



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Science pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266-ULR

Laboratoire Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (SG2M-LGPMM) Ifremer

La Tremblade

THESE

Présentée par

Rachida Mersni-Achour

Soutenance prévue le 20 mai 2014

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle

Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

***Vibrio tubiashii* en France: description d'isolats pathogènes affectant des mollusques et étude de leurs mécanismes de virulence**

Jury:

Paco Bustamante

Carolyn Friedman

Philippe Soudant

Vianney Pichereau

Delphine Destoumieux-Garzon

Ingrid Fruitier-Arnaudin

Denis Saulnier

Marie-Agnès Travers

Professeur, Université de la Rochelle, Président du jury

Professeur, JISAO Senior Fellow, Rapporteur

Directeur de recherche CNRS, IUEM-UBO, Rapporteur

Professeur, IUEM-UBO, IUEM-UBO, Examineur

Chargée de recherche CNRS, Université Montpellier 2, Examineur

Maître de conférences, Université de la Rochelle, Directeur de thèse

Chercheur, Centre Ifremer du Pacifique, Co-directeur

Chercheur, Ifremer SG2M-LGPMM, Responsable scientifique

Contributions scientifiques

Publications

Publications en revue

1/ **R. Mersni Achour, M A. Travers, P. Haffner, D. Tourbiez, N. Faury, A L. Cassone, B. Morga, I. Doghri, C. Garcia, T. Renault, I. Fruitier-Arnaudin, D. Saulnier. (2014). First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events.** Journal of Invertebrate Pathology (IF: 2.6).

2/ **R. Mersni Achour, N. Imbert, V. Huet, Y. Ben Cheikh, N. Faury, I. Doghri, S. Rouatbi, S. Bordenave, M A Travers, D. Saulnier, I. Fruitier-Arnaudin. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of secreted proteases affecting oyster immunity.** Sous révision in Journal of Invertebrate Pathology (IF: 2.6).

Publications en attente de soumission

3/ **R. Mersni Achour, Y. Ben Cheikh, V. Pichereau, I. Doghri, C. Etien, L. Dégremont, D. Saulnier, I. Fruitier-Arnaudin, M A. Travers Molecular characterizations of the French *V. tubiashii* virulence factors on oyster's larvae give evidences that metalloprotease is not the only main toxic factor .**(Journal visé Microbiology IF: 2.8).

4/ **R. Mersni Achour, I. Doghri, V. Pichereau, Y. Ben cheikh, P. Haffner, S. Sable, D. Saulnier, M A. Travers, I. Fruitier Arnaudin. Toxicity and proteases composition of extracellular products from the French *Vibrio tubiashii* are modulated by physical and chemical characteristics of growth media.** (Journal visé Microbiology IF: 2.8).

Communications orales

R. Mersni Achour, P. Haffner, I. Doghri, Y. Ben Cheikh, N. Faury, D. Tourbiez, N. Imbert, V. Huet, S. Rouatbi, A L. Cassone, B. Morga, C. Garcia, B. Chollet, S. Bordenave, V. Pichereau, T. Renault, D. Saulnier, M A. Travers, I. Fruitier-Arnaudin. Identification of a

French *Vibrio tubiashii*, a pathogen of bivalves and characterization of its extracellular products. *Vibrio* 2014. Avril 1-4, 2014 Edinbough, UK.

R. Mersni Achour. M.A Tarvers. *Vibrio tubiashii* in France: description of pathogenic isolates affecting shellfish and characterization of their virulence mechanisms. The Annual Meeting of the National Reference Laboratories for Mollusc Diseases, Mars 25-26, 2014, Nantes France.

R. Mersni Achour. Etude du mode d'action de toxines bactériennes chez un invertébré marin: l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Colloque des Doctorants de 2ème année. Mai 31, 2012 Ecole doctorale Gay LUSSAC La Rochelle, France.

Communications affichées

R. Mersni Achour, M A. Travers, P. Haffner D. Tourbiez, A L. Cassone, B. Morga, I. Doghri, C. Garcia, T. Renault, I. Fruitier-Arnaudin, D. Saulnier. Genotypic and phenotypic characterization of *Vibrio tubiashii* subsp. *francensis* nov., a phylogenetically distinct bacterial pathogen of bivalves. 10th International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM-10) Institut Pasteur. Octobre 2-5, 2013 Paris, France.

