique Wilcoxon (*) p -value <0,001).**

19.1.2. IMPACT DE LA DÉLÉTION DU GÈNE *LUXO* SUR LA PRODUCTION DE BIOFILM PAR *V. HARVEYI* ORM4

Au cours de l'adhésion bactérienne nous avons donc observé que la délétion du gène *luxO* favorise l'adhésion de *V. harveyi* ORM4. Ces observations suggèrent que le biofilm du mutant $\Delta luxO$ puisse être plus important que la souche parentale, puisque plus de surface est recouverte par les cellules de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (Figure 39B). Néanmoins, au cours de nos expérimentations en microplaques en polystyrène nous avons observés un défaut de production de biofilm chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (Morot *et al.*, 2021). Étonnamment, après 24 heures de culture en présence d'un flux constant de LBS (2,5 mL/h) sur une lamelle en verre, *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est capable de former un biofilm (Figure 40). De plus, la structure particulière en « dôme », observée chez le biofilm de *V. harveyi* ORM4 n'est pas retrouvée chez le mutant (Figure 40A). En effet, les cellules de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ adhérentes à la surface sont réparties de manière uniforme sur la lamelle de verre. En remontant les couches du biofilm

formé par le mutant, les bactéries sont retrouvées de manière non uniforme, formant des agrégats plus ou moins importants (Figure 40A). Au niveau des couches les plus élevées plusieurs amas bactériens sont observés, contenus dans la matrice extracellulaire (Figure 40A).

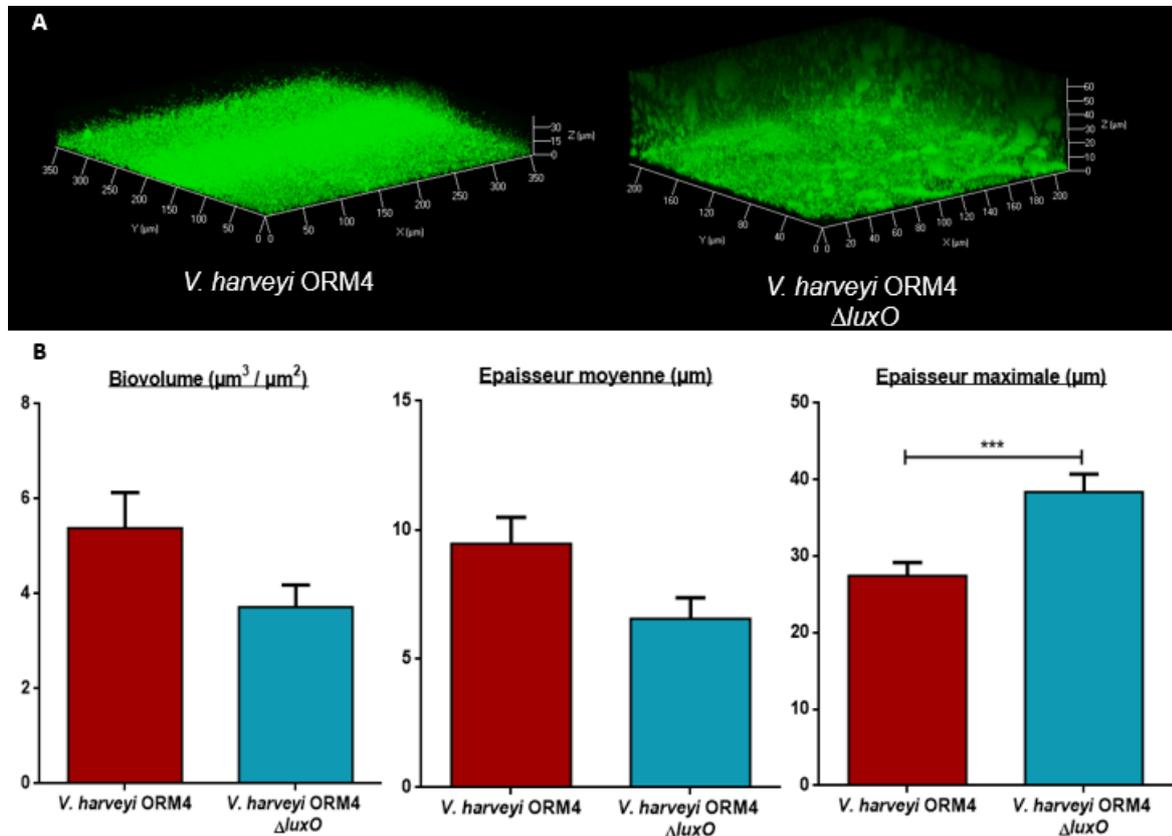


Figure 40 : Formation de biofilm par *V. harveyi* ORM4-GFP et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ -GFP, après 24 heures de culture en chambre à flux à 20°C en présence d'un flux constant de LBS (2,5 mL/h). Observations tridimensionnelles au MCBL des biofilms formés (A). Mesures des paramètres de biovolumes, d'épaisseurs moyennes et maximales obtenues après une analyse d'images avec le logiciel COMSTAT (B). 40 biofilms ont été observés et 3 clichés ont été pris par biofilms. Les barres représentent l'écart à la moyenne et les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique Wilcoxon (***) p -value <0,001).

Bien qu'ayant des structures très différentes, les biofilms de la souche parentale et du mutant présentent des biovolumes (p -value = 0,17) et épaisseurs moyennes (p -value = 0,06) similaires, mais qui ont tendance à être plus faibles pour le biofilm de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (Figure 40B). Par ailleurs les analyses montrent que *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ forme un biofilm dont l'épaisseur maximale est plus importante que celle du biofilm formé par la souche sauvage (Figure 40B). Ces mesures ayant été obtenues à partir d'analyses d'images représentant

seulement les bactéries, il a été entrepris une étude de l'abondance relative des composants dans la matrice de chacun des deux biofilms formés, afin d'étudier l'impact de la délétion du gène *luxO* sur la production des composants de la matrice.

19.1.3. IMPACT DE LA DÉLÉTION DE GÈNE *LUXO* SUR LA PRODUCTION DES COMPOSANTS DE LA MATRICE

Précédemment, nous avons montré que la matrice extracellulaire du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 est composée de β -polysaccharides, protéines et ADN extracellulaires (Figure 41). La délétion du gène *luxO* entraînant une répartition des cellules au sein du biofilm formé différente de ce qui a été observé chez la souche parentale, il est important d'étudier l'effet de la délétion de ce gène sur la production et/ou répartition des composants marqués chez *V. harveyi* ORM4. Ainsi, les polysaccharides, l'ADN extracellulaire et les protéines extracellulaires ont été marqués à l'aide des différents fluorochromes présentés précédemment (paragraphe 18.1.2, page 152). Afin de faciliter la visualisation de ces différents composants, les couleurs ont été modifiées artificiellement pour permettre une meilleure visualisation des bactéries et des composants de la matrice (Figure 41).

Les marquages ont révélé la présence de polysaccharides et d'ADN extracellulaire dans la matrice du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ (Figure 41A et B). Aucune différence de répartition et d'abondance de ces deux composants n'est observée entre les biofilms formés par la souche parentale et le mutant (Figure 41A, B et D). Chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ il a été observé une sévère diminution, voir presque une absence, de l'abondance relative de protéines dans la matrice extracellulaire du biofilm (Figure 41C et D).

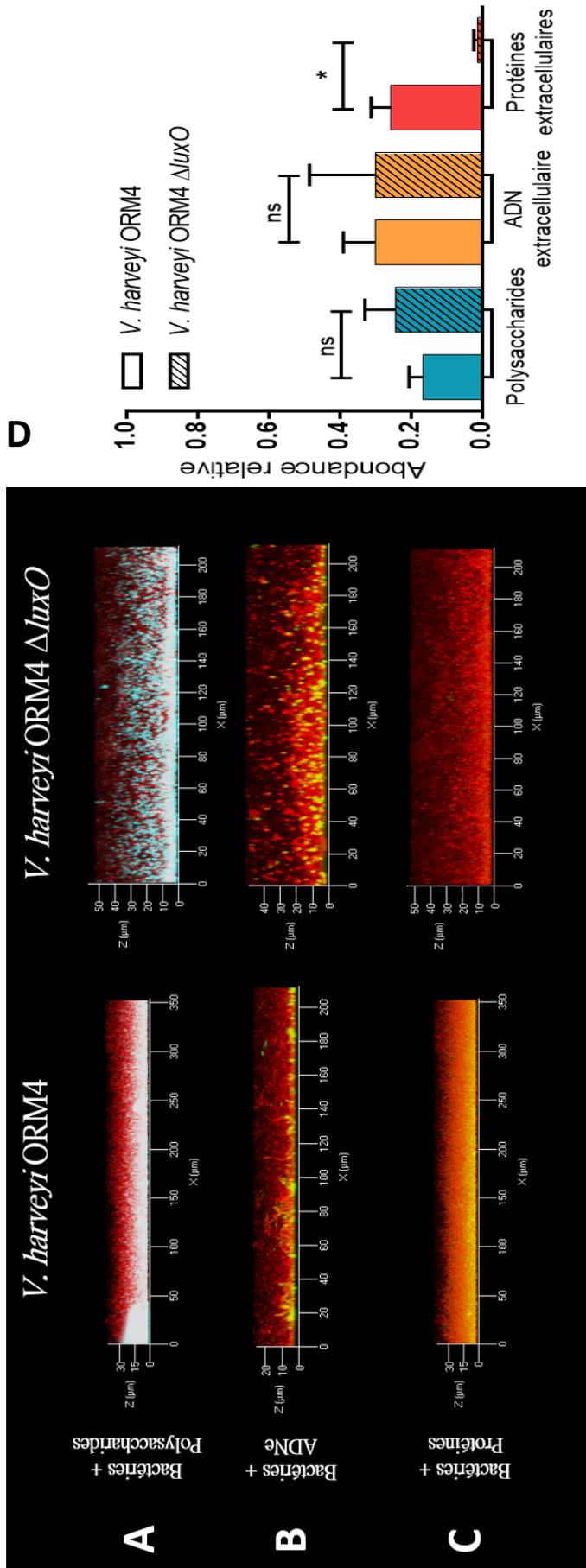


Figure 41 : Composants de la matrice extracellulaire des biofilms de 24 h de *V. harveyi* ORM4-GFP et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ -GFP. Vues latérales des biofilms formés par les deux bactéries exprimant la GFP (ici représentées en rouge) (A, B et C). Marquage des polysaccharides à liaisons β 1-3 et β 1-4 au Calcofluor White (représentés en bleu) (A), de l'ADNe au DDAO (représenté en vert) (B) et des protéines extracellulaires au SyproRuby (représentées en jaune) (C). Moyennes des abondances relatives des constituants de la matrice après analyses d'images avec le logiciel COMSTAT (D). Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne et les différences statistiques ont été obtenues à partir d'un test non-paramétrique Wilcoxon (* p -value < 0.05 , ns = non-significatif).

19.2. IDENTIFICATION DE GÈNES DÉRÉGULÉS CHEZ *V. HARVEYI* ORM4 Δ LUXO FORMANT DU BIOFILM

Les observations microscopiques effectuées chez *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 Δ luxO ont révélé que la délétion du gène *luxO* chez la bactérie favorise l'adhésion bactérienne et engendre des modifications dans la formation de biofilm. En même temps que l'analyse transcriptomique effectuée chez *V. harveyi* ORM4 sous forme planctonique et formant du biofilm (paragraphe 18.2, page 154), la même analyse a été faite à partir d'échantillons de *V. harveyi* ORM4 Δ luxO en condition planctonique et ayant formé du biofilm pendant 24 h. De ce fait, différentes comparaisons d'expression différentielle de gènes ont été entreprises. D'un côté, la comparaison des conditions planctoniques a été faite dans le but d'identifier les gènes dérégulés par l'absence du gène *luxO* chez *V. harveyi* ORM4, sans que cela ne soit provoqué par la formation de biofilm. Parmi ces gènes, une différence d'expression mise en évidence chez le mutant Δ luxO est en lien avec des gènes pouvant être impliqués dans l'adhésion bactérienne. D'un autre côté, la comparaison des gènes exprimés par les deux bactéries formant du biofilm a permis d'identifier ceux impliqués dans la production de la matrice extracellulaire. Seuls les gènes possédant une p-value inférieure à 0,05 ont été sélectionnés pour l'analyse.

19.2.1. IMPLICATION DU QUORUM SENSING DANS L'EXPRESSION DES GÈNES LIÉS À LA MOTILITÉ ET L'ATTACHEMENT

Précédemment, nous avons montré que *V. harveyi* ORM4 Δ luxO adhère deux fois plus que la souche parentale (Figure 39). Avant de former du biofilm, les bactéries, sous forme planctonique, se déplacent dans l'environnement et explorent les surfaces qu'elles colonisent à l'aide de divers appendices filamenteux. C'est pourquoi nous avons fait le choix d'étudier les gènes DE entre les cellules planctoniques de *V. harveyi* ORM4 et le mutant Δ luxO. Au cours du chapitre 1, nous avons démontré que *V. harveyi* ORM4 Δ luxO présentait une motilité

diminuée en comparaison à la souche parentale et que cela pouvait être associé aux 37 gènes sous-exprimés chez ce mutant en condition planctonique (Figure 42).

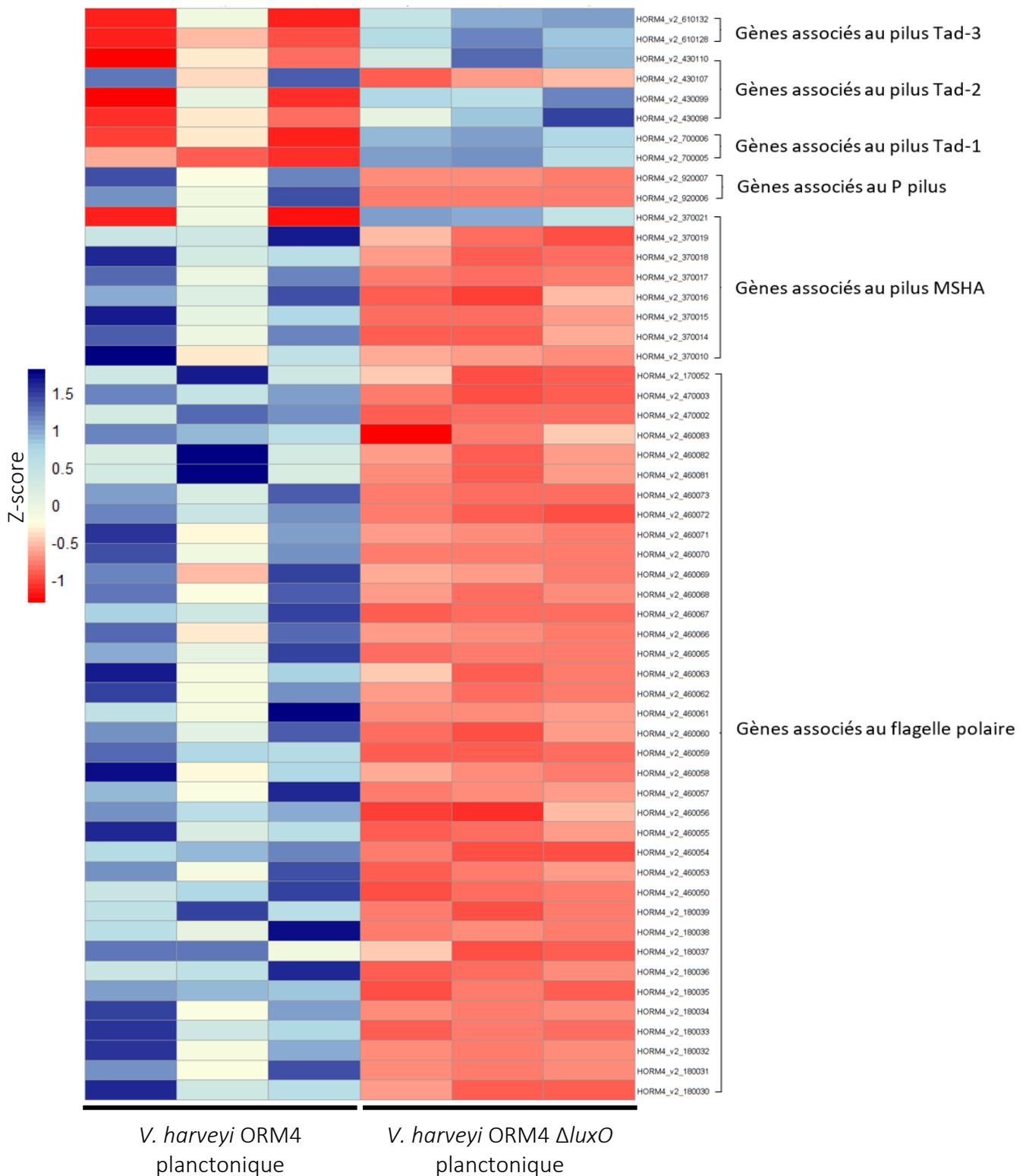


Figure 42 : Heatmap de l'analyse des transcriptomes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ planctoniques sur une sélection de 55 gènes associés à la motilité et l'adhésion (p -valeur ajustée $< 0,05$). Chaque colonne et lignes représentent respectivement un réplicat biologique et un gène.

En parallèle, les gènes codant le pilus MSHA et le P pilus sont entre 2 à 10 fois moins exprimés chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ en condition planctonique comparé à la souche parentale. La capacité de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ à présenter une adhésion 2 fois plus importante que la souche parentale peut s'expliquer par la sur-expression des gènes associés à la formation du pilus Tad qui sont entre 1,7 et 3 fois plus exprimés chez le mutant (Figure 42). Les gènes associés à la synthèse des flagelles latéraux ne semblent, quant à eux, pas être régulés par la protéine LuxO, puisqu'aucune différence significative d'expression entre les deux bactéries n'est observée (p -value > 0,05).

19.2.2. ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE GÈNES ASSOCIÉS À LA SYNTHÈSE ET LA SÉCRÉTION PROTÉIQUE PAR LE QUORUM SENSING AU COURS DE LA FORMATION DE BIOFILM

Les observations microscopiques ont permis de comparer les biofilms formés par *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. Ces dernières ont permis de révéler qu'une très faible quantité de protéines est retrouvée dans la matrice extracellulaire du biofilm formé par le mutant en comparaison à la souche sauvage. Dans le but d'étudier les gènes régulés par le quorum sensing chez *V. harveyi* ORM4 et comprendre les changements phénotypiques observés lorsque le mutant $luxO$ forme du biofilm, une analyse transcriptomique a été entreprise. Cette analyse s'est principalement portée sur l'identification des gènes dérégulés chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm en comparaison à ceux exprimés chez *V. harveyi* ORM4 dans les mêmes conditions de culture. Parmi les 2472 gènes différentiellement exprimés chez le mutant formant du biofilm, 1227 (49,6 %) et 1247 (50,4 %) sont respectivement sous- et sur-exprimés, en comparaison à *V. harveyi* ORM4 formant du biofilm.

La quasi absence de protéines dans la matrice du biofilm du mutant nous a amené, dans un premier temps, à rechercher les gènes associés à la production et sécrétion protéique (Figure 43).