R. Mersni Achour. Etude du mode d'action de toxines bactériennes chez un invertébré marin: l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Colloque de la Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable. Juin 27-29, 2012 CAES- Ile d'Oléron, France.

I. Fruitier-Arnaudin, R. Mersni, D. Saulnier. Purification and characterization of secreted proteases from three *Vibrio harveyi* like strains isolated from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. ESF-COST High-Level Research Conference Marine Biotechnology: Future Challenges. Juin 20-25, 2010 Acquafredda di Maratea, Italy.

Activités d'enseignement

2013-2014: Attaché temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) au sein du département de Biotechnologie à l'université de la Rochelle, France. Volume horaires: 48h équivalent TD. Niveau: Licence 3 (10h CM et 6h TD Anabolisme) et Licence 1 (TD de biochimie structurale 1).

2012-2013: Activités complémentaires d'enseignement (DCACE) au sein du département de Biotechnologies à l'université de la Rochelle, France. Volume horaires: 64h équivalent TD. Niveau: Master 1 (TP de microbiologie fondamentale et appliquée).

2011-2012: Activités complémentaires d'enseignement (DCACE) au sein du Département de Biotechnologies à l'université de la Rochelle, France. Volume horaire: 64h équivalent TD. Niveau: Master 1 (TP de microbiologie fondamentale et appliquée) et Licence 3 (TP de génétique bactérienne, métabolisme et croissance).

Remerciements

Cet ouvrage est le fruit de plus de 3 ans de labeur et de dévouement de ma part mais surtout de la part des personnes qui m'entourent et qui m'ont soutenu et qui ont grandement contribué au succès de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres du Jury qui, par leur expertise, ont examiné ce travail.

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire rochelais LIENSs UMR 7266 CNRS-ULR dirigé par Mr Olivier de Viron et le laboratoire Trembladais de l'IFREMER: le LGPMM dirigé par Mr Tristan Renault et Mme Sylvie Lapègue. Je les remercie de m'avoir accueillie dans les structures qu'ils dirigent.

Je remercie particulièrement ma directrice de thèse Dr Ingrid Fruitier-Arnaudin qui n'a ménagé aucun effort pour le bon déroulement de la thèse dans de bonnes conditions et qui a veillé à la disponibilité des ressources nécessaires à ces travaux. Je remercie également mon co-directeur de thèse Dr Denis Saulnier, qui, malgré la distance et le décalage horaire, a toujours le souci de suivre mes travaux.

Un grand merci à Marie-Agnès Travers, mon encadrant scientifique, pour son soutien, ses encouragements, ses conseils, sa bienveillance envers moi et son implication pleine dans ce travail. Agnès, je te remercie pour toutes les discussions fructueuses, pour les ondes positives que tu m'as constamment transmises et qui m'ont poussé au delà de mes limites. J'ai beaucoup appris de toi.

Merci à Vianney Pichereau et à toute l'équipe LEMAR pour m'avoir appris la technique d'électrophorèse bidimensionnelle. J'ai passé un séjour très agréable à Brest.

Je remercie Mr Gérard Blanchard pour m'avoir accueillie au sein de l'Université de La Rochelle dans laquelle j'ai réalisé, dans de bonnes conditions, mes charges d'enseignements et de recherche.

Une grande partie de mon travail a été effectuée au laboratoire LGPMM à la Tremblade, une belle petite ville dans laquelle je me rendais souvent en covoiturage avec Patrick Azema et Cyrille François. Je vous remercie pour les bons moments musicaux sur la route.

D'un autre côté, je remercie toute l'équipe de ce laboratoire, Nicole Faury, Philippe Haffner, Delphine tourbiez, Bruno Chollet, Céline Garcia, Lionel Dégremont, Raphaël Brizard et Véronique Betto. Je les remercie pour leur accueil chaleureux, leur disponibilité et leur bonne humeur.

L'autre partie de ce travail a été réalisée à la Rochelle au sein du laboratoire LIENSs entre le bâtiment Marie Curie et le bâtiment ILE.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues de bureau Amandine Adrien Dit Richard, Oussama Achour (qui est aussi mon mari), Nicolas Joquet, Nicolas Poupard et Florian Le Joubioux. Ils ont supporté tous mes états d'humeurs pendant plus de 3 ans.

J'adresse mes remerciements aux étudiants Ibtissem doghri, Yosra Ben cheikh, Cédric Etien, Aurélie Trefier et Julie Lepinay que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont grandement contribué à la réussite de ce travail.

Un grand merci à tous mes collègues et amis Hervé Rouillard, Camille Juin, Valérie Sopena pour leur sympathie et pour les bons repas au RU (poisson et encore du poisson).

Je remercie également tout le personnel de l'équipe AMES pour leur sympathie.

Un grand merci à tous les étudiants tunisiens qui sont passés par ce Laboratoire pour les bons moments partagés.

Au Bâtiment ILE, je remercie Nathalie Imbert, Valérie Huet et Laureen Beaugeard pour leur aide, leur patience et leur implication dans les manip de cytométries en flux. Je remercie également David pour sa gentillesse et pour les discussions sympathiques lors des pauses thé-café.

Je remercie vivement tout le personnel administratif du laboratoire LIENSs Viviane Biou, Laetitia Darre, Johan Guiard et Marie Chivaille qui ont facilité toutes les tâches administratives et ont toujours répondu à mes demandes quasi instantanément avec une bonne humeur.

Enfin, il existe des personnes sans lesquelles ces travaux n'auraient probablement jamais eu lieu. Ils ont, sans le savoir, réalisé ce travail avec moi car ils étaient toujours présents dans mon cœur. C'est à ma famille et mes amis que je m'adresse pour manifester ma reconnaissance.

D'abord à mes parents: ma très chère maman Yamina (Ya), mon très cher papa Salem (Baba) et mon très cher frère Amine (Minov). Malgré les 1400 Km qui nous séparent, votre soutien émotionnel, moral et physique, m'ont permis de surmonter toutes les difficultés. J'ai pu à chaque fois me ressourcer auprès de vous. Que Dieu vous bénisse et vous protège. Un grand merci à ma future belle sœur Narjess, tu es un amour.

Je remercie chaleureusement mes beaux-parents Sondes et khaled, ainsi que mes beaux-frères Ahlem (zarim), Ahmed (zamid) et Belhassan (Bach). Merci Dieu pour cette belle famille.

Un grand merci à toute ma famille : cousins et cousines, oncles et tantes pour votre soutien.

Merci tata Hendâ et Mostafa pour votre soutien et tous les cadeaux.

Merci tonton Khaled Ben Cheikh d'avoir toujours cru en moi.

Un très grand merci à ma sœur Balkis Eddif pour tous les bons moments passés ensemble (à Paris, à Toulouse, à Bordeaux, à Poitiers, à la Rochelle...) et pour les heures et les heures d'appels. Notre complicité et notre grande fraternité ne cessent de grandir avec beaucoup d'amour. ET un grand merci à mon ami et mon beau frère Amine Chebbi (et enfin on est une même famille).

Un gros merci à mes amies Souhir Jazzar et Asma Soussi Ben Ali. Vous étiez loin des yeux mais tout le temps proches du cœur.

Je remercie Ibtissem Doghri qui a grandement contribué à ce travail et qui m'a quotidiennement accompagné à la Tremblade pour m'aider pour les manips. Je remercie l'amie qu'elle est devenue et je lui souhaite le succès pour sa thèse.

Un merci à mes amies Yesmine Ben Henda et Mariem Laamari pour les beaux moments que l'on a vécu à La Rochelle, pour le soutien moral et les fous rires que nous avons partagés "L'amitié double les joies et réduit de moitié les peines."

Un énorme merci à ma petite famille: à mon mari chéri Oussama (Merci mon amour) et à mon bout de chou Yoyo (tu es l'étoile qui a illuminé notre vie). Je vous aime de tout mon cœur.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

*On manque trop souvent les occasions pour exprimer nos sentiments
Merci à la thèse ☺*

Table des matières

Index des figures	14
Index des tableaux	15
Liste des unités et des principales abréviations.....	16
CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	18
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	22
Partie A: Les bactéries du genre <i>Vibrio</i>	23
1. Systématique, caractéristiques biologiques et écologiques.....	24
2. Historique et taxonomie	25
3. Structure du génome.....	27
4. Espèces pathogène du genre <i>Vibrio</i>	28
4.1. Les vibrions pathogènes pour l'Homme	28
4.2. Les vibrions pathogènes des organismes marins.....	30
<i>Vibrio shiloi</i>	32
4.3. <i>Vibrio tubiashii</i>	35
5. Les facteurs de virulence du genre <i>Vibrio</i>	41
5.1. Les notions de pathogénicité et de virulence	41
5.2. Les mécanismes de virulence chez les <i>Vibrio</i>	42
5.3. Régulation de l'expression des facteurs de virulence	48
6. Méthodes de détection du genre <i>Vibrio</i>	50
Partie B: Les facteurs de virulence chez les vibrions marins, types et mode d'action	53
1. Les protéases extracellulaires chez le genre <i>Vibrio</i>	54
1.1 Généralités sur les protéases	54
1.2 Rôle des protéases dans la virulence du genre <i>Vibrio</i>	55