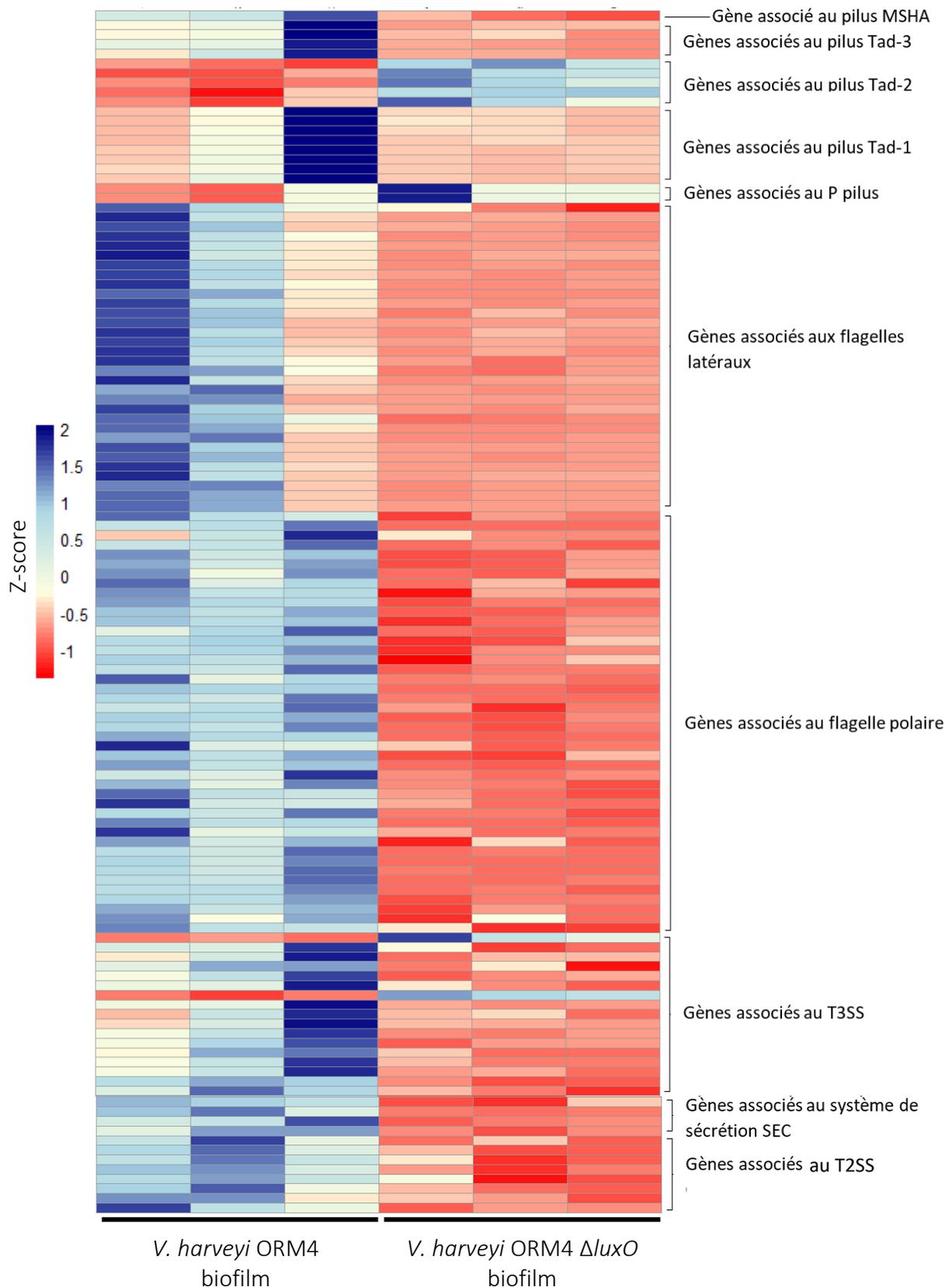


Figure 43 : Heatmap de l'analyse des transcriptomes de *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm sur une sélection de 125 gènes associés à la production et sécrétion protéique (p -value ajustée < 0,05). Chaque colonne et lignes représentent respectivement un réplicat biologique et un gène.

L'analyse des gènes exprimés par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm, révèle que les gènes associés à la production des flagelles polaires et latéraux, des pili (MSHA, pilus P, Tad-1 et Tad-3) sont entre 2 à 20 fois moins exprimés en comparaison à la souche sauvage formant du biofilm (Figure 43). De ce fait, la grande majorité des gènes que nous avons précédemment identifiés dans le génome de *V. harveyi* ORM4 sont réprimés en absence du gène *luxO*, excepté ceux appartenant au locus *tad-2*, qui sont quant à eux 2 fois plus exprimé chez les mutant (Figure 43). De plus, nous avons précédemment suggéré que la présence de protéines dans la matrice du biofilm de *V. harveyi* ORM4 pouvait être relié à la surexpression de plusieurs gènes associés à la sécrétion protéique comme le T2SS (Tableau 8) et T3SS (Tableau 7). Chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm, l'expression de ces gènes est réduite de moitié (Figure 43). En outre, nous observons aussi une diminution d'un facteur 3, de l'expression des gènes impliqués dans le transport Sec (Figure 43). Le système Sec est localisé au niveau de la membrane interne chez les bactéries à Gram négatif et participe au transport de protéines à travers le périplasme. La synthèse du complexe du T2SS est notamment dépendante du système Sec (Gerlach and Hensel, 2007). Ces différents résultats suggèrent que la très faible quantité de protéines retrouvées dans la matrice du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ soit la conséquence de la sous-expression de nombreux gènes associés à la production d'appendices filamenteux et la sécrétion protéique.

19.2.3. ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE GÈNES ASSOCIÉS À LA PRODUCTION DE POLYSACCHARIDES PAR LE QUORUM SENSING LORS DE LA FORMATION DE BIOFILM

Bien que l'abondance relative des autres composants de la matrice du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ soit similaire à ce qui est mesuré chez la souche sauvage, d'autres gènes pouvant être associés à la production de polysaccharides ont été recherchés. Dans le génome de *V. harveyi* ORM4 les clusters de gènes *syp* et *cps* ont été identifiés. Nous avons précédemment

montré que ces gènes sont sous-exprimés ou non différentiellement exprimés chez *V. harveyi* ORM4 dans un biofilm de 24 h, en comparaison à des cellules planctoniques (paragraphe 18.2.5, page 162). En comparant les gènes transcrits par la souche parentale et le mutant $\Delta luxO$ formant du biofilm, nous observons une augmentation de l'expression des gènes *syp* et *cps* chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. En effet les gènes HORM4_v2_640012 à HORM4_v2_640023 sont entre 2 à 16 fois plus exprimés chez le mutant et ceux associés au cluster *cps* présentent une augmentation d'expression d'un facteur entre 2 et 4 (Tableau 10).

Tableau 10 : Expression des gènes associés à la production de polysaccharides chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm. Dans ce tableau sont présentées les valeurs de FC associés à la condition *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ formant du biofilm, comparé au biofilm de la souche sauvage servant de référence.

ORF	GENE	FC	COG	PRODUIT
HORM4_V2_640012	<i>sypB</i>	15,249	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640013	<i>sypC</i>	16,427	M	Periplasmic protein involved in polysaccharide export
HORM4_V2_640014	<i>sypD</i>	13,702	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640015	<i>sypG</i>	11,053	T	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640016	<i>sypH</i>	19,035	T	putative LuxO repressor protein
HORM4_V2_640017	<i>sypI</i>	11,981	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640018	<i>sypJ</i>	1,935	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_640023	<i>sypO</i>	1,877	M	putative polysaccharide export protein
HORM4_V2_640024	<i>sypP</i>	0,524	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_940044		1,879	M	conserved exported protein of unknown function
HORM4_V2_940045		2,019	M	conserved exported protein of unknown function
HORM4_V2_940046		2,488	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_940047		4,317	S	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_940048		3,898	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_940049		2,926		conserved membrane protein of unknown function
HORM4_V2_940050		3,476	S	capsular polysaccharide synthesis protein CpsE
HORM4_V2_940052		4,065	M	conserved protein of unknown function
HORM4_V2_940053		4,354	M	conserved membrane protein of unknown function
HORM4_V2_940054		3,318		conserved membrane protein of unknown function

Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que les β -polysaccharides présents dans la matrice du biofilm de *V. harveyi* pouvant être synthétisés par le cluster *syp* et/ou le cluster *cps* au cours

des 24 h premières heures de cultures. Néanmoins, nos recherches dans la littérature n'ont pas permis de confirmer si les polysaccharides synthétisés par ces clusters sont composés de liaisons β 1-3 et/ou β 1-4 (celles marquées par le CalcuFluor White) (Chen *et al.*, 2007). De ce fait, nous ne pouvons conclure si ceux marqués dans la matrice du biofilm de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ sont ceux produits par les clusters de gènes *syp* et/ou *cps* qui présentent une augmentation d'expression chez le mutant en comparaison à la souche sauvage. Néanmoins, l'analyse transcriptomique révèle que ces gènes sont régulés par la protéine LuxO (Tableau 10).

20. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons caractérisé pour la première fois le biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$. De plus, l'analyse des transcriptomes obtenus à partir des cultures planctoniques et de biofilms de ces deux bactéries a permis d'émettre des hypothèses sur les gènes pouvant être associés à ce mode de vie ainsi que leur régulation par le quorum sensing chez *V. harveyi* ORM4.

Dans un premier temps, nous avons démontré que *V. harveyi* ORM4 est capable d'adhérer à une surface en verre en absence de flux. En outre, nous avons montré que cette adhésion est deux fois plus importante lorsque le quorum sensing est bouleversé par la délétion du gène *luxO* (Figure 39). Ceci est à mettre en corrélation avec la forte diminution de motilité observée chez le mutant *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ sur gélose de nage (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021). Nos résultats de transcriptomiques chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ planctoniques révèlent une diminution d'expression des gènes du flagelle polaire lorsque le gène *luxO* est délété du génome de *V. harveyi* ORM4 (Figure 42). L'adhésion des cellules sur une surface est défini comme le passage de ces dernières d'un état motile à un état sessile (Donlan, 2002). La rotation du flagelle

polaire permettant aux bactéries de se déplacer dans les environnements aqueux, est réprimée lorsque la cellule adhère sur une surface (Berne *et al.*, 2018). De ce fait, chez une bactérie incapable de synthétiser le flagelle polaire, comme c'est le cas chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$, il est probable que cette dernière sédimente et se dépose sur les surfaces, pouvant en partie expliquer le taux d'adhésion plus important chez le mutant $\Delta luxO$. En parallèle la recherche d'autres gènes associés à la production d'appendices filamenteux présentant une différence d'expression entre *V. harveyi* ORM4 et *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ planctoniques, révèlent que seuls les gènes du locus *tad-2* sont sur-exprimés chez le mutant (Figure 42). Dans le génome de *V. vulnificus*, comme nous l'avons également montré chez *V. harveyi* ORM4, trois loci *tad* sont retrouvés. Ces derniers sont homologues au locus *tad* identifiés la première fois chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Pu and Rowe-Magnus, 2018). Chez *V. vulnificus*, le pilus Tad participe à l'adhésion et à la formation de biofilm (Pu and Rowe-Magnus, 2018; Duong-Nu *et al.*, 2019). Chez *A. actinomycetemcomitans* ce pilus permet à la bactérie d'adhérer et de former des biofilms sur diverses surfaces dont le verre (Kachlany *et al.*, 2001). La surexpression du locus *tad-2* chez *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ en condition planctonique pourrait être liée à l'augmentation d'adhésion observée chez ce mutant (Figure 39 et Figure 42). Néanmoins, les analyses transcriptomiques ayant été effectuées à partir de cellules planctoniques nous ne pouvons pas réellement établir de lien entre ces résultats et l'adhésion bactérienne mesurée.

Dans un second temps, nous avons démontré que *V. harveyi* ORM4 et le mutant $\Delta luxO$ sont capables de produire un biofilm *in vitro* en conditions dynamiques en 24 h (Figure 34 et Figure 40). Le biofilm formé par la souche parentale est un rassemblement de bactéries formant une structure en dôme. Habituellement les observations en microscopie confocale à balayage laser des biofilms formés dans les mêmes conditions par *V. cholerae* ou encore *V. tapetis* ont fait état

d'un biofilm recouvrant le support de manière uniforme (Bilecen and Yildiz, 2009; Rodrigues *et al.*, 2015). À notre connaissance, aucun autre biofilm présentant une telle structure n'a été observé ou décrit dans la littérature. Divers éléments peuvent être mis en cause. La nature du support peut provoquer un changement dans la capacité des cellules à adhérer et à former un biofilm (Donlan, 2002 ; Dunne, 2002). Additionnés aux surfaces, la disponibilité en nutriments et le pH peuvent moduler cette formation de biofilm (Henares *et al.*, 2013 ; Flemming *et al.*, 2016). Afin d'éliminer ces hypothèses, la formation de biofilm par *V. harveyi* ORM4 a été observée en conditions statiques à l'aide de microplaques à fond de verre dans les mêmes conditions que celles décrites pour la technique culturale en chambres à flux (température, temps d'incubation et milieu). Le biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 recouvrait le fond des puits de manière homogène, signifiant que la surface en verre et les paramètres de culture choisies n'induisent pas cette structure en dôme observée en chambres à flux (données non présentées). Ces résultats suggèrent que le flux peut être mis en cause et imposer cette organisation du biofilm à *V. harveyi* ORM4. Par ailleurs, la délétion du gène *luxO* chez la bactérie, la rendant inapte à former du biofilm en microplaques en polystyrène (Chapitre 1, Morot *et al.*, 2021), est capable de former du biofilm en chambres à flux sur une surface de verre (Figure 34 et Figure 40). De plus ce dernier présente une épaisseur maximale plus importante que celle mesurée à partir du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4. De ce fait, nos différents résultats suggèrent que les techniques culturales aient un impact sur la formation de biofilm chez cette bactérie.

Chez *V. harveyi* ORM4, le quorum sensing influence aussi l'organisation des cellules au sein du biofilm. En effet, la délétion du gène *luxO* a imposé une réorganisation spatiale du biofilm, les cellules recouvrant uniformément la lamelle de verre (Figure 34 et Figure 40). Par ailleurs, le biofilm formé par cette souche présente aussi une épaisseur maximale plus importante que

celui de la souche parentale (Figure 40). En parallèle, l'utilisation de chambres à flux couplées à des observations au MCBL a permis d'étudier la distribution des composants de la matrice des biofilms formés par *V. harveyi* ORM4 et le mutant du quorum sensing. Chez les deux bactéries, l'ADNe est retrouvé à la base du biofilm alors que les polysaccharides sont localisés sur l'ensemble de l'épaisseur des biofilms formés (Figure 35 et Figure 41). Chez les *Vibrio*, les études portant sur des gènes impliqués dans la production de biofilm ont identifié divers clusters associés à la synthèse et l'exportation de polysaccharides à travers la membrane cellulaire (Fong *et al.*, 2010 ; Ray *et al.*, 2015 ; Yildiz and Visick, 2009). Dans le génome de *V. harveyi* ORM4 sont retrouvés les gènes associés aux clusters *cps* de *V. parahaemolyticus* (HORM4v2_940043 à HORM4v2_940054) et *syp* initialement identifié chez *V. fischeri* (HORM4v2_640011 à HORM4v2_640026) (Yildiz and Visick, 2009 ; Ray *et al.*, 2015). Nos analyses transcriptomiques ont révélé que ces gènes soit moins exprimés chez *V. harveyi* ORM4 après 24 h de formation de biofilm, en comparaison à la condition planctonique (Tableau 9). Deux hypothèses peuvent être émises. La première étant que ces gènes soient effectivement responsables de la production des polysaccharides marqués dans le biofilm de *V. harveyi* ORM4 mais qu'ils soient exprimés plus tôt. Autrement dit, l'expression maximale de ces gènes se situerait avant le temps 24 h (avant le moment où nous avons extrait les ARN des biofilms) et que les polysaccharides présents et marqués dans les biofilms soient la résultante de l'accumulation de ceux-ci au cours des 24 premières heures de formation de biofilm. En effet, la production de polysaccharides commence dès l'étape d'adhésion (Tsuneda *et al.*, 2003 ; Das *et al.*, 2010). Il est aussi possible que d'autres gènes encore non identifiés dans le génome de *V. harveyi* ORM4 soient responsables de la synthèse de ces polysaccharides (Figure 35). L'étude de la souche *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ a notamment révélé que les gènes *syp* et *cps* semblent être régulés par la protéine LuxO (Tableau 10). Il a déjà été démontré chez d'autres espèces de *Vibrio* que ces clusters sont régulés par le système de quorum sensing. Chez *V. vulnificus*,

l'expression des gènes du cluster *cps* est induite à faible densité cellulaire, contrairement à *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2023). Chez *V. fischeri*, organisme modèle pour l'étude du cluster *syp*, il a été démontré que la protéine LuxU régule la transcription des gènes *syp* (Ray and Visick, 2012).

En parallèle, nos observations microscopiques ont montré qu'additionné à la présence d'ADN et de polysaccharides, des protéines sont présentes à la base du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4. Il est possible qu'une partie des protéines marquées correspond aux flagelles latéraux et au pilus Tad dont l'expression des gènes est augmentée lorsque la bactérie forme du biofilm (Figure 37). Chez *V. tapetis*, *V. parahaemolyticus* ou encore *V. cholerae* ce sont les pili de type MSHA qui sont associés à la formation de biofilm (Rodrigues *et al.*, 2018; Yildiz and Visick, 2009). Étonnamment, nous avons aussi observé une surexpression de 18 gènes codant des protéines du corps basal et de l'aiguille du T3SS. L'implication de ce système dans la formation de biofilm bactérien n'a à notre connaissance jamais été démontrée. En effet, le T3SS est essentiellement associé à la virulence des bactéries par le pouvoir cytotoxique des protéines qu'il sécrète (Calder *et al.*, 2014a ; Zhang *et al.*, 2012 ; Hiyoshi *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2019). De même que chez *V. harveyi* ORM4, il a été montré que chez *V. tapetis* les gènes associés à un système de sécrétion, le type VI (T6SS), présentent une expression plus importante lorsque la bactérie forme du biofilm, comparé aux cellules planctoniques (Rodrigues *et al.*, 2018). Du fait de leur implication dans la virulence, il est possible que ces systèmes soient utilisées par les bactéries formant du biofilm afin de provoquer une mort cellulaire des bactéries adjacentes. La mort cellulaire est un processus étudié dans les biofilms bactériens. Elle peut être induite dans le but de libérer de l'ADN participant à la structuration du biofilm (Okshevsky and Meyer, 2015 ; Sarkar, 2020). Chez *P. tunicata* la dispersion des cellules contenues dans le biofilm est en partie induite par la production de peroxyde d'hydrogène induisant la mort cellulaire (Mai-Prochnow *et al.*, 2004). De ce fait, le T3SS pourrait être impliqué dans ce processus au sein du

biofilm de *V. harveyi* ORM4. Néanmoins, bien que les gènes soient induits, nous ne savons pas si le T3SS est synthétisé. Des techniques de marquages, tel que l'immunomarquage pourraient permettre de cibler ce système permettant de mieux comprendre son implication dans la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. En parallèle, nous avons montré que la délétion du gène *luxO* induit une sévère diminution de l'abondance en protéines présentes dans la matrice du biofilm (Figure 41). L'étude de l'expression des gènes associés à la production de protéines, chez ce mutant en comparaison à la souche parentale formant du biofilm, révèle qu'exceptés les gènes associés aux loci *tad*, l'expression des gènes impliqués dans la production d'appendices filamenteux et de systèmes de sécrétion est réduite chez le mutant (Figure 43). Chez les *Vibrio*, les gènes impliqués dans la synthèse des flagelles, pili et systèmes de sécrétion sont régulés par le quorum sensing (Yang and Defoirdt, 2015; Pena *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2022). En fonction de la densité cellulaire l'expression des gènes associés est alors induite ou inhibée. De ce fait nous pouvons suggérer qu'indépendamment de la formation de biofilm l'expression des gènes codant ces protéines soient dérégulées.

Pour conclure, au cours de cette étude nous avons pour la première fois décrit le biofilm de *V. harveyi* ORM4 à la fois par des approches de microscopie et moléculaires. De plus, par l'étude du mutant $\Delta luxO$ nous avons pu décrire la génétique associée aux changements phénotypiques observés dans le biofilm formé par cette bactérie.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les bactéries du genre *Vibrio* représentent une part importante des bactéries pathogènes d'organismes marins responsables de lourdes pertes dans le monde aquacole. Bien que de nombreuses souches bactériennes appartenant à l'espèce *V. harveyi* sont connues pour être pathogènes de poissons et d'invertébrés (Zhang *et al.*, 2020), les mécanismes responsables de la virulence chez cette espèce restent largement méconnus. La souche *V. harveyi* ORM4 a été isolée lors d'épidémies survenues à la fin des années 1990 provoquant des mortalités massives auprès de populations naturelles d'ormeaux européens *H. tuberculata* (Nicolas *et al.*, 2002). Cette infection, reproductible en laboratoire, est strictement dépendante de la température, puisqu'une température minimale de l'eau de mer de 18°C est nécessaire à l'apparition de mortalité (Travers *et al.*, 2009a). Ceci peut s'expliquer par le fait que ce paramètre influence l'état physiologique de l'animal, le rendant susceptible à la bactérie pathogène (Travers *et al.*, 2008b). Ainsi, *H. tuberculata* et *V. harveyi* ORM4 constituent un modèle pertinent pour étudier les mécanismes favorisant le développement d'infections en réponse au réchauffement océanique. Néanmoins, mise à part la connaissance du cycle infectieux de la bactérie au sein de son hôte (Cardinaud *et al.*, 2014a), aucun déterminant moléculaire associé à la pathogénicité de la bactérie n'avait été identifié avant la présente thèse. Ainsi, la problématique principale de cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes mis en place par la bactérie pathogène au cours de la colonisation de l'ormeau européen. Pour y répondre, nous avons développé un travail de recherche qui s'est divisé en deux principaux axes.

Le premier a été d'étudier divers gènes associés à la virulence d'autres espèces de *Vibrio* par une approche de délétion de ces gènes chez *V. harveyi* ORM4 et caractérisation de l'impact de ces modifications génétiques sur la capacité de la bactérie à induire des mortalités, ainsi qu'à coloniser les branchies et l'hémolymphe de l'ormeau européen. Ainsi, à l'aide de techniques de mutagenèse ciblée, nous avons pu démontrer que le quorum sensing et le T3SS sont tous deux

essentiels à la virulence aiguë de la bactérie, puisque leur absence induit une perte complète de la capacité de la bactérie à induire des mortalités d'ormeaux européen. De plus, nous avons pu montrer que ces deux systèmes sont impliqués dans la colonisation des branchies de l'animal. En revanche, leur rôle exact dans le cycle infectieux de *V. harveyi* ORM4 reste à définir. Bien que nous ayons démontré que la bactérie présente tous les gènes nécessaires à la synthèse d'un T3SS similaire à celui de *V. parahaemolyticus*, qui est connu pour être associé au pouvoir cytotoxique de la bactérie, nous ne savons pas à ce jour si les effecteurs sécrétés par le T3SS de *V. harveyi* ORM4 présentent les mêmes activités. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le T3SS serait impliqué dans la mort cellulaire précédemment observée chez les cultures de cellules branchiales de *H. tuberculata* après 20 h de contact (Pichon *et al.*, 2013). De même, chez *V. parahaemolyticus*, les protéines sécrétées par le T3SS1 présentent une activité inhibitrice de la voie des MAP kinases, faisant écho à cette même inhibition observée chez les hémocytes de *H. tuberculata* après mise en contact avec *V. harveyi* ORM4 (Trosky *et al.*, 2004 ; Matlawska-Wasowska *et al.*, 2010 ; Travers *et al.*, 2009b). Dans le futur, il sera donc primordial de caractériser le T3SS de *V. harveyi* ORM4 et notamment d'identifier les divers effecteurs sécrétés par ce système de sécrétion. Pour ce faire, une analyse comparative du sécrétome de *V. harveyi* ORM4 et de la souche délétée du gène *exsA*, dont le produit régule l'expression du T3SS, pourrait dans un premier temps être entreprise. Ceci nécessite d'identifier les conditions entraînant la sécrétion des effecteurs par le T3SS directement dans le milieu extracellulaire plutôt que dans le cytoplasme de cellules cibles. Chez *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*, la sécrétion de protéines dans le milieu de culture par le T3SS est induite par une faible concentration en calcium dans le milieu et une augmentation de température de culture (Lee and Schneewind, 1999). La déplétion de calcium induit aussi la sécrétion dans le milieu de culture des protéines du T3SS de *P. aeruginosa* (Shen *et al.*, 2006). Ces conditions pourront être testées sur *V. harveyi* ORM4. Les gènes codant les candidats

effecteurs pourront ensuite être délétés du génome de *V. harveyi* ORM4 et les nouvelles souches mutantes obtenues mises en contact avec les cellules de l'hôte dans le but d'effectuer un suivi de mortalité des cellules branchiales (Pichon *et al.*, 2013) et vérifier le pouvoir lytique des protéines codées. De plus, la construction de plasmides permettant l'expression dans des cellules eucaryotes des gènes codant pour chacun des effecteurs identifiés permettrait pas la suite de transformer des cellules eucaryotes afin d'étudier l'impact de chaque protéine sur la mort de ces cellules (Trosky *et al.*, 2004).

Au cours de ces travaux, nous avons démontré qu'en plus du T3SS, le quorum sensing est essentiel à la bactérie pour coloniser et induire des mortalités de *H. tuberculata*. Néanmoins, parmi les différents phénotypes que régule ce système chez *V. harveyi* ORM4 (motilité, formation de biofilm et production du T3SS), nous ne savons pas le(s)quel(s) est (sont) à l'origine de la perte de colonisation et de virulence de *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$.

Notre première approche a été d'identifier les différents gènes régulés par la protéine LuxO chez *V. harveyi* ORM4. En effet, l'analyse transcriptomique comparative entre la souche parentale et son mutant $\Delta luxO$ menée au cours de cette thèse a déjà permis de donner une première piste des gènes à étudier. Nous avons auparavant identifié dans le génome de la bactérie les différents gènes dont les produits sont similaires aux protéines constituant la voie de signalisation du quorum sensing de *V. campbellii* BB120 (Lilley and Bassler, 2000 ; Waters and Bassler, 2005). Nous avons ensuite mis en évidence la dérégulation de gènes codant des protéines impliquées dans l'adhésion bactérienne. Ces derniers pourraient être impliqués dans la colonisation de l'ormeau européen. En effet, le mutant $\Delta luxO$ présente un défaut dans sa capacité à se maintenir sur les branchies de l'animal. Il pourrait être envisageable de caractériser la composition du mucus de branchies de l'ormeau européen par des techniques de métabolomique, protéomique et de chimie analytique (chromatographie liquide et

spectrométrie de masse) (Pales Espinosa *et al.*, 2016). Cette analyse pourrait par la suite permettre de purifier certaines de ces protéines et d'étudier leur interaction avec les protéines de la surface de *V. harveyi* ORM4 par immunoprécipitation par exemple. L'identification des protéines bactériennes interagissant avec celles du mucus de branchies de l'ormeau européen, pourront par la suite être mis en corrélation avec les gènes d'adhésion qui présentent une sous-expression chez *V. harveyi* $\Delta luxO$. Dans un second temps, une analyse plus poussée du transcriptome de *V. harveyi* $\Delta luxO$ obtenu à partir de différentes conditions de cultures (mode planctonique et biofilm) permettrait d'identifier de nouveaux gènes susceptibles d'être associés à la virulence de *V. harveyi* ORM4. En effet, au cours de cette thèse, de nombreux RNAseq ont été entrepris, tels que la comparaison de l'expression des gènes entre la souche parentale et le mutant $\Delta luxO$ en conditions planctonique et biofilm sur verre ou sur mucus de branchies. Par manque de temps, nous avons défini des priorités et nous sommes focalisés sur les comparaisons présentées dans le Chapitre 3, et tous les résultats de séquençage n'ont pas encore été analysés. Dans de futurs travaux, il serait intéressant d'étudier les gènes fortement sur- ou sous-exprimés codant des protéines de fonctions inconnues. L'analyse de leurs séquences protéiques (recherche d'éventuels domaines conservés) et la prédiction de leur localisation par l'utilisation d'outils tel que SignalP permettront de sélectionner des gènes à étudier de façon plus approfondie en les mutant et en examinant les phénotypes des mutants. Cette approche pourrait permettre de découvrir de nouvelles protéines liées à la virulence.

Le second axe a eu pour but de donner une première caractérisation du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4, ainsi que d'identifier les gènes associés. L'implication directe de ce mode de vie dans la pathogénicité des bactéries appartenant au genre *Vibrio* n'a pas été formellement démontrée, même si un lien entre les deux a été établi chez *V. vulnificus* où des exopolysaccharides jouent un rôle à la fois dans la formation de biofilm et dans la virulence

(Kim *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré dans le cas de la relation symbiotique entre *V. fischeri* et le calmar *E. scolopes* que la formation de biofilm permet à la bactérie de coloniser son hôte (Morris and Visick, 2010 ; Shibata *et al.*, 2012). De plus, ce mode de vie est associé à la virulence de nombreuses bactéries pathogènes de l'Homme (Vestby *et al.*, 2020). Il est donc intéressant d'étudier l'implication de ce mode de vie dans la pathogénicité des espèces appartenant au genre *Vibrio*. C'est dans cette perspective que nous avons souhaité étudier la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. Ainsi, au cours de notre étude, nous avons montré que cette bactérie est capable de former un biofilm en 24 h. Ce dernier possède une architecture particulière en forme de dôme, suggérant une sensibilité au flux de milieu en conditions dynamiques et les composants de la matrice extracellulaire (exopolysaccharides, ADNe et protéines extracellulaires) sont retrouvés sur le premier tiers du biofilm. En parallèle, l'étude du transcriptome de *V. harveyi* ORM4 a permis d'identifier de nombreux gènes associés à la formation du biofilm. Parmi eux, nous avons montré que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du pilus Tad, des flagelles latéraux, du T3SS et du T2SS est augmentée lorsque la bactérie forme du biofilm, alors que les gènes appartenant au cluster *syp*, associés à la synthèse de polysaccharides, présentent une expression diminuée. Il est notamment envisagé de valoriser ces résultats par la rédaction d'un article scientifique mettant en relation la formation de biofilm et les gènes associés chez *V. harveyi* ORM4. Dans le but d'étudier l'implication de ce mode de vie dans le cycle infectieux de la bactérie, la délétion de certains de ces gènes, notamment ceux codant pour des composants de la matrice extracellulaire ou des protéines d'attachement, pourrait constituer une première approche. En effet, la caractérisation des biofilms formés par ces mutants et l'étude de leur capacité à induire des mortalités permettra de déterminer un lien potentiel entre ce mode de vie et la pathogénicité de la bactérie. En outre, nous avons montré que la délétion du gène *luxO*, entraînant une perte de virulence, altère aussi la formation de biofilm, suggérant un lien entre ces deux phénomènes chez *V. harveyi* ORM4. De ce fait, l'étude

du pouvoir infectieux de ces mutants ciblant directement la formation de biofilm pourrait être une première approche de l'étude de l'implication de ce mode de vie dans la colonisation de l'animal.

Nous avons également démontré que le quorum sensing est impliqué dans la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. La souche délétée du gène *luxO*, incapable de produire du biofilm en microplaques de polystyrène, forme en chambres à flux sur lamelle de verre un biofilm avec une épaisseur supérieure à celui formé par la souche sauvage. Néanmoins, la délétion du gène *luxO* induit une presque totale absence de protéines extracellulaires dans sa matrice. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec l'analyse du profil transcriptomique du mutant $\Delta luxO$, qui révèle une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de protéines extracellulaires et leur exportation. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les protéines absentes pourraient être associées au défaut de colonisation de l'ormeau européen observée chez ce mutant. Afin d'étudier l'implication de formation de biofilm dans la pathogénicité de *V. harveyi* ORM4 envers *H. tuberculata*, il pourrait être intéressant d'étudier la formation de biofilm du mutant $\Delta luxO$ et de la souche parentale sur du mucus de branchies d'animaux. Cette expérimentation a déjà été réalisée au cours de cette thèse et a fait l'objet d'une étude transcriptomique. Néanmoins, par manque de temps les résultats n'ont pas pu être analysés. Cette étude transcriptomique offre ainsi de nouvelles perspectives dans la recherche de gènes codant des protéines associées à l'interaction entre *V. harveyi* ORM4 et le mucus de branchies de *H. tuberculata*.

Enfin, une dernière voie à explorer est l'impact de la température sur la régulation de gènes de virulence. En effet, la vibriose de l'ormeau européen causée par *V. harveyi* ORM4 est associée à des températures élevées. Ce facteur est également connu pour réguler certains facteurs de

virulence chez les *Vibrio* (Cascarano *et al.*, 2021). L'étude de l'impact de la température sur la régulation des gènes associés à la virulence de *V. harveyi* ORM4 et à sa formation de biofilms pourra être menée par l'utilisation de biorapporteurs permettant d'étudier des gènes spécifiques ou par une analyse RNASeq pour une vision plus globale. De plus, nous avons démontré que le T3SS est essentiel à la virulence de la bactérie. L'effet de la température sur le fonctionnement de ce système et sur l'activité des protéines qu'il sécrète et leur toxicité sur cellules d'ormeau européen devra lui aussi être étudié.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments à la compréhension du couple d'infection *V. harveyi*-*H. tuberculata* et d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche prometteuses. De plus, une analyse plus poussée des différentes analyses transcriptomiques obtenues en fin de thèse permettra d'identifier de nouveaux gènes candidats, potentiellement codant des protéines de fonction inconnue, ayant possiblement un rôle sur la pathogénicité de *V. harveyi* ORM4 ou étant impliqués dans le lien potentiel entre biofilm et cycle infectieux. Ainsi, les résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche prometteuses, qui pourront être entreprises dans le cadre de futurs travaux sur cet important pathogène marin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aagesen, A.M., Phuvasate, S., Su, Y.-C., and Häse, C.C.** 2013. Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Is a Multifactorial Process Involving Pili and Flagella but Not Type III Secretion Systems or Phase Variation. *Appl Environ Microbiol* **79**, 3303–3305.
- Absalon, C., Van Dellen, K., and Watnick, P.I.** 2011. A Communal Bacterial Adhesin Anchors Biofilm and Bystander Cells to Surfaces. *PLoS Pathog* **7**, e1002210.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., and Ford, S.E.** 2002. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* **13**, 141–158.
- Allam, B., and Pales Espinosa, E.** 2015. Mucosal immunity in mollusks. *Mucosal Health in Aquaculture* **46**.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* **37**, 420–423.
- Altindis, E., Fu, Y., and Mekalanos, J.J.** 2014. Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**.
- An, S., Wu, J., and Zhang, L.-H.** 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersal by a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase with a Putative Hypoxia-Sensing Domain. *Appl Environ Microbiol* **76**, 8160–8173.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W.** 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169.
- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., and Lizárraga-Partida, M.** 1998. Pathogenic effects of *Vibrio alginolyticus* on larvae and postlarvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Dis. Aquat. Org.* **33**, 119–122.
- Ardre, M., Henry, H., Douarche, C., and Plapp, M.** 2015. An individual-based model for biofilm formation at liquid surfaces. *Phys. Biol.* **12**, 066015.
- Ashok Kumar, J. et al.** 2020. Phylogenetic Relationship Among Brackishwater *Vibrio* Species. *Evol Bioinform Online* **16**, 117693432090328.
- Austin, B.** 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* **140**, 310–317.
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., and Swings, J.** 2005. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. *Environ Microbiol* **7**, 1488–1495.

- Austin, B., and Zhang, X.-H.** 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* **43**, 119–124.
- Azeredo, J. et al.** 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* **43**, 313–351.
- Bai, F., Sun, B., Woo, N.Y.S., and Zhang, X.-H.** 2010. *Vibrio harveyi* hemolysin induces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **395**, 70–75.
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F., and Martinez-Urtaza, J.** 2018. *Vibrio* spp. infections. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 1–19.
- Ball, A.S., Chaparian, R.R., and van Kessel, J.C.** 2017. Quorum Sensing Gene Regulation by LuxR/HapR Master Regulators in Vibrios. *J Bacteriol* **199**.
- Ball, A.S., and van Kessel, J.C.** 2019. The master quorum-sensing regulators LuxR/HapR directly interact with the alpha subunit of RNA polymerase to drive transcription activation in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **111**, 1317–1334.
- Bassis, C.M., and Visick, K.L.** 2010. The Cyclic-di-GMP Phosphodiesterase BinA Negatively Regulates Cellulose-Containing Biofilms in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **192**, 1269–1278.
- Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R.** 1994a. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* **13**, 273–286.
- Bassler, B.L., Wright, M., and Silverman, M.R.** 1994b. Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **12**, 403–412.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K., and Bender, R.C.** 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* **123**, 159–167.
- Bazire, A. et al.** 2010. The Sigma Factor AlgU Plays a Key Role in Formation of Robust Biofilms by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**, 3001–3010.
- Beloin, C., and Ghigo, J.-M.** 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology* **13**, 16–19.
- Ben Cheikh, Y., Travers, M.-A., Morga, B., Godfrin, Y., Rioult, D., and Le Foll, F.** 2016. First evidence for a *Vibrio* strain pathogenic to *Mytilus edulis* altering hemocyte immune capacities. *Developmental & Comparative Immunology* **57**, 107–119.
- Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., and Rosenberg, E.** 2003. Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral *Pocillopora damicornis* by the Novel Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4236–4242.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y.** 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* **57**, 289–300.

- Berk, V., Fong, J.C.N., Dempsey, G.T., Develioglu, O.N., Zhuang, X., Liphardt, J., Yildiz, F.H., and Chu, S.** 2012. Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science* **337**, 236–239.
- Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., and Brun, Y.V.** 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol* **16**, 616–627.
- Bertone, S., Giii, C., Moizo, A., and Calegari, L.** 1996. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases*.
- Besharova, O., Suchanek, V.M., Hartmann, R., Drescher, K., and Sourjik, V.** 2016. Diversification of Gene Expression during Formation of Static Submerged Biofilms by *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **7**.
- Bilecen, K., and Yildiz, F.H.** 2009. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environmental Microbiology* **11**, 2015–2029.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K.** 2004. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16630–16635.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B.** 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120.
- Booolootian, R.A., Farmanfarmanian, A., and Giese, A.C.** 1962. ON THE REPRODUCTIVE CYCLE AND BREEDING HABITS OF TWO WESTERN SPECIES OF HALIOTIS ., *The Biological Bulletin* **122**, 183–193.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodriguez-Maroto, J.M., Borrego, J.J., and Moriñigo, M.A.** 1998. Chemotaxis of Pathogenic *Vibrio* Strains towards Mucus Surfaces of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol* **64**, 1573–1575.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., and Blokesch, M.** The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer.
- Bouffartigues, E., Duchesne, R., Bazire, A., Simon, M., Maillot, O., Dufour, A., Feuilloley, M., Orange, N., and Chevalier, S.** 2014. Sucrose favors *Pseudomonas aeruginosa* pellicle production through the extracytoplasmic function sigma factor SigX. *FEMS Microbiol Lett* **356**, 193–200.
- Brameyer, S., Plener, L., Müller, A., Klingl, A., Wanner, G., and Jung, K.** 2018. Outer Membrane Vesicles Facilitate Trafficking of the Hydrophobic Signaling Molecule CAI-1 between *Vibrio harveyi* Cells. *J Bacteriol* **200**.
- Bridges, A.A., Fei, C., and Bassler, B.L.** 2020. Identification of signaling pathways, matrix-digestion enzymes, and motility components controlling *Vibrio cholerae* biofilm dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 32639–32647.

- Broberg, C.A., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M.A., and Orth, K.** 2010. A *Vibrio* Effector Protein Is an Inositol Phosphatase and Disrupts Host Cell Membrane Integrity. *Science* **329**, 1660–1662.
- Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.-M., Taffin de Givenchy, E., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., and Bellon-Fontaine, M.-N.** 2015. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **131**, 59–66.
- Burdette, D.L., Yarbrough, M.L., Orvedahl, A., Gilpin, C.J., and Orth, K.** 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 12497–12502.
- Burrows, L.L.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 493–520.
- Butler, A.** 2005. Marine Siderophores and Microbial Iron Mobilization. *Biometals* **18**, 369–374.
- Cabello, A.E., Espejo, R.T., and Romero, J.** 2005. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **327**, 157–166.
- Cai, J., Han, H., Song, Z., Li, C., and Zhou, J.** 2006a. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke). *Aquaculture Res* **37**, 1222–1226.
- Cai, J., Han, Y., and Wang, Z.** 2006b. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* L.) postlarvae associated with mass mortalities. *Aquaculture* **257**, 161–166.
- Cai, J., Li, J., Thompson, K.D., Li, C., and Han, H.** 2007. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *J. Basic Microbiol.* **47**, 84–86.
- Calder, T., Kinch, L.N., Fernandez, J., Salomon, D., Grishin, N.V., and Orth, K.** 2014a. *Vibrio* Type III Effector VPA1380 Is Related to the Cysteine Protease Domain of Large Bacterial Toxins. *PLoS ONE* **9**, e104387.
- Calder, T., de Souza Santos, M., Attah, V., Klimko, J., Fernandez, J., Salomon, D., Krachler, A.-M., and Orth, K.** 2014b. Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence. *FEMS Microbiol Lett* **361**, 107–114.
- Campoccia, D., Montanaro, L., and Arciola, C.R.** 2021. Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture. *IJMS* **22**, 9100.

- Cao, J.G., and Meighen, E.A.** 1989. Purification and Structural Identification of an Autoinducer for the Luminescence System of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 21670–21676.
- Cardinaud, M., Barbou, A., Capitaine, C., Bidault, A., Dujon, A.M., Moraga, D., and Paillard, C.** 2014a. *Vibrio harveyi* Adheres to and Penetrates Tissues of the European Abalone *Haliotis tuberculata* within the First Hours of Contact. *Appl Environ Microbiol* **80**, 6328–6333.
- Cardinaud, M., Dheilly, N.M., Huchette, S., Moraga, D., and Paillard, C.** 2015. The early stages of the immune response of the European abalone *Haliotis tuberculata* to a *Vibrio harveyi* infection. *Developmental & Comparative Immunology* **51**, 287–297.
- Cardinaud, M., Offret, C., Huchette, S., Moraga, D., and Paillard, C.** 2014b. The impacts of handling and air exposure on immune parameters, gene expression, and susceptibility to vibriosis of European abalone *Haliotis tuberculata*. *Fish & Shellfish Immunology* **36**, 1–8.
- Casadevall, A., and Pirofski, L.** 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **1**, 17–24.
- Cascarano, M.C., Stavrakidis-Zachou, O., Mladineo, I., Thompson, K.D., Papandroulakis, N., and Katharios, P.** 2021. Mediterranean Aquaculture in a Changing Climate: Temperature Effects on Pathogens and Diseases of Three Farmed Fish Species. *Pathogens* **10**, 1205.
- Casselli, T., Lynch, T., Southward, C.M., Jones, B.W., and DeVinney, R.** 2008. *Vibrio parahaemolyticus* Inhibition of Rho Family GTPase Activation Requires a Functional Chromosome I Type III Secretion System. *Infect Immun* **76**, 2202–2211.
- Chen, J., Lu, Y., Ye, X., Emam, M., Zhang, H., and Wang, H.** 2020. Current advances in *Vibrio harveyi* quorum sensing as drug discovery targets. *European Journal of Medicinal Chemistry* **207**, 112741.
- Chen, L., Zhang, M., Li, X., Wu, Q., Xue, X., Zhang, T., Lu, R., and Zhang, Y.** 2023. AphA directly activates the transcription of polysaccharide biosynthesis gene *scvE* in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* **851**, 146980.
- Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Tay, J.-H., and Show, K.-Y.** 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 467–474.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., and Dorselaer, A.V.** 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. **415**.
- Chen, Y., Wu, F., Pang, H., Tang, J., Cai, S., and Jian, J.** 2019. Superoxide dismutase B (*sodB*), an important virulence factor of *Vibrio alginolyticus*, contributes to antioxidative stress and its potential application for live attenuated vaccine. *Fish & Shellfish Immunology* **89**, 354–360.

- Cheng, L., Huang, J., Shi, C., Thompson, K.D., Mackey, B., and Cai, J.** 2008. *Vibrio parahaemolyticus* Associated with Mass Mortality of Postlarval Abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* (L.), in Sanya, China. *Journal of the World Aquaculture Society* **39**, 746–757.
- Cheng, W., Hsiao, I.-S., Hsu, C.-H., and Chen, J.-C.** 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* **17**, 235–243.
- Choi, M.-J., Kim, Y.R., Park, N.G., Kim, C.-H., Oh, Y.D., Lim, H.K., and Kim, J.-M.** 2022. Characterization of a C-Type Lectin Domain-Containing Protein with Antibacterial Activity from Pacific Abalone (*Haliotis discus hannai*). *IJMS* **23**, 698.
- Colwell, R.R.** 1970. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *J Bacteriol* **104**, 410–433.
- Cook, P.A.** 2016. Recent Trends in Worldwide Abalone Production. *Journal of Shellfish Research* **35**, 581–583.
- Cook, P.A.** 2014. The Worldwide Abalone Industry. *ME* **05**, 1181–1186.
- Cook, P.A., and Roy Gordon, H.** 2010. World Abalone Supply, Markets, and Pricing. *Journal of Shellfish Research* **29**, 569–571.
- Dang, V.T., Speck, P., and Benkendorff, K.** 2012. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. *Fish & Shellfish Immunology* **32**, 732–740.
- Darshanee Ruwandepika, H.A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P., and Defoirdt, T.** 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade: Virulence and pathogenesis of vibrios. *Reviews in Aquaculture* **4**, 59–74.
- Das, T., Sharma, P.K., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., and Krom, B.P.** 2010. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation. *Appl Environ Microbiol* **76**, 3405–3408.
- Daume, S., Huchette, S., Ryan, S., and Day, R.W.** 2004. Nursery culture of *Haliotis rubra*: the effect of cultured algae and larval density on settlement and juvenile production. *Aquaculture* **236**, 221–239.
- Davis, G.H.G., and Park, R.W.A.** 1962. A Taxonomic Study of Certain Bacteria Currently Classified as *Vibrio* Species. *Journal of General Microbiology* **27**, 101–119.
- Deane, E.E., Jia, A., Qu, Z., Chen, J.-X., Zhang, X.-H., and Woo, N.Y.S.** 2012. Induction of apoptosis in sea bream fibroblasts by *Vibrio harveyi* haemolysin and evidence for an anti-apoptotic role of heat shock protein 70: Haemolysin-induced apoptosis and protection by HSP70. *Journal of Fish Diseases* **35**, 287–302.
- Debnath, A., Mizuno, T., and Miyoshi, S.** 2020. Regulation of Chitin-Dependent Growth and Natural Competence in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microorganisms* **8**, 1303.

- Delavat, F., Bidault, A., Pichereau, V., and Paillard, C.** 2018. Rapid and efficient protocol to introduce exogenous DNA in *Vibrio harveyi* and *Pseudoalteromonas* sp. *Journal of Microbiological Methods* **154**, 1–5.
- Delavat, F., Mitri, S., Pelet, S., and van der Meer, J.R.** 2016. Highly variable individual donor cell fates characterize robust horizontal gene transfer of an integrative and conjugative element. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, E3375–E3383.
- Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S., and Losick, R.** 2015. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **197**, 3779–3787.
- Donlan, R.M.** 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890.
- Donnenberg, M.S.** 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* **406**, 768–774.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** 1988. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**, 6127–6145.
- Dubief, B.** Variabilité de la capacité de résistance des populations de l’ormeau européen *Haliotis tuberculata* face à *Vibrio harveyi*.
- Dubief, B., Nunes, F.L.D., Basuyaux, O., and Paillard, C.** 2017. Immune priming and portal of entry effectors improve response to vibrio infection in a resistant population of the European abalone. *Fish & Shellfish Immunology* **60**, 255–264.
- Dunne, W.M.** 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev* **15**, 155–166.
- Duong-Nu, T.-M., Jeong, K., Hong, S.H., Puth, S., Kim, S.Y., Tan, W., Lee, K.H., Lee, S.E., and Rhee, J.H.** 2019. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog* **15**, e1007767.
- Earl, C., Arnaouteli, S., Bamford, N.C., Porter, M., Sukhodub, T., MacPhee, C.E., and Stanley-Wall, N.R.** 2020. The majority of the matrix protein TapA is dispensable for *Bacillus subtilis* colony biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* **114**, 920–933.
- Echazarreta, M.A., and Klose, K.E.** 2019. *Vibrio* Flagellar Synthesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 131.
- Elston, R., and Wood, G.S.L.** 1983. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J Fish Diseases* **6**, 111–128.
- Elvitigala, D.A.S., Premachandra, H.K.A., Whang, I., Nam, B.-H., and Lee, J.** 2013. Molecular insights of the first gastropod TLR counterpart from disk abalone (*Haliotis discus discus*), revealing its transcriptional modulation under pathogenic stress. *Fish & Shellfish Immunology* **35**, 334–342.
- Falkow, S.** 1988. Molecular Koch’s Postulates Applied to Microbial Pathogenicity. *Clinical Infectious Diseases* **10**, S274–S276.

- FAO.** 2022. La Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022. Vers une transformation bleue. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461fr>
- Faruque, S.M., Biswas, K., Udden, S.M.N., Ahmad, Q.S., Sack, D.A., Nair, G.B., and Mekalanos, J.J.** 2006. Transmissibility of cholera: *In vivo* -formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6350–6355.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J.** 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623–633.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S.** 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563–575.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., and White, B.A.** 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* **6**, 121–131.
- Fong, J.C.N., Karplus, K., Schoolnik, G.K., and Yildiz, F.H.** 2006. Identification and Characterization of RbmA, a Novel Protein Required for the Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Structure in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **188**, 1049–1059.
- Fong, J.C.N., Syed, K.A., Klose, K.E., and Yildiz, F.H.** 2010. Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* **156**, 2757–2769.
- Fong, J.C.N., and Yildiz, F.H.** 2007. The *rbmBCDEF* Gene Cluster Modulates Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **189**, 2319–2330.
- Freeman, J.A., and Bassler, B.L.** 1999a. A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol* **31**, 665–677.
- Freeman, J.A., and Bassler, B.L.** 1999b. Sequence and Function of LuxU: a Two-Component Phosphorelay Protein That Regulates Quorum Sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* **181**, 899–906.
- Frischkorn, K.R., Stojanovski, A., and Paranjpye, R.** 2013. *Vibrio parahaemolyticus* type IV pili mediate interactions with diatom-derived chitin and point to an unexplored mechanism of environmental persistence: *V. parahaemolyticus* and chitin. *Environmental Microbiology* **15**, 1416–1427.
- Froelich, B.A., Daines, D.A.** 2020. In Hot Water: Effects of Climate Change on *Vibrio*-Human Interactions. *Environ. Microbiol.* **10**, 4101–4111.
- Froehlich, H.E., Gentry, R.R., Halpern, B.S.** 2018. Global change in marine aquaculture production potential under climate change. *Nat Ecol Evol* **11**, 1745-1750..

- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P.** 1994. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *176*, 7.
- Gallego-Hernandez, A.L., DePas, W.H., Park, J.H., Teschler, J.K., Hartmann, R., Jeckel, H., Drescher, K., Beyhan, S., Newman, D.K., and Yildiz, F.H.** 2020. Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 11010–11017.
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., and Zhang, Z.** 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* **18**, 1049–1056.
- Garrido, K.D., Palacios, R.J.S., Lee, C., and Kang, S.** 2014. Impact of conditioning film on the initial adhesion of *E. coli* on polysulfone ultrafiltration membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **20**, 1438–1443.
- Gauger, E., and Gómez-Chiarri, M.** 2002. 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis. Aquat. Org.* **52**, 39–46.
- Ge, H., Wang, G., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, S., Zou, Z., Yan, S., and Wang, Y.** 2011. Molecular cloning and expression of interleukin-1 receptor-associated kinase 4, an important mediator of Toll-like receptor signal pathway, from small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish & Shellfish Immunology* **30**, 1138–1146.
- Gerlach, R., and Hensel, M.** 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* **297**, 401–415.
- Giglio, K.M., Fong, J.C., Yildiz, F.H., and Sondermann, H.** 2013. Structural Basis for Biofilm Formation via the *Vibrio cholerae* Matrix Protein RbmA. *Journal of Bacteriology* **195**, 3277–3286.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T.** 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: Programmed dispersal of *P. putida* biofilms. *Environmental Microbiology* **7**, 894–904.
- Gobet, A., Mest, L., Perennou, M., Dittami, S.M., Caralp, C., Coulombet, C., Huchette, S., Roussel, S., Michel, G., and Leblanc, C.** 2018. Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome* **6**, 60.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F.L., Thompson, C.C., and Swings, J.** 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 239–243.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B., and Figueras, A.** 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from Aquacultured Carpet Shell Clam (*Ruditapes decussatus*) Larvae Associated with Mass Mortalities. *Appl Environ Microbiol* **71**, 98–104.
- Green, E.R., and Mecsas, J.** 2016. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* **4**, 4.1.13.

- Guo, Y., and Rowe-Magnus, D.A.** 2010. Identification of a c-di-GMP-Regulated Polysaccharide Locus Governing Stress Resistance and Biofilm and Rugose Colony Formation in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **78**, 1390–1402.
- Gutierrez West, C.K., Klein, S.L., and Lovell, C.R.** 2013. High Frequency of Virulence Factor Genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* Strains Isolated from a Pristine Estuary. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2247–2252.
- Guttenplan, S.B., and Kearns, D.B.** 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 849–871.
- Güvener, Z.T., and McCarter, L.L.** 2003. Multiple Regulators Control Capsular Polysaccharide Production in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**, 5431–5441.
- Hammer, B.K., and Bassler, B.L.** 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*: Biofilms in *V. cholerae*. *Molecular Microbiology* **50**, 101–104.
- Harris, J.O., Burke, C.M., Edwards, S.J., and Johns, D.R.** 2005. Effects of oxygen supersaturation and temperature on juvenile greenlip, *Haliotis laevis* Donovan, and blacklip, *Haliotis rubra* Leach, abalone. *Aquac Research* **36**, 1400–1407.
- He, H., Cooper, J.N., Mishra, A., and Raskin, D.M.** 2012. Stringent Response Regulation of Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **194**, 2962–2972.
- Henares, B., Xu, Y., and Boon, E.** 2013. A Nitric Oxide-Responsive Quorum Sensing Circuit in *Vibrio harveyi* Regulates Flagella Production and Biofilm Formation. *IJMS* **14**, 16473–16484.
- Hermansson, M.** 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **14**, 105–119.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., and Molin, S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**, 2395–2407.
- Hiyoshi, H., Kodama, T., Saito, K., Gotoh, K., Matsuda, S., Akeda, Y., Honda, T., and Iida, T.** 2011. VopV, an F-Actin-Binding Type III Secretion Effector, Is Required for *Vibrio parahaemolyticus*-Induced Enterotoxicity. *Cell Host & Microbe* **10**, 401–409.
- Hollenbeck, E.C., Fong, J.C.N., Lim, J.Y., Yildiz, F.H., Fuller, G.G., and Cegelski, L.** 2014. Molecular Determinants of Mechanical Properties of *V. cholerae* Biofilms at the Air-Liquid Interface. *Biophysical Journal* **107**, 2245–2252.
- Hong, H.-K., Donaghy, L., and Choi, K.-S.** 2019. Flow cytometric characterization of hemocytes of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve, 1846) and effects of air exposure stresses on hemocyte parameters. *Aquaculture* **506**, 401–409.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., and Benkendorff, K.** 2007. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology* **22**, 363–379.

- Hospenthal, M.K., Costa, T.R.D., and Waksman, G.** 2017. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **15**, 365–379.
- Hsieh, J.L., Fries, J.S., and Noble, R.T.** 2007. *VIBRIO* AND PHYTOPLANKTON DYNAMICS DURING THE SUMMER OF 2004 IN A EUTROPHYING ESTUARY. *Ecological Applications* **17**, S102–S109.
- Huang, C.-Y., Liu, P.-C., and Lee, K.-K.** 2001. Withering Syndrome of the Small Abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, Is Caused by *Vibrio parahaemolyticus* and Associated with Thermal Induction. *Zeitschrift für Naturforschung C* **56**, 898–901.
- Huang, L. et al.** 2016. Genome-Wide Detection of Predicted Non-coding RNAs Related to the Adhesion Process in *Vibrio alginolyticus* Using High-Throughput Sequencing. *Front. Microbiol.* **7**.
- Hung, D.T., Zhu, J., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J.** 2006. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **59**, 193–201.
- Hunt, D.E., Gevers, D., Vahora, N.M., and Polz, M.F.** 2008. Conservation of the Chitin Utilization Pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 44–51.
- Hussa, E.A., Darnell, C.L., and Visick, K.L.** 2008. RscS Functions Upstream of SypG To Control the *syp* Locus and Biofilm Formation in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **190**, 4576–4583.
- Izoré, T., Job, V., and Dessen, A.** 2011. Biogenesis, Regulation, and Targeting of the Type III Secretion System. *Structure* **19**, 603–612.
- Jacobs Slifka, K.M., Newton, A.E., and Mahon, B.E.** 2017. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012. *Epidemiol. Infect.* **145**, 1491–1499.
- Jiang, C., Tanaka, M., Nishikawa, S., Mino, S., Romalde, J.L., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., and Sawabe, T.** 2022. *Vibrio* Clade 3.0: New *Vibrionaceae* Evolutionary Units Using Genome-Based Approach. *Curr Microbiol* **79**, 10.
- Jiang, Q., Shi, L., Ke, C., You, W., and Zhao, J.** 2013. Identification and characterization of *Vibrio harveyi* associated with diseased abalone *Haliotis diversicolor*. *Dis. Aquat. Org.* **103**, 133–139.
- Jiang, Y., and Wu, X.** 2007. Characterization of a Rel/NF- κ B homologue in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Developmental & Comparative Immunology* **31**, 121–131.
- Johnson, F.H., and Shunk, I.V.** 1936. An Interesting New Species of Luminous Bacteria. *J Bacteriol* **31**, 585–593.
- Johnson, T.L., Fong, J.C., Rule, C., Rogers, A., Yildiz, F.H., and Sandkvist, M.** 2014. The Type II Secretion System Delivers Matrix Proteins for Biofilm Formation by *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **196**, 4245–4252.

- Kachlany, S.C., Planet, P.J., DeSalle, R., Fine, D.H., and Figurski, D.H.** 2001. Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum. *Trends in Microbiology* **9**, 429–437.
- Kaizu, A., Fagutao, F.F., Kondo, H., Aoki, T., and Hirono, I.** 2011. Functional Analysis of C-type Lysozyme in Penaeid Shrimp. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 44344–44349.
- Kanampalliwar, A., and Singh, D.V.** 2020. Extracellular DNA builds and interacts with vibrio polysaccharide in the biofilm matrix formed by *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology Reports* **12**, 594–606.
- Kaplan, J.B., and Fine, D.H.** 2002. Biofilm Dispersal of *Neisseria subflava* and Other Phylogenetically Diverse Oral Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4943–4950.
- Kaur, D., and Mukhopadhaya, A.** 2020. Outer membrane protein OmpV mediates *SALMONELLA ENTERICA* serovar typhimurium adhesion to intestinal epithelial cells via fibronectin and $\alpha\beta 1$ integrin. *Cellular Microbiology* **22**.
- Kemter, F.S. et al.** 2018. Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae. *PLoS Genet* **14**, e1007251.
- van Kessel, J.C., Rutherford, S.T., Shao, Y., Utria, A.F., and Bassler, B.L.** 2013. Individual and Combined Roles of the Master Regulators AphA and LuxR in Control of the *Vibrio harveyi* Quorum-Sensing Regulon. *J Bacteriol* **195**, 436–443.
- Keyhani, N.** 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1473**, 108–122.
- Khan, F., Tabassum, N., Anand, R., and Kim, Y.-M.** 2020. Motility of *Vibrio* spp.: regulation and controlling strategies. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 8187–8208.
- Kim, S.Y., Thanh, X.T.T., Jeong, K., Kim, S.B., Pan, S.O., Jung, C.H., Hong, S.H., Lee, S.E., and Rhee, J.H.** 2014. Contribution of Six Flagellin Genes to the Flagellum Biogenesis of *Vibrio vulnificus* and *In Vivo* Invasion. *Infect Immun* **82**, 29–42.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., and Parsek, M.R.** 2005. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4809–4821.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants: Roles of bacterial motility in the formation of the flat *P. aeruginosa* biofilm. *Molecular Microbiology* **48**, 1511–1524.
- Koch, C.M., Chiu, S.F., Akbarpour, M., Bharat, A., Ridge, K.M., Bartom, E.T., and Winter, D.R.** 2018. A Beginner’s Guide to Analysis of RNA Sequencing Data. *Am J Respir Cell Mol Biol* **59**, 145–157.
- Kodama, T., Rokuda, M., Park, K.-S., Cantarelli, V.V., Matsuda, S., Iida, T., and Honda, T.** 2007. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase

- effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cell Microbiol* **9**, 2598–2609.
- Koh, K.S., Lam, K.W., Alhede, M., Queck, S.Y., Labbate, M., Kjelleberg, S., and Rice, S.A.** 2007. Phenotypic Diversification and Adaptation of *Serratia marcescens* MG1 Biofilm-Derived Morphotypes. *J Bacteriol* **189**, 119–130.
- Kondo, K., Takade, A., and Amako, K.** 1993. Release of the Outer Membrane Vesicles from *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology* **37**, 149–152.
- Korotkov, K.V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J.** 2012. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**, 336–351.
- Kosarewicz, A., Königsmaier, L., and Marlovits, T.C.** 2012. The blueprint of the type-3 injectisome. *Phil. Trans. R. Soc. B* **367**, 1140–1154.
- Kovacikova, G., Lin, W., and Skorupski, K.** 2010. The LysR-Type Virulence Activator AphB Regulates the Expression of Genes in *Vibrio cholerae* in Response to Low pH and Anaerobiosis. *J Bacteriol* **192**, 4181–4191.
- Kovacikova, G., and Skorupski, K.** 1999. A *Vibrio cholerae* LysR Homolog, AphB, Cooperates with AphA at the *tcpPH* Promoter To Activate Expression of the ToxR Virulence Cascade. *J Bacteriol* **181**, 4250–4256.
- Kovacikova, G., and Skorupski, K.** 2001. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter: Overlapping binding sites at the *tcpPH* promoter. *Molecular Microbiology* **41**, 393–407.
- Koza, A., Hallett, P.D., Moon, C.D., and Spiers, A.J.** 2009. Characterization of a novel air-liquid interface biofilm of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Microbiology* **155**, 1397–1406.
- Kurtz, J.** 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology* **26**, 186–192.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., and Paillard, C.** 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 225–240.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L.** 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357–359.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D.** 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* Mutant Lacking the Metalloprotease Gene *vsm* by Use of a Novel Counterselectable Suicide Vector. *Appl Environ Microbiol* **73**, 777–784.
- Lee, K.-J., Kim, J.-A., Hwang, W., Park, S.-J., and Lee, K.-H.** 2013. Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*: Quorum-sensing represses CPS production and biofilm. *Molecular Microbiology* **90**, 841–857.

- Lee, K.-K., Liu, P.-C., Chen, Y.-C., and Huang, C.-Y.** 2001. The implication of ambient temperature with the outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke. *Journal of Thermal Biology* **26**, 585–587.
- Lee, K.K., Liu, P.C., and Chuang, W.H.** 2002. Pathogenesis of Gastroenteritis Caused by *Vibrio carchariae* in Cultured Marine Fish. *Marine Biotechnology* **4**, 267–277.
- Lee, K.-K., Yu, S.-R., Yang, T.-I., Liu, P.-C., and Chen, F.-R.** 1996. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Lett Appl Microbiol* **22**, 111–114.
- Lee, V.T., and Schneewind, O.** 1999. Type III machines of pathogenic yersiniae secrete virulence factors into the extracellular milieu. *Mol Microbiol* **31**, 1619–1629.
- Lee, W. et al.** 2018. *Vibrio vulnificus* quorum-sensing molecule cyclo(Phe-Pro) inhibits RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Nat Commun* **9**, 1606.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L.** 2004. The Small RNA Chaperone Hfq and Multiple Small RNAs Control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**, 69–82.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., and Faucher, S.P.** 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., and Jia, M.** 2019. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research* **222**, 43–51.
- Li, W., Wang, J.J., Qian, H., Tan, L., Zhang, Z., Liu, H., Pan, Y., and Zhao, Y.** 2020. Insights Into the Role of Extracellular DNA and Extracellular Proteins in Biofilm Formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* **11**, 813.
- Lilley, B.N., and Bassler, B.L.** 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. *Mol Microbiol* **36**, 940–954.
- Limoli, D.H., Jones, C.J., and Wozniak, D.J.** 2015. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. 19.
- Lin, B., Wang, Z., Malanoski, A.P., O’Grady, E.A., Wimpee, C.F., Vuddhakul, V., Alves Jr, N., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., and Vora, G.J.** 2009. Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*: *Vibrio campbellii* BAA-1116 and HY01. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 81–89.
- Liu, M., Nie, H., Luo, X., Yang, S., Chen, H., and Cai, P.** 2022. A Polysaccharide Biosynthesis Locus in *Vibrio parahaemolyticus* Important for Biofilm Formation Has Homologs Widely Distributed in Aquatic Bacteria Mainly from *Gammaproteobacteria*. *mSystems* **7**, e01226-21.
- Liu, P.-C., Chen, Y.-C., Huang, C.-Y., and Lee, K.-K.** 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Lett Appl Microbiol* **31**, 433–437.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Liverman, A.D.B., Cheng, H.-C., Trosky, J.E., Leung, D.W., Yarbrough, M.L., Burdette, D.L., Rosen, M.K., and Orth, K.** 2007. Arp2/3-independent assembly of actin by *Vibrio* type III effector VopL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 17117–17122.
- Lorenz, N., Shin, J.Y., and Jung, K.** 2017. Activity, Abundance, and Localization of Quorum Sensing Receptors in *Vibrio harveyi*. *Front. Microbiol.* **8**.
- Lu, J., Shi, Y., Cai, S., and Feng, J.** 2017. Metabolic responses of *Haliotis diversicolor* to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish & Shellfish Immunology* **60**, 265–274.
- Ludvik, D.A., Bultman, K.M., and Mandel, M.J.** 2021. Hybrid Histidine Kinase BinK Represses *Vibrio fischeri* Biofilm Signaling at Multiple Developmental Stages. *J Bacteriol* **203**.
- Lukaszczyk, M., Pradhan, B., and Remaut, H.** 2019. The Biosynthesis and Structures of Bacterial Pili, pp. 369–413. In Kuhn, A., ed, *Bacterial Cell Walls and Membranes, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham.
- Luo, G., Huang, L., Su, Y., Qin, Y., Xu, X., Zhao, L., and Yan, Q.** 2016. *flrA*, *flrB* and *flrC* regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*. *Emerging Microbes & Infections* **5**, 1–11.
- Madec, S., Pichereau, V., Jacq, A., Paillard, M., Boisset, C., Guérard, F., Paillard, C., and Nicolas, J.-L.** 2014. Characterization of the Secretomes of Two *Vibrios* Pathogenic to Mollusks. *PLoS ONE* **9**, e113097.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J.S., and Kjelleberg, S.** 2004. Biofilm Development and Cell Death in the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3232–3238.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J.S., Sanchez-Amat, A., and Kjelleberg, S.** 2008. Hydrogen Peroxide Linked to Lysine Oxidase Activity Facilitates Biofilm Differentiation and Dispersal in Several Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* **190**, 5493–5501.
- Mai-Prochnow, A., Webb, J.S., Ferrari, B.C., and Kjelleberg, S.** 2006. Ecological Advantages of Autolysis during the Development and Dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* Biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5414–5420.
- Manganaro, M., Laurà, R., Guerrero, M.C., Lanteri, G., Zaccone, D., and Marino, F.** 2012. The morphology of gills of *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758): The gills of *Haliotis*. *Acta Zoologica* **93**, 436–443.
- Markov, E.Yu., Kulikalova, E.S., Urbanovich, L.Ya., Vishnyakov, V.S., and Balakhonov, S.V.** 2015. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. *Biochemistry Moscow* **80**, 1109–1116.

- Martí, S., Rodríguez-Baño, J., Catel-Ferreira, M., Jouenne, T., Vila, J., Seifert, H., and Dé, E.** 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes* **4**, 5.
- Martin, M., Portetelle, D., Michel, G., and Vandenberg, M.** 2014. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 2917–2935.
- Matlawska-Wasowska, K., Finn, R., Mustel, A., O’Byrne, C.P., Baird, A.W., Coffey, E.T., and Boyd, A.** 2010. The *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion Systems manipulate host cell MAPK for critical steps in pathogenesis. *BMC Microbiol* **10**, 329.
- Mattick, J.S.** 2002. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289–314.
- McAvaney, L.A., Day, R.W., Dixon, C.D., and Huchette, S.M.** GONAD DEVELOPMENT IN SEEDED HALIOTIS LAEVIGATA: GROWTH ENVIRONMENT DETERMINES INITIAL REPRODUCTIVE INVESTMENT. 7.
- McCarter, L.L.** 2004. Dual Flagellar Systems Enable Motility under Different Circumstances. *Microb Physiol* **7**, 18–29.
- McCarter, L.L.** 2001. Polar Flagellar Motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 445–462.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S.** 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10**, 39–50.
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y., and Schoolnik, G.K.** 2005. Chitin Induces Natural Competence in *Vibrio cholerae*. *Science* **310**, 1824–1827.
- Mgaya, Y.D.** Synopsis of biological data on the european abalone (Ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae).
- Miethke, M., and Marahiel, M.A.** 2007. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 413–451.
- Milton, D.L.** 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 61–71.
- Montánchez, I., and Kaberdin, V.R.** 2020. *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Marine Environmental Research* **154**, 104850.
- Montgomery, M.T., and Kirchman, D.L.** 1994. Induction of Chitin-Binding Proteins during the Specific Attachment of the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* to Chitin. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4284–4288.
- Morash, A.J., and Alter, K.** 2016. Effects of environmental and farm stress on abalone physiology: perspectives for abalone aquaculture in the face of global climate change. *Rev Aquacult* **8**, 342–368.

- Morot, A. et al.** 2021. Virulence of *Vibrio harveyi* ORM4 towards the European abalone *HALIOTIS TUBERCULATA* involves both quorum sensing and a type III secretion system. *Environmental Microbiology* **23**, 5273–5288.
- Morris, A.R., and Visick, K.L.** 2010. Control of biofilm formation and colonization in *Vibrio fischeri*: a role for partner switching?: Partner switching in *Vibrio fischeri*. *Environmental Microbiology* no-no.
- Morris, A.R., and Visick, K.L.** 2013. Inhibition of SypG-Induced Biofilms and Host Colonization by the Negative Regulator SypE in *Vibrio fischeri*. *PLoS ONE* **8**, e60076.
- Naidoo, K., Maneveldt, G., Ruck, K., and Bolton, J.J.** 2006. A Comparison of Various Seaweed-Based Diets and Formulated Feed on Growth Rate of Abalone in a Land-Based Aquaculture System. *J Appl Phycol* **18**, 437–443.
- Nanra, J.S. et al.** 2013. Capsular polysaccharides are an important immune evasion mechanism for *Staphylococcus aureus*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **9**, 480–487.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W.** 1970. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J Bacteriol* **104**, 313–322.
- Ng, C., Goh, S.G., Saeidi, N., Gerhard, W.A., Gunsch, C.K., and Gin, K.Y.H.** 2018. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor. *Science of The Total Environment* **610–611**, 651–656.
- Ng, W., Perez, L.J., Wei, Y., Kraml, C., Semmelhack, M.F., and Bassler, B.L.** 2011. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Molecular Microbiology* **79**, 1407–1417.
- Ng, W.-L., and Bassler, B.L.** 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222.
- Nguyen, A.N., Disconzi, E., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., Bouloc, P., Le Roux, F., and Jacq, A.** 2018. *csrB* Gene Duplication Drives the Evolution of Redundant Regulatory Pathways Controlling Expression of the Major Toxic Secreted Metalloproteases in *Vibrio tasmaniensis* LGP32. *mSphere* **3**, e00582-18.
- Nicolas, J., Basuyaux, O., Mazurié, J., and Thébault, A.** 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* **50**, 35–43.
- Nielsen, A.T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K.B., and Molin, S.** 2000. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ Microbiol* **2**, 59–68.
- Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T., and Wakabayashi, H.** 1998. *Vibrio carchariae* Causes Mass Mortalities in Japanese Abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathol.* **33**, 495–502.
- Nottage, A.S., and Birkbeck, T.H.** 1987. Production of proteinase during experimental infection of *Ostrea edulis* L. larvae with *Vibrio alginolyticus* NCMB 1339 and the

- antigenic relationship between proteinases produced by marine vibrios pathogenic for fish and shellfish. *J Fish Diseases* **10**, 265–273.
- Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., and Honda, T.** 2005. Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes. *J Bacteriol* **187**, 752–757.
- Okshevsky, M., and Meyer, R.L.** 2015. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* **41**, 341–352.
- de Oliveira David, J.A., Salaroli, R.B., and Fontanetti, C.S.** 2008. Fine structure of *Mytella falcata* (Bivalvia) gill filaments. *Micron* **39**, 329–336.
- Ono, T., Park, K.-S., Ueta, M., Iida, T., and Honda, T.** 2006. Identification of Proteins Secreted via *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion System 1. *Infect Immun* **74**, 1032–1042.
- Osuolale, O., and Okoh, A.** 2018. Isolation and antibiotic profile of *Vibrio* spp. in final effluents of two wastewater treatment plants in the Eastern Cape of South Africa. *Microbiology*.
- Paillard, C., Le Roux, F., and Borrego, J.J.** 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**, 477–498.
- Pales Espinosa, E., Koller, A., and Allam, B.** 2016. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Proteomics* **132**, 63–76.
- Pallen, M.J., and Matzke, N.J.** 2006. From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nat Rev Microbiol* **4**, 784–790.
- Pang, Y., Guo, X., Tian, X., Liu, F., Wang, L., Wu, J., Zhang, S., Li, S., and Liu, B.** 2019. Developing a novel molecular serotyping system based on capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* **309**, 108332.
- Papenfort, K., and Bassler, B.L.** 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**, 576–588.
- Passos da Silva, D., Matwichuk, M.L., Townsend, D.O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D.J., and Parsek, M.R.** 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat Commun* **10**, 2183.
- Pees, B., Yang, W., Zárate-Potes, A., Schulenburg, H., and Dierking, K.** 2016. High Innate Immune Specificity through Diversified C-Type Lectin-Like Domain Proteins in Invertebrates. *J Innate Immun* **8**, 129–142.
- Pena, L.D. de la, Nakai, T., and Muroga, K.** 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in Organs of Orally Infected Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.* **30**, 39–45.

- Pena, R.T. et al.** 2019. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front. Microbiol.* **10**, 1100.
- Perera, N.C.N., Godahewa, G.I., and Lee, J.** 2016. Mitogen-activated protein kinase 1 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Roles in early development and immunity-related transcriptional responses. *Fish & Shellfish Immunology* **59**, 57–65.
- Pichon, D., Cudennec, B., Huchette, S., Djediat, C., Renault, T., Paillard, C., and Auzoux-Bordenave, S.** 2013. Characterization of abalone *Haliotis tuberculata*–*Vibrio harveyi* interactions in gill primary cultures. *Cytotechnology* **65**, 759–772.
- Pratt, L.A., and Kolter, R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology* **30**, 285–293.
- Priyathilaka, T.T., Bathige, S.D.N.K., Lee, S., Nam, B.-H., and Lee, J.** 2019. Transcriptome-wide identification, functional characterization, and expression analysis of two novel invertebrate-type Toll-like receptors from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish & Shellfish Immunology* **84**, 802–815.
- Pruzzo, C., Crippa, A., Bertone, S., Pane, L., and Carli, A.** 1996. Attachment of *Vibrio alginolyticus* to chitin mediated by chitin-binding proteins. *Microbiology* **142**, 2181–2186.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Colwell, R.R.** 2008. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin: *V. cholerae* - chitin interactions. *Environmental Microbiology* **10**, 1400–1410.
- Pu, M., and Rowe-Magnus, D.A.** 2018. A Tad pilus promotes the establishment and resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to mechanical clearance. *npj Biofilms Microbiomes* **4**, 10.
- Ray, V.A., Driks, A., and Visick, K.L.** 2015. Identification of a Novel Matrix Protein That Promotes Biofilm Maturation in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **197**, 518–528.
- Ray, V.A., and Visick, K.L.** 2012. LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in *Vibrio fischeri*: LuxU regulates biofilm formation. *Molecular Microbiology* **86**, 954–970.
- Reguera, G., and Kolter, R.** 2005. Virulence and the Environment: a Novel Role for *Vibrio cholerae* Toxin-Coregulated Pili in Biofilm Formation on Chitin. *J Bacteriol* **187**, 3551–3555.
- Rivera, I.N.G., Souza, K.M.C., Souza, C.P., and Lopes, R.M.** 2013. Free-Living and Plankton-Associated Vibrios: Assessment in Ballast Water, Harbor Areas, and Coastal Ecosystems in Brazil. *Front. Microbio.* **3**.
- Rodrigues, S., Paillard, C., Le Pennec, G., Dufour, A., and Bazire, A.** 2015. *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease, Forms Biofilms with Spherical Components. *Front. Microbiol.* **6**.

- Rodrigues, S., Paillard, C., Van Dillen, S., Tahrioui, A., Berjeaud, J.-M., Dufour, A., and Bazire, A.** 2018. Relation between Biofilm and Virulence in *Vibrio tapetis*: A Transcriptomic Study. *Pathogens* **7**, 92.
- Ruhal, R., and Kataria, R.** 2021. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research* **251**, 126829.
- Rui, H.** 2009. Role of Alkaline Serine Protease, Asp, in *Vibrio alginolyticus* Virulence and Regulation of Its Expression by LuxO-LuxR Regulatory System. *J.Microbiol.Biotechnol* **19**, 431–438.
- Ruwandepika, H.A.D., Defoirdt, T., Bhowmick, P.P., Karunasagar, I., and Bossier, P.** 2011. Expression of virulence genes in luminescent and nonluminescent isogenic vibrios and virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*): Expression of virulence genes in nonluminescent vibrios. *Journal of Applied Microbiology* **110**, 399–406.
- Salomon, D., Guo, Y., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Gardner, K.H., and Orth, K.** 2013. Effectors of animal and plant pathogens use a common domain to bind host phosphoinositides. *Nat Commun* **4**, 2973.
- Sampaio, A., Silva, V., Poeta, P., and Aonofriesei, F.** 2022. *Vibrio* spp.: Life Strategies, Ecology, and Risks in a Changing Environment. *Diversity* **14**, 97.
- Sarkar, S.** 2020. Release mechanisms and molecular interactions of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 6549–6564.
- Sauer, K., and Camper, A.K.** 2001. Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth. *J Bacteriol* **183**, 6579–6589.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y., and Miura, H.** 2007a. Mass Mortality of Japanese Abalone *Haliotis discus hannai* Caused by *Vibrio harveyi* Infection. *Microb. Environ.* **22**, 300–308.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K., and Thompson, F.L.** 2007b. Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis. *J Bacteriol* **189**, 7932–7936.
- van Schaik, E.J., Giltner, C.L., Audette, G.F., Keizer, D.W., Bautista, D.L., Slupsky, C.M., Sykes, B.D., and Irvin, R.T.** 2005. DNA Binding: a Novel Function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pili. *J Bacteriol* **187**, 1455–1464.
- Schikorski, D., Renault, T., Paillard, C., Bidault-Toffin, A., Tourbiez, D., and Saulnier, D.** 2013. Development of TaqMan real-time PCR assays for monitoring *Vibrio harveyi* infection and a plasmid harbored by virulent strains in European abalone *Haliotis tuberculata* aquaculture. *Aquaculture* **392–395**, 106–112.
- Selvin, J., and Lipton, A.** 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* **57**, 147–150.

- Sentausa, E., and Fournier, P.-E.** 2013. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infection* **19**, 790–795.
- Seper, A., Fengler, V.H.I., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Bishop, A.L., Camilli, A., Reidl, J., and Schild, S.** 2011. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology* **82**, 1015–1037.
- Shen, D.K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., and Toussaint, B.** 2006. PsrA Is a Positive Transcriptional Regulator of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**, 1121–1129.
- Shibata, S., and Visick, K.L.** 2012. Sensor Kinase RscS Induces the Production of Antigenically Distinct Outer Membrane Vesicles That Depend on the Symbiosis Polysaccharide Locus in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology* **194**, 185–194.
- Shibata, S., Yip, E.S., Quirke, K.P., Ondrey, J.M., and Visick, K.L.** 2012. Roles of the Structural Symbiosis Polysaccharide (*syp*) Genes in Host Colonization, Biofilm Formation, and Polysaccharide Biosynthesis in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **194**, 6736–6747.
- Shimohata, T. et al.** 2011. *Vibrio parahaemolyticus* Infection Induces Modulation of IL-8 Secretion Through Dual Pathway via VP1680 in Caco-2 Cells. *The Journal of Infectious Diseases* **203**, 537–544.
- Sikora, A.E., Zielke, R.A., Lawrence, D.A., Andrews, P.C., and Sandkvist, M.** 2011. Proteomic Analysis of the *Vibrio cholerae* Type II Secretome Reveals New Proteins, Including Three Related Serine Proteases. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 16555–16566.
- Singh, P.K., Bartalomej, S., Hartmann, R., Jeckel, H., Vidakovic, L., Nadell, C.D., and Drescher, K.** 2017. *Vibrio cholerae* Combines Individual and Collective Sensing to Trigger Biofilm Dispersal. *Current Biology* **27**, 3359-3366.e7.
- Somboonwivat, K., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I., and Tassanakajon, A.** 2006. Differentially Expressed Genes in Hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged Shrimp *Penaeus monodon*. *BMB Reports* **39**, 26–36.
- Soto-Rodriguez, S., Roque, A., Lizarraga-Partida, M., Guerra-Flores, A., and Gomez-Gil, B.** 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis. Aquat. Org.* **53**, 231–240.
- Stabb, E.V., and Ruby, E.G.** 2002. RP4-based plasmids for conjugation between *Escherichia coli* and members of the vibrionaceae, pp. 413–426. *Methods in Enzymology*. Elsevier.
- Stahli, A., Schaerer, R., Hoelzle, K., and Ribi, G.** 2009. Temperature induced disease in the starfish *Astropecten jonstoni*. *Mar. Biodivers. Rec.* **2**, e78.
- Staroscik, A.M., and Nelson, D.R.** 2007. The influence of salmon surface mucus on the growth of *Flavobacterium columnare*: Growth of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases* **31**, 59–69.

- Stewart, B.J., and McCarter, L.L.** 2003. Lateral Flagellar Gene System of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**, 4508–4518.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J.** 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199–210.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W.** 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209.
- Sudheesh, P.S., and Xu, H.-S.** 2001. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* **196**, 37–46.
- Suginta, W.** 2007. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 212–220.
- Sun, B., Zhang, X.-H., Tang, X., Wang, S., Zhong, Y., Chen, J., and Austin, B.** 2007. A Single Residue Change in *Vibrio harveyi* Hemolysin Results in the Loss of Phospholipase and Hemolytic Activities and Pathogenicity for Turbot (*Scophthalmus maximus*). *J Bacteriol* **189**, 2575–2579.
- Sun, J., Li, X., Qiu, Y., Xue, X., Zhang, M., Yang, W., Zhou, D., Hu, L., Lu, R., and Zhang, Y.** 2022. Quorum sensing regulates transcription of the pilin gene *mshA1* of MSHA pilus in *Vibrio parahaemolyticus*. *Gene* **807**, 145961.
- Sun, Y., Zhang, X., Wang, Y., Day, R., Yang, H., and Zhang, Z.** 2019. Immunity-related genes and signaling pathways under hypoxic stresses in *Haliotis diversicolor*: a transcriptome analysis. *Sci Rep* **9**, 19741.
- Svitil, A.L., Chadhain, S., Moore, J.A., and Kirchman, D.L.** 1997. Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin. *Appl Environ Microbiol* **63**, 408–413.
- Swartzman, E., Silverman, M., and Meighen, E.A.** 1992. The *luxR* gene product of *Vibrio harveyi* is a transcriptional activator of the *lux* promoter. *J Bacteriol* **174**, 7490–7493.
- Takemura, A.F., Chien, D.M., and Polz, M.F.** 2014. Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front. Microbiol.* **5**.
- Tamayo, R., Patimalla, B., and Camilli, A.** 2010. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **78**, 3560–3569.
- Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyoshi, S.-I., Shinoda, S., and Yamamoto, S.** 2003. Identification and Characterization of Genes Required for Biosynthesis and Transport of the Siderophore Vibrioferrin in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**, 6938–6949.
- Tanabe, T., Funahashi, T., Okajima, N., Nakao, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.** 2011. The *Vibrio parahaemolyticus* *pvuA1* gene (formerly

- termed psuA) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires tonB2. *FEMS Microbiol Lett* **324**, 73–79.
- Taniguchi, H., Hirano, H., Kubomura, S., Higashi, K., and Mizuguchi, Y.** 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis* **1**, 425–432.
- Teo, J.W.P., Zhang, L.-H., and Poh, C.L.** 2003. Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **303**, 147–156.
- Teschler, J.K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A.S., Warner, C.J.A., Wong, G.C.L., Linington, R.G., and Yildiz, F.H.** 2015. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol* **13**, 255–268.
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., and Quirynen, M.** 2006. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* **17**, 68–81.
- Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J.G., and American Society for Microbiology eds.** 2006. The biology of vibrios. ASM Press, Washington, D.C.
- Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T.R., and Sawabe, T.** 2007. Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* Are Distinct Species. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4279–4285.
- Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J.** 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 403–431.
- Tiruvayipati, S., and Bhassu, S.** 2016. Host, pathogen and environment: a bacterial gbpA gene expression study in response to magnesium environment and presence of prawn carapace and commercial chitin. *Gut Pathog* **8**, 23.
- Tiscar, P.G., and Mosca, F.** 2004. Defense Mechanisms in Farmed Marine Molluscs. *Vet Res Commun* **28**, 57–62.
- Tischler, A.H., Hodge-Hanson, K.M., and Visick, K.L.** 2019. *Vibrio fischeri* –Squid Symbiosis, pp. 1–9. In John Wiley & Sons, Ltd, ed, eLS, 1st ed. Wiley.
- Tolker-Nielsen, T., and Sternberg, C.** 2014. Methods for Studying Biofilm Formation: Flow Cells and Confocal Laser Scanning Microscopy, pp. 615–629. In Filloux, A. and Ramos, J.-L., eds, *Pseudomonas Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY.
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., and Eberl, L.** 2012. Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J. Proteome Res.* **11**, 4906–4915.
- Tran, L., Nunan, L., Redman, R., Mohney, L., Pantoja, C., Fitzsimmons, K., and Lightner, D.** 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* **105**, 45–55.

- Travers, M.-A.** Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'ormeau *Haliotis tuberculata* : approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. 269.
- Travers, M.-A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C., and Koken, M.** 2008a. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiology Letters* **289**, 34–40.
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M., and Paillard, C.** 2009a. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi* : an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* **15**, 1365–1376.
- Travers, M.-A., Le Bouffant, R., Friedman, C.S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., Koken, M., and Paillard, C.** 2009b. Pathogenic *Vibrio harveyi* , in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *J. Cell. Biochem.* **106**, 152–160.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., and Paillard, C.** 2008b. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 800–808.
- Travers, M.-A., Mirella da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., and Paillard, C.** 2008c. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology* **24**, 400–411.
- Trosky, J.E., Mukherjee, S., Burdette, D.L., Roberts, M., McCarter, L., Siegel, R.M., and Orth, K.** 2004. Inhibition of MAPK Signaling Pathways by VopA from *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 51953–51957.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., and Hirata, A.** 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* **223**, 287–292.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., and Scoullou, M.** 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, 178–189.
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A.** 2016. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS ONE* **11**, e0157022.
- Vayssier-Taussat, M. et al.** 2014. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., and Schué, F.** 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* **84**, 377–410.

- Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., and Nesse, L.L. 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* **9**, 59.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M., and Pruzzo, C. 2015. Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiol Spectr* **3**.
- Vezzulli, L., Pruzzo, C., Huq, A., and Colwell, R.R. 2010. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera: Environmental reservoirs of *V. cholerae*. *Environmental Microbiology Reports* **2**, 27–33.
- Visick, K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., and Ruby, E.G. 2000. *Vibrio fischeri lux* Genes Play an Important Role in Colonization and Development of the Host Light Organ. *J Bacteriol* **182**, 4578–4586.
- Volety, A., McCarthy, S., Tall, B., Curtis, S., Fisher, W., and Genthner, F. 2001. Responses of oyster *Crassostrea virginica* hemocytes to environmental and clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquat. Microb. Ecol.* **25**, 11–20.
- Wang, H., Chen, S., Zhang, J., Rothenbacher, F.P., Jiang, T., Kan, B., Zhong, Z., and Zhu, J. 2012a. Catalases Promote Resistance of Oxidative Stress in *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE* **7**, e53383.
- Wang, N., Whang, I., and Lee, J. 2008. A novel C-type lectin from abalone, *Haliotis discus discus*, agglutinates *Vibrio alginolyticus*. *Developmental & Comparative Immunology* **32**, 1034–1040.
- Wang, Q. 2022. Comparative Transcriptome Analysis Reveals Regulatory Factors Involved in *Vibrio Parahaemolyticus* Biofilm Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **12**, 11.
- Wang, R., Fang, S., Wu, D., Lian, J., Fan, J., Zhang, Y., Wang, S., and Lin, W. 2012b. Screening for a Single-Chain Variable-Fragment Antibody That Can Effectively Neutralize the Cytotoxicity of the *Vibrio parahaemolyticus* Thermolabile Hemolysin. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4967–4975.
- Wang, R., Zhong, Y., Gu, X., Yuan, J., Saeed, A.F., and Wang, S. 2015. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* **6**.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **32**.
- Webber, H.H., and Giese, A.C. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Marine Biology* **4**, 152–159.
- Weiss Nielsen, M., Sternberg, C., Molin, S., and Regenber, B. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* Biofilm in Flow Cells. *JoVE* 2383.
- Wu, L. et al. 2005. Recognition of Host Immune Activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **309**, 774–777.

- Xu, M., Xu, M., and Tu, Q.** 2021. Comparative evaluation of *Vibrio* delineation methodologies in post-genomic era. *Environmental Microbiology Reports* **13**, 209–217.
- Xu, Q., Dziejman, M., and Mekalanos, J.J.** 2003. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1286–1291.
- Yakovleva, N.V., Samoilovich, M.P., and Gorbushin, A.M.** 2001. The Diversity of Strategies of Defense from Pathogens in Molluscs. **37**, 10.
- Yang, L., Nilsson, M., Gjermansen, M., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T.** 2009. Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation: Subpopulation interactions in *P. aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology* **74**, 1380–1392.
- Yang, Q., and Defoirdt, T.** 2015. Quorum sensing positively regulates flagellar motility in pathogenic *Vibrio harveyi*: QS regulation of motility in *Vibrio harveyi*. *Environ Microbiol* **17**, 960–968.
- Yildiz, F.H., and Schoolnik, G.K.** 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4028–4033.
- Yildiz, F.H., and Visick, K.L.** 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology* **17**, 109–118.
- Yip, E.S., Geszvain, K., DeLoney-Marino, C.R., and Visick, K.L.** 2006. The symbiosis regulator RscS controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* **62**, 1586–1600.
- Yip, E.S., Grublesky, B.T., Husa, E.A., and Visick, K.L.** 2005. A novel, conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and σ^{54} -dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*: *Syp*, a novel symbiosis locus in *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology* **57**, 1485–1498.
- Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., and Orth, K.** 2012. Type III Effector VopC Mediates Invasion for *Vibrio* Species. *Cell Reports* **1**, 453–460.
- Zhang, W., Sun, K., Cheng, S., and Sun, L.** 2008. Characterization of DegQ_{vh}, a Serine Protease and a Protective Immunogen from a Pathogenic *Vibrio harveyi* Strain. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6254–6262.
- Zhang, X.-H., and Austin, B.** 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* **98**, 1011–1019.
- Zhang, X.-H., He, X., and Austin, B.** 2020. *Vibrio harveyi*: a serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Mar Life Sci Technol* **2**, 231–245.
- Zhang, X.-H., Meaden, P.G., and Austin, B.** 2001. Duplication of Hemolysin Genes in a Virulent Isolate of *Vibrio harveyi*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3161–3167.

- Zhang, X.-J., Yan, B.-L., Bai, X.-S., Bi, K.-R., Gao, H., and Qin, G.-M.** 2014. Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* Associated with Mass Mortality of Chinese Shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of Shellfish Research* **33**, 61–68.
- Zhang, Y., Deng, Y., Feng, J., Guo, Z., Chen, H., Wang, B., Hu, J., Lin, Z., and Su, Y.** 2021. Functional characterization of VscCD, an important component of the type III secretion system of *Vibrio harveyi*. *Microbial Pathogenesis* **157**, 104965.
- Zhao, Z., Chen, C., Hu, C.-Q., Ren, C.-H., Zhao, J.-J., Zhang, L.-P., Jiang, X., Luo, P., and Wang, Q.-B.** 2010. The type III secretion system of *Vibrio alginolyticus* induces rapid apoptosis, cell rounding and osmotic lysis of fish cells. *Microbiology* **156**, 2864–2872.
- Zhao, Z., Liu, J., Deng, Y., Huang, W., Ren, C., Call, D.R., and Hu, C.** 2018. The *Vibrio alginolyticus* T3SS effectors, Val1686 and Val1680, induce cell rounding, apoptosis and lysis of fish epithelial cells. *Virulence* **9**, 318–330.
- Zhou, X., Gewurz, B.E., Ritchie, J.M., Takasaki, K., Greenfeld, H., Kieff, E., Davis, B.M., and Waldor, M.K.** 2013. A *Vibrio parahaemolyticus* T3SS Effector Mediates Pathogenesis by Independently Enabling Intestinal Colonization and Inhibiting TAK1 Activation. *Cell Reports* **3**, 1690–1702.
- Zhu, S., Kojima, S., and Homma, M.** 2013. Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. *Front. Microbiol.* **4**.
- Zoysa, M.D., Nikapitiya, C., Oh, C., Whang, I., Lee, J.-S., Jung, S.-J., Choi, C.Y., and Lee, J.** 2010. Molecular evidence for the existence of lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF) and Rel/NF- κ B pathways in disk abalone (*Haliotis discus discus*). 10.

ANNEXES

ANNEXE 1 : DONNÉES COMPLÉMENTAIRES

ANNEXE 1 : AMORCES UTILISÉES AU COURS DE LA THÈSE

Tableau 11 : Amorces utilisées au cours de cette thèse

Numéro amorce	Nom amorce	Séquence nucléotidique	Cible
170509	Gfp-R	CAAGAAGGACCATG TGGT	Primer annealing close to the end of the gfp gene, and orientated towards ATG
170515	M13 FOR(-41)	GTTTTCCCAGTCACG AC	Universal primer used for verifying insertion within pGEM-T and sequencing
170516	M13 REV	CAGGAAACAGCTAT GACC	Universal primer used for verifying insertion within pGEM-T and sequencing
170601	Up-exsA-orm4- EcoRI-F	TTTTTGAATTCcctgttc agtactcgggtg	Forward primer used to amplify the region upstream of exsA in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD060
170602	Up-exsA-orm4-R	Ctgtgttagttggcctaac	Reverse primer used to amplify the region upstream of exsA in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD060
170603	Dn-exsA-orm4- rcup-F	gtaggccaactaacaca Ggagatgaacaagtagca attg	Forward primer used to amplify the region downstream of exsA in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD060
170605	Del-exsA-ORM4-F	Ccagtgagtactctgtaa g	Forward primer annealing upstream of exsA. Used to verify integration of pFD067 in <i>V. harveyi</i> ORM4 and to verify the presence of exsA
170606	Del-exsA-orm4-R	Ccactctcaaccaatgctc	Reverse primer annealing downstream of exsA. Used to verify integration of pFD067 in <i>V. harveyi</i> ORM4 and to verify the presence of exsA
170711	dn-exsA-orm4- NheI-R	TTTTTGTAGAGcgtct taatcagttccagttg	Reverse primer used to amplify the region downstream of exsA in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD060
170901	Insert-pLP12-F	Gctcgagggaataataagtc g	Forward primer annealing upstream of the multiple cloning site of pLP12
170902	Insert-pLP12-R	Cggctgacatgggaattgc	Reverse primer annealing downstream of the multiple cloning site of pLP12
171003	Prom-exsA-XbaI-F	TTTTTCTAGAGgactt aaagctagaagctta	Forward primer used to amplify the PexsA promoter of <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD090
171004	Prom-exsA-Sall-R	TTTTTGTGACcctgtgt ttagttggcctaac	Reverse primer used to amplify the PexsA promoter of <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD090
171201	In-exsA-F	Gccaaaggttgagaatggt c	Forward primer annealing within exsA. Used to verify the presence of exsA
171202	In-exsA-R	gcaataaacgacgttact g	Reverse primer annealing within exsA. Used to verify the presence of exsA
180301	Up-aphB-F-EcoRI	TTTTTGAATTCgatcc gctctgagttcaag	Primer annealing 2.7 kb upstream of the aphB gene of <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards. Has been used in combination with 180302, 180303 and 180304 to obtain strain 148

180302	Up-aphB-R	TTTTTTCgtgattgcttac aacattca	Primer annealing at the beginning of aphB in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing outwards. Has been used in combination with 180301, 180303 and 180304 to obtain strain 148
180303	Dn-aphB-rc-up-F	TTTTTTGAATGTTGT AAGCAATCACGcgaa acaggttagatcatct	Primer annealing at the end of aphB in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing outwards. Has been used in combination with 180301, 180302 and 180304 to obtain strain 148
180304	Dn-aphB-Xbal-R	TTTTTTCTAGAggca gtccgaatctccag	Primer annealing 750 bp downstream of aphB in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards. Has been used in combination with 180301, 180302 and 180303 to obtain strain 148
180308	Del-aphB-F	Cataccgccaaggtttgtg	Primer annealing 2.8 kb upstream of aphB in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards
180309	Del-aphB-R	Ccctgagaggtgtcttct	Primer annealing 800 bp downstream of aphB in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards.
180311	Compl-exsA-NheI-F	TTTTTGCTAGCggact taaagctagaagctta	Forward primer annealing upstream of exsA and its promoter. Used to construct pFD067
180312	Compl-exsA-BamHI-R	TTTTTGGATCCtact tagcaattgctactg	Reverse primer annealing upstream of exsA and its promoter. Used to construct pFD067
180313	Up-flaK-Xbal-F	TTTTTTCTAGAgctac ataagttccgttatgg	Primer annealing around 700 bp upstream of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards. Used in combination with 180314, 180315 and 180316 to obtain strain 158
180314	Up-flaK-R	Gcagcttgccaaacctg	Primer annealing at the beginning of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing outwards. Used in combination with 180313, 180315 and 180316 to obtain strain 158
180315	Dn-flaK-rc-up-F	CAAGGTTTGGCAAA GCTGCggtataataca cctacagcg	Primer annealing at the end of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing outwards. Used in combination with 180313, 180314 and 180316 to obtain strain 158
180316	Dn-flaK-Xbal-R	TTTTTTCTAGAgcagc atatcattaacctgc	Primer annealing 700 bp downstream of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards. Used in combination with 180313, 180314 and 180315 to obtain strain 158
180317	Del-flaK-F	Gagcaatccgttggtgaag	Primer annealing 800 bp upstream of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards
180318	Del-flaK-R	Cagtgcggttccaccatg	Primer annealing 800 bp downstream of flaK in <i>V. harveyi</i> ORM4, facing inwards
180515	Compl-aphB-NheI-F	GCATGCTAGCgtttagt gaatgttgaagcaa	Primer annealing at the end of the aphB gene of ORM4. used in combination with 180516 (1259 bp) to obtain strain 188
180516	Compl-aphB-BamHI-R	GCATGGATCCggtcat cgtccaccaacatg	Primer annealing at the beginning of the aphB gene of ORM4. used in combination with 180515 (1259 bp) to obtain strain 188
180901	Del-luxO-F	Ggcttctgcttcagagc	Forward primer annealing upstream of luxO. Used to verify integration of pFD067 in <i>V. harveyi</i> ORM4 and to verify the presence of luxO
180902	Del-luxO-R	Cctacctgaattgggtaaa g	Reverse primer annealing downstream of luxO. Used to verify integration of pFD067 in <i>V. harveyi</i> ORM4 and to verify the presence of luxO
180903	Up-luxO-XhoI-F	GTACCTCGAGggtaaa gcatctttacgc	Forward primer used to amplify the region upstream of luxO in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD083
180904	Up-luxO-R	Cgagactttgacctctgt t	Reverse primer used to amplify the region upstream of luxO in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD083
180905	Dn-luxO-rc_up-F	aacagaaggtcaaaagtct cgGCTTGAATAGCA GGGACG	Forward primer used to amplify the region downstream of luxO in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD083

180906	dn-luxO-EcoRI-R	GTACGAATTCcaacttg agtccagagtatg	Reverse primer used to amplify the region downstream of luxO in <i>V. harveyi</i> ORM4. Used to construct pFD083
180907	Compl-luxO-NheI-F	GTACGCTAGCgagcag ttcatcgctaacag	Forward primer annealing upstream of luxO and its promoter. Used to construct pFD084
180908	Compl-luxO-BamHI-R	GTACGGATCCctatac gttttgttttctgccc	Reverse primer annealing upstream of luxO and its promoter. Used to construct pFD084
190301	Compl-flaK-XbaI-F2	GAGCTCTAGAcgacga cgttatcgacatca	Primer annealing at the beginning of the flaK gene of ORM4 (upstream of its putative promoter), facing inwards. Used in combination with 190302 (1884 bp expected) to obtain strain 304
190302	Compl-flaK-BamHI-R2	GTACGGATCCgaacttt ggctatcagataaac	Primer annealing at the end of the flaK gene of ORM4, facing inwards. Used in combination with 190301 (1884 bp expected) to obtain strain 304
190501	Up-luxR-XhoI-F	GTACCTCGAGgctcac aaaggtgtgcatg	Primer annealing around 800 bp upstream of luxR, facing inwards. Used in combination with 190502, 190504 and 190508 to create pGEM::up-dn-luxR (strain 321)
190502	Up-luxR-R	Catctacaaccgcgatcac	Primer annealing at the beginning of luxR, facing outwards. Used in combination with 190501, 190504 and 190508 to create pGEM::up-dn-luxR (strain 321)
190504	Dn-luxR-rc_up-F	ATCGCGTTGTAGAT Gggtctctttgcaattgagt	Primer annealing at the end of luxR, facing outwards. Used in combination with 190501, 190504 and 190508 to create pGEM::up-dn-luxR (strain 321)
190506	del-luxR-F	ccactcactaggttctaaag	Primer annealing around 900 bp upstream of luxR, facing inwards. used in combination with 190507 to test for the deletion of luxR
190507	del-luxR-R	cgtagtttacgggattgaa g	Primer annealing around 900 bp downstream of luxR, facing inwards. used in combination with 190506 to test for the deletion of luxR
190509	Dn-luxR-NheI-R	GTACGCTAGCctacga attcatcaggaatag	Primer annealing around 800 bp downstream of luxR, facing inwards. Used in combination with 190501, 190502 and 190504 to create pGEM::up-dn-luxR (strain 321)
190801	Compl-luxR-NheI-F	GATCGCTAGCgcttagt gatcgcggttgt	Primer annealing upstream of the luxR gene (HORM4_420032), facing inwards. Used in combination with 190802, 971 bp) to construct the complementation of luxR (strain 331)
190802	Compl-luxR-BamHI-R	GATCGGATCCgacttct actgtatgtttcata	Primer annealing at the end of the luxR gene(HORM4_420032), facing inwards. Used in combination with 190801, 971 bp) to construct the complementation of luxR (strain 331)
200801	In_HORM4_24009 9-F	AAGTCGACCAGATG CTGCTT	Forward primer used to amplify within the HORM4v2_240099 gene
200802	In_HORM4_24009 9-R	CAATCAACTGCGCTT TGT	Reverse primer used to amplify within the HORM4v2_240099 gene
200803	In_HORM4_24012 7-F	GTGAAGGGGTCGTG AGGTA	Forward primer used to amplify within the HORM4v2_240127 gene
200804	In_HORM4_24012 7-R	TCCATAAGCAGCAAG ACACG	Reverse primer used to amplify within the HORM4v2_240127 gene
200813	In_HORM4_11900 07-F	ATGGCTAAGGGGCA ATCTCT	Forward primer used to amplify within the HORM4v2_1190007 gene
200814	In_HORM4_11900 07-R	TGCGTGCTTGACAC CATTT	Reverse primer used to amplify within the HORM4v2_1190007 gene
211207	up_OmpV-F	ctagaccttgagtcgaattc taaagagcagcaactaca ag	Primer annealing around 1000 bp upstream of HORM4v2_1070102 gene, facing inwards. Used in combination

			with 211208, 211209 and 211210 to obtain the fragment used to delete ORF 1070102 in ORM4.
211208	up_OmpV-R	ggacagaacagcactcccc ctatttagac	Primer annealing around 1000 bp at the beginning of HORM4v2_1070102 gene, facing outward. Used in combination with 211207, 211209 and 211210 to obtain the fragment used to delete ORF 1070102 in ORM4.
211209	dn_OmpV-F	gggggagtgctGTTCTG TCCCAGTTGTTG	Primer annealing around 1000 bp downstream of HORM4v2_1070102 gene, facing inwards. Used in combination with 211208, 211207 and 211210 to obtain the fragment used to delete ORF 1070102 in ORM4.
211210	dn_OmpV-R	AGCGACGATATGTC GAGCTCtgtctgttcaag agctttac	Primer annealing around 1000 bp at the ending of HORM4v2_1070102 gene, facing outwards. Used in combination with 211208, 211209 and 211207 to obtain the fragment used to delete ORF 1070102 in ORM4.
220131	del-ompV-F	ggcaaagccaagcagctc at	Primer annealing around 800 bp upstream of ompV gene, facing inwards. used in combination with 220132 to test for the deletion of ompV gene
220132	del-ompV-R	gccaatgacgtgtgtattg	Primer annealing around 800 bp downstream of ompV gene, facing outwards. used in combination with 220131 to test for the deletion of ompV gene
220501	compl-ompV- BamHI-F	ATCGGGATCCggggag tgcttagaagttg	Primer annealing upstream of the ompV gene (HORM4_1070102), facing inwards. Used in combination with 220502 (805 bp) to construct the complementation of ompV (strain XXX)
220502	compl-ompV-NheI- R	ATGCATGCTAGCtggg acagaacaatgaaca	Primer annealing downstream of the ompV gene (HORM4_1070102), facing forwards Used in combination with 220501 (805 bp) to construct the complementation of ompV (strain XXX)
230201	flp-F	cgaggtgtaaccgctgtg aa	Primer used to amplify the HORM4_610121 gene, facing inwards. Used in combination with 230202 (51 pb)
230202	flp-R	tgatgacattgcaacagcg a	Primer used to amplify the HORM4_610121 gene, facing inwards. Used in combination with 230201 (51 pb)
230203	VscN-F	cctcgtcgtgttggtggttc	Primer used to amplify the HORM4_240127gene, facing inwards. Used in combination with 230204 (51 pb)
230204	VscN-R	agctcagcgtgagattggc t	Primer used to amplify the HORM4_240127 gene, facing inwards. Used in combination with 230203 (51 pb)
230205	VPA0450-F	tcgctgaggtcacatcatca a	Primer used to amplify the HORM4_520123 gene, facing inwards. Used in combination with 230206 (51 pb)
230206	VPA0450-R	agcctgatactgatccggc a	Primer used to amplify the HORM4_520123 gene, facing inwards. Used in combination with 230205 (51 pb)
230207	luxR-F	tgttttgcaccagcagttgg	Primer used to amplify the HORM4_420032 gene, facing inwards. Used in combination with 230208 (51 pb)
230208	luxR-R	ggccgctattcgtaacgac a	Primer used to amplify the HORM4_420032 gene, facing inwards. Used in combination with 230207 (51 pb)
230209	ompv-F	catcgtgtcacctagga acg	Primer used to amplify the HORM4_1070102 gene, facing inwards. Used in combination with 230210 (51 pb)
230210	ompv-R	tcaacgctgatttagcggt	Primer used to amplify the HORM4_1070102 gene, facing inwards. Used in combination with 230209 (51 pb)
230211	sypH-F	cgtaaggatgagccttac ga	Primer used to amplify the HORM4_640016 gene, facing inwards. Used in combination with 230212 (51 pb)

230212	sypH-R	gcctcagtcgccgtttctac	Primer used to amplify the <i>HORM4_640016</i> gene, facing inwards. Used in combination with 230211 (51 pb)
230213	920008-F	gaccttcgtcagaccaacg	Primer used to amplify the <i>HORM4_920008</i> gene, facing inwards. Used in combination with 230214 (51 pb)
230214	920008-R	tatcggctggtgcagttgc	Primer used to amplify the <i>HORM4_920008</i> gene, facing inwards. Used in combination with 230213 (51 pb)
230215	1130010-F	tcaaatagaagagttggctgcg	Primer used to amplify the <i>HORM4_1130010</i> gene, facing inwards. Used in combination with 230216 (51 pb)
230216	1130010-R	ggaccaaaaatccctttcaccg	Primer used to amplify the <i>HORM4_1130010</i> gene, facing inwards. Used in combination with 230215 (51 pb)

ANNEXE 1 : VALEURS FOLD-CHANGE DES REPRÉSENTATIONS HEATMAP DU CHAPITRE 3

Tableau 12 : Expressions des gènes associés à la motilité et l'adhésion lorsque *V. harveyi* ORM4 forme du biofilm, la condition planctonique *V. harveyi* ORM4 servant de contrôle (p-value ajustée < 0,05).

ORF	Gene	FC	COG	Produit
HORM4_v2_180020		0.424	N	flagellar biosynthesis protein flgN
HORM4_v2_180021		0.27	K	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_180023		0.445	T	chemotaxis protein CheV
HORM4_v2_180026	flgB	0.166	N	flagellar basal body rod protein FlgB
HORM4_v2_180027	flgC	0.206	N	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod
HORM4_v2_180028		0.336	N	flagellar basal body rod modification protein
HORM4_v2_180029		0.29	N	flagellar hook protein FlgE
HORM4_v2_180030	flgF	0.385	N	Flagella basal body rod protein FlgF
HORM4_v2_180037		0.373	N	flagellin
HORM4_v2_180038		0.315	N	flagellin
HORM4_v2_460050		0.236	N	flagellin
HORM4_v2_460051	flaG	0.16	N	Protein flaG
HORM4_v2_460052		0.342	N	flagellar capping protein
HORM4_v2_460054	fliS	0.492	N	flagellar protein FliS
HORM4_v2_170051		0.303	N	flagellar motor protein PomA
HORM4_v2_170052	motB	0.346	N	flagellar motor protein MotB
HORM4_v2_510008		0.528	N	sodium-type flagellar protein motY
HORM4_v2_1020003	flgK	2.785	N	putative flagellar hook-associated protein 1
HORM4_v2_1020004		3.524	N	putative flagellar protein
HORM4_v2_1020005	flgl	3.529	N	flagellar basal body P-ring protein
HORM4_v2_1020006	flgH	6.099	N	Flagellar L-ring protein 2
HORM4_v2_1020007	flgG	4.624	N	flagellar component of cell-distal portion of basal-body rod
HORM4_v2_1020008	flgF	6.017	N	Flagellar basal-body rod protein FlgF
HORM4_v2_1020009	flgE	7.182	N	flagellar hook protein
HORM4_v2_1020010		6.211	N	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_1020011	flgC	6.328	N	flagellar component of cell-proximal portion of basal-body rod
HORM4_v2_1020012	flgB	16.766	N	Flagellar basal-body rod protein flgB
HORM4_v2_970028	fliJ	3.437	UC	Flagellar export protein FliJ
HORM4_v2_970029	fliI	3.184	N	flagellum-specific ATP synthase
HORM4_v2_970030		5.9	N	Flagellar assembly protein FliH
HORM4_v2_970031		10.341	N	Flagellar motor protein
HORM4_v2_970032		9.928	N	Flagellar M-ring protein
HORM4_v2_970033	fliE	6.046	N	Flagellar hook-basal body complex protein FliE 1
HORM4_v2_970034	atoC	5.743	T	Acetoacetate metabolism regulatory protein AtoC
HORM4_v2_970035		5.752	S	Putative OmpA family protein
HORM4_v2_970037		11.904	N	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_970038		8.238	N	Flagellar motor switch protein
HORM4_v2_970039	fliP	8.843	N	flagellar biosynthesis protein
HORM4_v2_970040	fliQ	5.388	N	flagellar biosynthesis protein
HORM4_v2_970041	fliR	4.438	N	Flagellar biosynthetic protein fliR
HORM4_v2_970044		3.666	UC	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_970045	lafA	3.34	N	Lateral flagellin
HORM4_v2_980002	fliS	3.493	N	B-type flagellar protein fliS
HORM4_v2_980004		5.265	N	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_980005	lafL	6.452	N	Flagellar protein LafL
HORM4_v2_980006	lafS	2.412	K	RNA polymerase sigma factor for flagellar operon
HORM4_v2_980007	lafT	2.576	N	Chemotaxis protein LafT

HORM4_v2_700005		29.13	U	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_700006		52.965	O	TadV
HORM4_v2_700007	cpaB	21.33	U	Flp pilus assembly protein CpaB
HORM4_v2_700008		20.681	U	conserved exported protein of unknown function
HORM4_v2_700009		37.605	UC	conserved exported protein of unknown function
HORM4_v2_700010		23.155	U	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_700011		18.403	U	TadA
HORM4_v2_700012		20.76	U	conserved membrane protein of unknown function
HORM4_v2_700013		20.825	U	Bipartite nuclear localization signal containing protein
HORM4_v2_700014		24.047	U	conserved exported protein of unknown function
HORM4_v2_700015		23.852	U	TadE-like protein
HORM4_v2_700016		11.177	U	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_700017		21.176	U	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_920006		0.026	M	P pilus assembly protein, porin PapC
HORM4_v2_920007		0.014	N	P pilus assembly protein, chaperone PapD
HORM4_v2_370010		0.447	T	MSHA biogenesis protein MshH
HORM4_v2_370020		0.289	U	MAnnose-sensitive hemagglutinin a

Tableau 13 : Expressions des gènes associés à la motilité et l'adhésion lorsque *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est planctonique, la condition planctonique *V. harveyi* ORM4 servant de contrôle (p-value ajustée < 0,05).

ORF	Gene	FC	COG	Produit
HORM4_v2_180030	flgF	0.424	N	flagellar basal body rod protein FlgF
HORM4_v2_180031	flgG	0.257	N	flagellar component of cell-distal portion of basal-body rod
HORM4_v2_180032	flgH	0.235	N	Flagellar L-ring protein
HORM4_v2_180033	flgI	0.344	N	flagellar basal body P-ring protein
HORM4_v2_180034	flgJ	0.236	N	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ
HORM4_v2_180035	flgK	0.338	N	flagellar hook-associated protein FlgK
HORM4_v2_180036	flgL	0.308	N	flagellar hook-associated protein FlgL
HORM4_v2_180037		0.489	N	flagellin
HORM4_v2_180038		0.28	N	flagellin
HORM4_v2_180039	flaE	0.576	N	Polar flagellin E
HORM4_v2_460050		0.296	N	flagellin
HORM4_v2_460053		0.269		conserved protein of unknown function
HORM4_v2_460054	fliS	0.41	N	flagellar protein FliS
HORM4_v2_460055	flak	0.651	T	flagellar regulatory protein fleQ
HORM4_v2_460056		0.561	T	flagellar sensor histidine kinase fleS
HORM4_v2_460057		0.235	T	flagellar regulatory protein fleQ
HORM4_v2_460058	fliE	0.367	N	flagellar hook-basal body protein FliE
HORM4_v2_460059	fliF	0.47	N	flagellar MS-ring protein
HORM4_v2_460060	fliG	0.378	N	flagellar motor switching and energizing component
HORM4_v2_460061		0.252	N	flagellar assembly protein H
HORM4_v2_460062	fliI	0.329	N	flagellum-specific ATP synthase
HORM4_v2_460063	fliJ	0.557	N	flagellar biosynthesis chaperone
HORM4_v2_460065		0.275	N	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_460066		0.357	N	flagellar basal body-associated protein FliL
HORM4_v2_460067	fliM	0.486	N	flagellar motor switch protein FliM
HORM4_v2_460068	fliN	0.353	N	flagellar motor switching and energizing component
HORM4_v2_460069		0.352	N	conserved exported protein of unknown function
HORM4_v2_460070	fliP	0.321	N	flagellar biosynthesis protein FliP
HORM4_v2_460071	fliQ	0.168	N	flagellar biosynthesis protein FliQ
HORM4_v2_460072	fliR	0.441	N	flagellar biosynthesis protein FliR
HORM4_v2_460073	flhB	0.423	N	flagellar export pore protein
HORM4_v2_460081	cheB	0.44	T	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase of group 1 operon
HORM4_v2_460082		0.454	D	SOJ-like and chromosome partitioning protein
HORM4_v2_460083		0.392	S	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_470002		0.295	S	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_470003		0.3	N	Positive regulator of CheA protein activity (CheW)
HORM4_v2_170052	motB	0.478	N	flagellar motor protein MotB
HORM4_v2_370010		0.397	T	MSHA biogenesis protein MshH
HORM4_v2_370015		0.519	U	Msha biogenesis protein mshm
HORM4_v2_370016		0.537	S	Msha biogenesis protein mshn
HORM4_v2_370017		0.345	U	MSHA biogenesis protein MshE
HORM4_v2_370018		0.423	U	MSHA biogenesis protein MshG
HORM4_v2_370021		2.386		putative msha pilin protein msha
HORM4_v2_920006		0.111	M	P pilus assembly protein, porin PapC
HORM4_v2_920007		0.096	N	P pilus assembly protein, chaperone PapD
HORM4_v2_700005		2.23	U	conserved protein of unknown function
HORM4_v2_700006		3.021	O	TadV
HORM4_v2_430098		1.668		conserved membrane protein of unknown function
HORM4_v2_430099		1.666	O	ATPase with chaperone activity
HORM4_v2_430107		0.582	U	putative tight adherence TadC-related transmembrane protein
HORM4_v2_610128		3.162	U	Flp pilus assembly protein TadC
HORM4_v2_610132		1.717	U	conserved exported protein of unknown function

Tableau 14 : Expressions des gènes associés à la motilité et l'adhésion lorsque *V. harveyi* ORM4 $\Delta luxO$ est planctonique, la condition planctonique *V. harveyi* ORM4 servant de contrôle (p-value ajustée < 0,05).

ORF	Gene	FC	COG	Produit
HORM4_v2_90020	gspE	0.632	U	general secretory pathway component, cryptic
HORM4_v2_90021	gspF	0.68	U	general secretory pathway component, cryptic
HORM4_v2_90023	epsH	0.53	U	General secretion pathway protein H
HORM4_v2_90024	gspI	0.581	U	general secretion pathway protein I
HORM4_v2_90025	gspJ	0.473	U	general secretion pathway protein J
HORM4_v2_90026		0.534	U	general secretion pathway protein K
HORM4_v2_90027	epsL	0.499	U	General secretion pathway protein L
HORM4_v2_90028	epsM	0.484	U	General secretion pathway protein M
HORM4_v2_240092	exsC	0.674	O	Type III secretion regulator (ExsC)
HORM4_v2_240094		0.318		Putative lipoprotein (VirG)
HORM4_v2_240096		0.538		protein of unknown function
HORM4_v2_240097	exsA	0.64	K	Type III secretion regulator (ExsA)
HORM4_v2_240098	exsD	0.678		Type III secretion regulator (ExsD)
HORM4_v2_240099		0.377		Type III secretion system chaperone, YscB family
HORM4_v2_240100	vscC	0.265	U	Type III secretion system secretin (VscC)
HORM4_v2_240101	vscD	0.549	S	Type III secretion inner membrane ring protein (VscD)
HORM4_v2_240106	vscI	0.393	S	Type III secretion system inner rod protein (VscI)
HORM4_v2_240109	vscL	0.575	N	Yop proteins translocation protein L (VscL)
HORM4_v2_240118		1.929		Type III secretion chaperone, CstT family
HORM4_v2_240124	vscQ	0.616	N	Type III secretion inner membrane protein (VscQ)
HORM4_v2_240127	vscN	0.362	N	ATPase (VscN)
HORM4_v2_240130	sycN	0.452	S	Type III secretion chaperone (SycN)
HORM4_v2_240133	vcrD	0.509	U	Low calcium response protein (VcrD)
HORM4_v2_240137	vcrH	0.509	S	Low calcium response protein (VcrH)
HORM4_v2_240139	vopD	1.743	S	Putative translocator protein (VopD)
HORM4_v2_150032	yajC	1.493	U	SecYEG protein translocase auxillary subunit
HORM4_v2_360003	secE	0.526	U	preprotein translocase membrane subunit
HORM4_v2_430056	secG	0.357	U	preprotein translocase membrane subunit
HORM4_v2_930022	secF	0.31	U	protein-export membrane protein SecF
HORM4_v2_930023	secD	0.416	U	SecYEG protein translocase auxillary subunit

ANNEXE 2 : SUPPORTING INFORMATION – ARTICLE

Fig. S1. Doubling time of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) were grown in erlenmeyers with shaking, and OD_{600nm} was measured regularly to calculate the doubling time. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

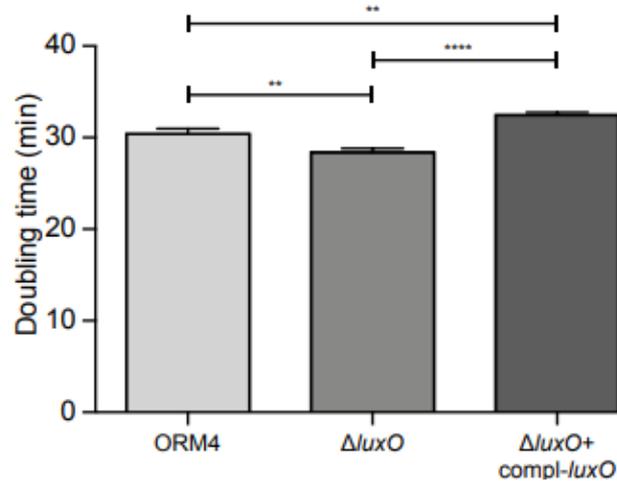


Fig. S2. Motility of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ compl-*luxO* (strain 272) were spotted on 0.2% agar plates, and swimming diameter was recorded after 10 h at 20C (A and B) and 28C (C and D), on LBS (A and C) and 'poor' (B and D) swimming plates. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

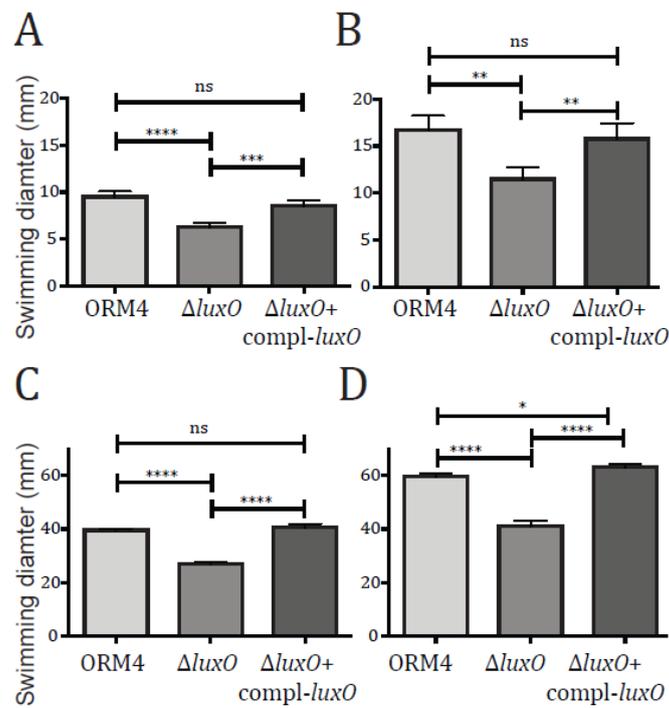


Fig. S3. Biofilm production by *V. harveyi* strains. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306), ORM4 $\Delta luxO$ *compluxO* (strain 272) and LMG 7890 (strain 283) were grown at 28°C, both in LBS (A) and in abalone serum (B) without shaking in microplates, and biofilm was stained after 24 h using crystal violet. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

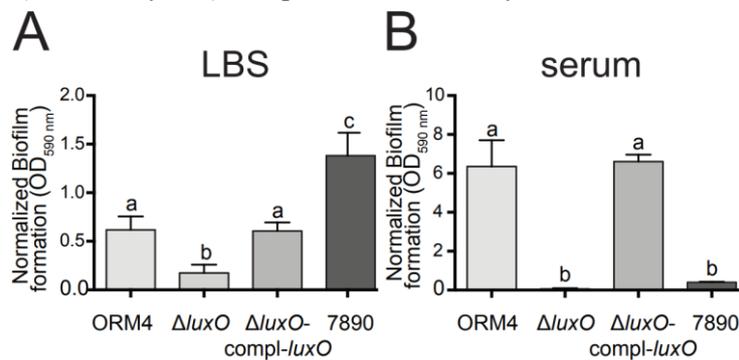


Fig. S4. Exopolysaccharide production of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta luxO$, and complemented ORM4 $\Delta luxO$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta luxO$ (strain 306) and ORM4 $\Delta luxO$ *compl-luxO* (strain 272) were spotted on LBS + Trim plates containing Congo Red, and incubated for 24 h.

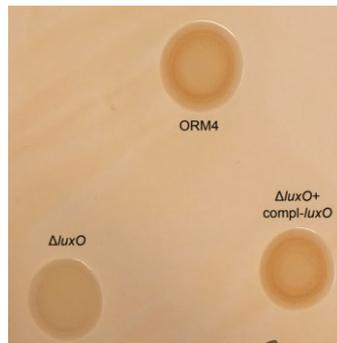


Fig. S5. Doubling time of *V. harveyi* ORM4 and *V. harveyi* ORM4 $\Delta exsA$. ORM4 (strain 1) and ORM4 $\Delta exsA$ (strain 131) were grown in erlenmeyers with shaking, and OD_{600nm} was measured regularly to calculate the doubling time. Note that the result for ORM4 is identical to the one in Fig. 1, because experiments were performed at the same time. An unpaired two-tailed t-test has been performed for each temperature.

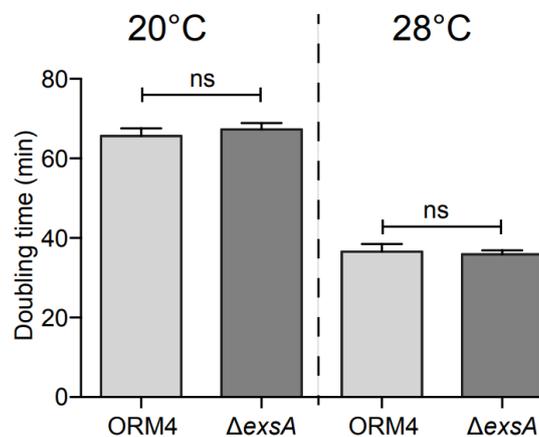


Fig. S6. Motility of *V. harveyi* ORM4, ORM4 $\Delta exsA$, and complemented ORM4 $\Delta exsA$. ORM4 (strain 256), ORM4 $\Delta exsA$ (strain 293) and ORM4 $\Delta exsA$ *compl-exsA* (strain 162) were spotted on 0.2% agar

plates, and swimming diameter was recorded after 10 h, both at 20C (A and B) and 28C (C and D), both on LBS (A and C) and ‘poor’ (B and D) swimming plates. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

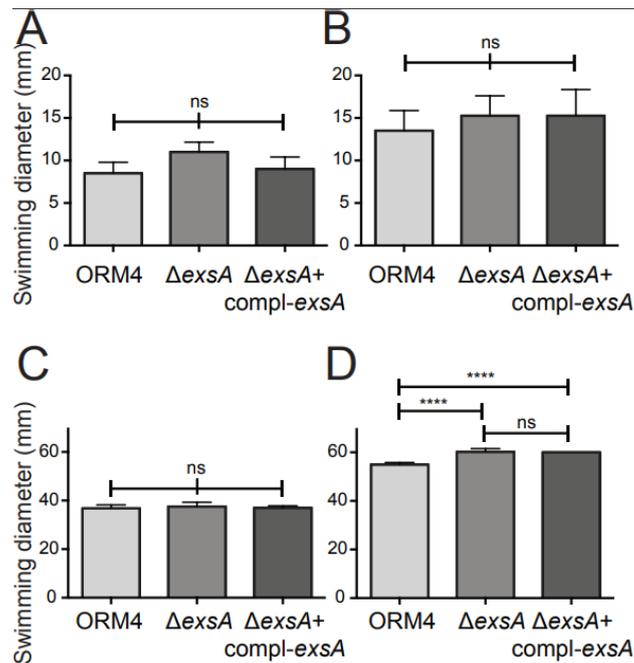


Fig. S7. Biofilm production by *V. harveyi* ORM4, *V. harveyi* ORM4 Δ exsA and *V. harveyi* LMG 7890. ORM4 (strain 242), ORM4 Δ exsA (strain 264) and LMG 7890 (strain 263) were grown at 20C (A and B) and 28C (C and D), both in LBS (A and C) and in abalone serum (B and D) without shaking in microplates, and biofilm was stained after 24 h using crystal violet. Note that the results for ORM4 and LMG 7890 are identical to the ones in Fig. 3, because experiments were performed at the same time. A one-way ANOVA (with Tukey test) was performed for every condition.

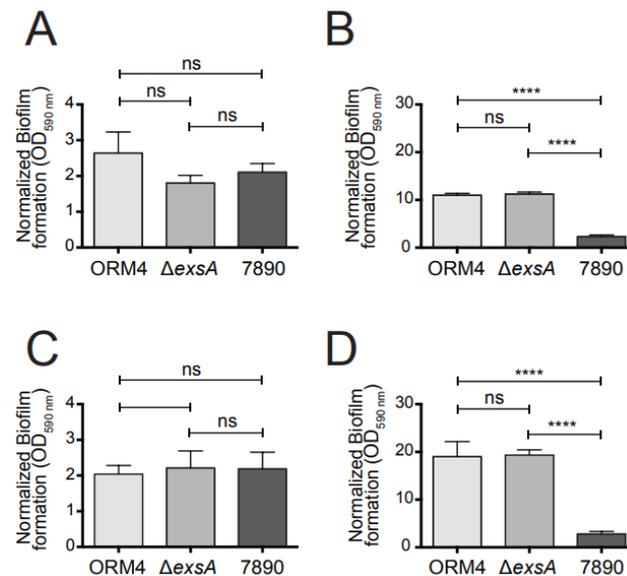


Table S1. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison (Richter et al., 2016).

JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison (Richter et al., 2016)						
Comparison using "Average Nucleotide Identity based on BLAST"						
ANiB and [aligned nucleotides] (%)	Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120 [T]	Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	Vibrio harveyi ORM4.fasta		
Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	*	87.64 (71.90)	87.50 (69.57)	98.35 (91.00)		
Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120	87.86 (66.52)	*	96.32 (70.46)	88.00 (67.39)		
Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	87.63 (76.03)	96.41 (82.72)	*	87.63 (76.10)		
Vibrio harveyi ORM4.fasta	98.27 (86.71)	87.56 (68.47)	87.38 (66.47)	*		
in green: above cutoff (>95%)						
Comparison using "Average Nucleotide Identity based on MUMmer"						
ANiM and [aligned nucleotides] (%)	Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120 [T]	Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	Vibrio harveyi ORM4.fasta		
Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	*	89.63 (67.55)	89.56 (65.29)	98.61 (92.26)		
Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120	89.63 (63.53)	*	96.91 (72.99)	89.70 (64.59)		
Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	89.55 (71.77)	96.91 (85.61)	*	89.62 (71.06)		
Vibrio harveyi ORM4.fasta	98.61 (88.98)	89.70 (64.43)	89.62 (62.23)	*		
in green: above cutoff (>95%)						
Statistical analysis (alignment-free) of tetranucleotide usage pattern						
Tetra results	Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120 [T]	Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	Vibrio harveyi ORM4.fasta		
Vibrio harveyi NBRC 15634 = ATCC 14126 [T]	*	0.96347	0.97420	0.99955		
Vibrio campbellii ATCC BAA-1116 ATCC BAA-1116; BB120	0.96347	*	0.99160	0.96606		
Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631 CAIM 519 [T]	0.97420	0.99160	*	0.97576		
Vibrio harveyi ORM4.fasta	0.99955	0.96606	0.97576	*		
in green: above cutoff (>0.999)						
in blue: in range (>0.989)						
in black: below cutoff (<0.989)						

Table S5. *V. harveyi* ORM4 T3SS proteins and amino acid percentage of identity with T3SS1 proteins of *V. parahaemolyticus* RIMD2210633.

<i>V. harveyi</i> ORM4 genes	Predicted function (Protein name)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633 genes	% aa identity	Universal Nomenclature (Hueck, 1998)
HORM4v2_240091	Type III secretion regulator (ExsE)	VP1702	39.22	
HORM4v2_240092	Type III secretion regulator (ExsC)	VP1701	81.08	
HORM4v2_240093	Protein of unknown function			
HORM4v2_240094	Putative lipoprotein (VirG)	VP1700	51.94	
HORM4v2_240095	Protein of unknown function			
HORM4v2_240096	Protein of unknown function			
HORM4v2_240097	Type III secretion regulator (ExsA)	VP1699	86.67	
HORM4v2_240098	Type III secretion regulator (ExsD)	VP1698	73.62	
HORM4v2_240099	Type III secretion system chaperone, YscB family	VP1697	61.27	
HORM4v2_240100	Type III secretion system secretin (VscC)	VP1696	81.2	SctC
HORM4v2_240101	Type III secretion inner membrane ring protein (VscD)	VP1695	80.83	SctD
HORM4v2_240102	Type III secretion system needle protein co-chaperone (VscE)	VIBPA11633	63.24	
HORM4v2_240103	Needle major subunit (VscF)	VP1694	84.15	SctF
HORM4v2_240104	Type III secretion system chaperone (VscG)	VP1693	71.19	
HORM4v2_240105	Putative type III export protein	VP1692	51.9	
HORM4v2_240106	Type III secretion system inner rod protein (VscI)	VP1691	92.11	SctI
HORM4v2_240107	Type III secretion bridge between inner and outer membrane lipoprotein (VscJ)	VP1690	89.07	SctJ
HORM4v2_240108	Type III secretion cytoplasmic protein (VscK)	VP1689	57.85	SctK
HORM4v2_240109	Yop proteins translocation protein L (VscL)	VP1688	85.02	SctL
HORM4v2_240110	Protein of unknown function			
HORM4v2_240111	Arginine ADP-ribosyltransferase family protein			
HORM4v2_240112	Artefact			
HORM4v2_240113	Protein of unknown function			
HORM4v2_240114	Protein of unknown function			
HORM4v2_240115	Protein of unknown function			
HORM4v2_240116	Protein of unknown function			
HORM4v2_240117	Artefact			
HORM4v2_240118	Type III secretion chaperone, CesT family	VP1682	71.05	
HORM4v2_240119	Type III secretion system effector (VopQ)	VP1680	82.72	
HORM4v2_240120	Type III secretion system export apparatus switch protein (VscU)	VP1675	89.14	SctU

HORM4v2_240121	Type III secretion inner membrane protein (VscT)	VP1674	86.54	SctT
HORM4v2_240122	Type III secretion inner membrane protein (VscS)	VP1673	96.59	SctS
HORM4v2_240123	Type III secretion inner membrane protein (VscR)	VP1672	96.76	SctR
HORM4v2_240124	Type III secretion inner membrane protein (VscQ)	VP1671	71.03	SctQ
HORM4v2_240125	Needle length regulator (VscP)	VP1670	32.85	SctP
HORM4v2_240126	Putative type III secretion chaperone (VscO)	VP1669	76.67	SctO
HORM4v2_240127	ATPase (VscN)	VP1668	94.76	SctN
HORM4v2_240128	Type III secretion regulator (YopN)	VP1667	97.54	SctW
HORM4v2_240129	Type III secretion outermembrane negative regulator of secretion (TyeA)	VP1666	79.79	SctW
HORM4v2_240130	Type III secretion chaperone (SycN)	VP1665	79.67	
HORM4v2_240131	Putative type III secretion protein (VscX)	VP1664	76	
HORM4v2_240132	Chaperone protein (VscY)	VP1663	69.3	
HORM4v2_240133	Low calcium response protein (VcrD)	VP1662	95.18	SctV
HORM4v2_240134	Type III secretion system regulator (VcrR)	VP1661	82.35	SctR
HORM4v2_240135	Type III secretion protein (VcrG)	VP1660	75	
HORM4v2_240136	Type III secretion protein (VcrV)	VP1659	49.71	
HORM4v2_240137	Low calcium response protein (VcrH)	VP1658	95.65	
HORM4v2_240138	Putative translocator protein (VopB)	VP1657	81.45	
HORM4v2_240139	Putative translocator protein (VopD)	VP1656	75.15	

ANNEXE 3 : VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

Oral :

Identification de déterminants moléculaires de la virulence de la bactérie *Vibrio harveyi* vis-à-vis de l'ormeau. Morot Amandine, El Fekih Sahar, Bidault Adeline, Le Ferrand Alizée, Jouault Albane, Kavousi Javid, Bazire Alexis, Pichereau Vianney, Dufour Alain, Paillard Christine, Delavat François. 15ème journées scientifiques de Nantes Université, 3 juin 2022, Nantes.

Virulence et quorum sensing : étude du pathogène *Vibrio harveyi*. Morot Amandine, Dufour Alain, Paillard Christine, Rodrigues Sophie, Delavat François. 2022. Journée de l'Axe Biotechnologique, IUEM. Plouzané, 14 Octobre 2022.

Étude de l'implication du quorum sensing dans la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4. Morot Amandine, Rodrigues Sophie, Delavat François, Dufour Alain, Paillard Christine 2022. Workshop Biofouling Marin, Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingenieur, Lorient, 10 Novembre 2022.

Poster :

A genetic study of an environmental strain involved in marine infections: the couple abalone-*Vibrio* as a model. Morot Amandine, , El Fekih Sahar, Bidault Adeline, Le Ferrand Alizée, Jouault Albane, Kavousi Javid, Bazire Alexis, Pichereau Vianney, Dufour Alain, Paillard Christine, Delavat François. Swiss Society for Microbiology Congress, Septembre 2021, congrès virtuel.

ANNEXE 4 : PUBLICATIONS

Genetic and physiological insights into the diazotrophic activity of a non-cyanobacterial marine diazotroph. Joublin-Delavat Aurélie, Touahri Katia, Créatin Pauline, Morot Amandine, Rodrigues Sophie, Jesus Bruno, Trigodet Florian, Delavat François. 2022. Environmental Microbiology. (Facteur d'Impact : 5.476)

Cooperation and cheating behaviors shape *Vibrio* assemblages in oysters infected with the OsHV-1 virus. Daniel Oyanedel , Arnaud Lagorce, Maxime Bruto, Philippe Haffner, Amandine Morot, Yann Dorant, Sébastien de La Forest Divonne, François Delavat, Nicolas Inguimbert, Caroline Montagnani, Benjamin Morga, Eve Toulza, Cristian Chaparro, Jean-Michel Escoubas, Yannick Labreuche, Yannick Gueguen, Jérémie Vidal-Dupiol, Julien de Lorgeril, Bruno Petton, Lionel Degremont, Delphine Tourbiez, Léa-Lou Pimparé, Marc Leroy, Océane Romatif, Juliette Pouzadoux, Guillaume Mitta, Frédérique Le Roux, Guillaume Charrière, Marie-Agnès Travers, Delphine Destoumieux-Garzón. 2023. PNAS. (Soumis). (En attente d'un Facteur d'Impact).

Titre : Élucidation des mécanismes moléculaires de colonisation d'organismes marins par le pathogène *Vibrio harveyi*

Mots clés : *Vibrio harveyi*, *Haliotis tuberculata*, quorum sensing, T3SS, biofilm

Résumé : *Vibrio harveyi* ORM4 est une bactérie responsable de mortalité d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata*, survenues en Bretagne et en Normandie dans les années 1990. Celle-ci adhère en quelques heures aux branchies de l'ormeau, avant de pénétrer dans l'organisme et d'être retrouvée dans l'hémolymphe, induisant une septicémie et provoquant la mort de l'animal. L'objectif principal de cette thèse a été d'identifier et d'étudier les facteurs liés à la pathogénicité de la bactérie lors des étapes initiales de l'infection de l'ormeau européen. À l'aide de techniques de mutagenèse ciblées, nous avons pu mettre en évidence l'importance de deux systèmes dans la virulence de *V. harveyi* ORM4. Le premier est le système de sécrétion type III (T3SS) régulé par la protéine ExsA. Ce dernier, impacté par la délétion du gène *exsA*, est essentiel à la virulence de *V. harveyi* ORM4 de par son implication dans la

colonisation des branchies de l'ormeau européen, ainsi que dans la virulence de la bactérie envers les cellules immunitaires de l'animal. Le second est le système de quorum sensing, impliqué dans la régulation de nombreux gènes, dont le régulateur principal est LuxO. La délétion du gène *luxO* entraîne une perte de colonisation des branchies et de l'hémolymphe de l'ormeau européen aux premiers jours de l'infection aboutissant à une perte de virulence de la bactérie. Par ailleurs, nous avons apporté une première description du biofilm formé par *V. harveyi* ORM4 à l'aide d'une approche de microscopie confocale à balayage laser couplée à une analyse transcriptomique. De plus, la délétion du gène *luxO* a permis de rendre compte de la régulation orchestrée par le quorum sensing dans la formation de biofilm chez *V. harveyi* ORM4.

Title : Unravelling the molecular mechanisms of the colonization of marine organisms by the pathogen, *Vibrio harveyi*

Keywords : *Vibrio harveyi*, *Haliotis tuberculata*, quorum sensing, T3SS, biofilm

Abstract : *Vibrio harveyi* ORM4 is a pathogen responsible for the deaths of European abalone, *Haliotis tuberculata*, which occurred in Brittany and Normandy in the 1990s. This bacterium attaches to the abalone's gills within a few hours, before entering the organism and being found in the haemolymph, leading to septicemia and to the death of the animal. The main objective of this thesis was to identify and study the factors related to the pathogenicity of the bacteria during the initial stages of infection of European abalone. Using targeted mutagenesis techniques, we were able to highlight the importance of two systems in the virulence of *V. harveyi* ORM4. The first is the type III secretion system (T3SS) regulated by the ExsA protein. This system, impaired by the *exsA* deletion, is essential for the virulence of

V. harveyi ORM4 because of its involvement in the colonisation of abalone's gills, and in the virulence of the bacterium towards the animal's immune cells. The second is the quorum sensing, involved in the regulation of numerous genes and regulated by the LuxO protein. The *luxO* deletion leads to a loss of colonisation of the gills and haemolymph of the European abalone in the first few days of infection, resulting in a loss of virulence of the bacterium. In addition, we provided the first description of the biofilm formed by *V. harveyi* ORM4 using a confocal laser scanning microscopy approach coupled with transcriptomic analysis. Furthermore, the *luxO* mutant allowed us to investigate the regulation orchestrated by the quorum sensing in biofilm formation by *V. harveyi* ORM4.