1.3	Les métalloprotéases	57
1.3.1	Généralités et classification.....	57
1.3.2	Mécanisme d'action de la métalloprotéase	58
1.3.3	Synthèse et régulation	61
1.3.4	Implication des métalloprotéases dans la virulence du genre <i>Vibrio</i>	62
1.4	Les protéases à sérine	64
1.4.1	Généralités et mode d'action.....	64
1.4.2	Synthèse et régulation	66
1.4.3	Les protéases à sérine dans le genre <i>Vibrio</i>	66
1.5	Les protéases à cystéine	67
1.5.1	Généralités et mode d'action.....	67
1.5.2	Synthèse et régulation	68
1.5.3	Les protéases à cystéines dans le genre <i>Vibrio</i>	68
2.	Les sidérophores.....	69
2.1	Généralités.....	69
2.2	Mode d'action	70
2.3	Biosynthèse et régulation	71
2.4	Sidérophores chez <i>Vibrio</i>	72
3.	Les hémolysines	73
3.1	Généralités.....	73
3.2	Mode d'action	74
3.3	Sécrétion et régulation.....	75
3.4	Implication des hémolysines dans la virulence des <i>Vibrio</i>	76
 Partie C: Les différents modèles d'études de la virulence du genre		
<i>Vibrio</i>		
1.	Approche <i>in vivo</i>	80
1.1	Modèle d'étude: généralités sur l'huître creuse <i>C. gigas</i>	80

1.1.1	Systématique et répartition.....	80
1.1.2	Ecologie et biologie.....	81
1.1.3	Rappels anatomiques et physiologiques.....	81
1.1.4	Reproduction	82
1.2	Les différentes techniques utilisées en infections expérimentales.....	83
2.	Approche <i>in vitro</i>	85
2.1	Les modèles cellulaires	85
2.1.1	Généralités sur les hémocytes	85
2.1.2	Les hémocytes un bon modèle d'étude	87
2.1.3	Autres modèles cellulaires	89
2.2	Les modèles moléculaires	89
	RESULTATS	92
	A/ Première description d'une nouvelle souche française, pathogène de mollusques et phylogénétiquement proche de la souche type américaine <i>V. tubiashii</i>	93
	<i>A1: Caractérisation et détection des isolats français lors d'épisodes de mortalité</i>	93
	ArticleI: FIRST DESCRIPTION OF FRENCH <i>V. TUBIASHII</i> STRAINS PATHOGENIC TO MOLLUSK: I.CHARACTERIZATION OF ISOLATES AND DETECTION DURING MORTALITY EVENTS	95
	<i>A2: Caractérisation des protéases sécrétées par la souche française <i>V. tubiashii</i> affectant les fonctions immunitaires de l'huître creuse <i>C. gigas</i></i>	130
	Article II: FIRST DESCRIPTION OF FRENCH <i>V. TUBIASHII</i> STRAINS PATHOGENIC TO MOLLUSK: II. CHARACTERIZATION OF PROPERTIES OF THE PROTEOLYTIC FRACTION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS	132
	B/ Influences physique et chimique des conditions de culture de la souche française <i>V. tubiashii</i> sur la toxicité de ses produits extracellulaires	165

Article III: TOXICITY AND PROTEASES COMPOSITION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS FROM THE FRENCH <i>VIBRIO TUBIASHII</i> ARE MODULATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF GROWTH MEDIA.....	167
C/ La caractérisation moléculaire des facteurs de virulence produits par la souche française <i>V. tubiashii</i>.....	191
Article IV: MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF THE FRENCH <i>V. TUBIASHII</i> VIRULENCE FACTORS ON OYSTER'S LARVAE GIVE EVIDENCES THAT METALLOPROTEASE IS NOT THE ONLY MAIN TOXIC FACTOR.....	195
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	226
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	238
Résumé	276
Abstract	276

Index des figures

Figure 1: Représentation de l'arbre phylogénétique regroupant les différentes familles de vibrions basé sur la méthode de neighbor-joining,	27
Figure 2: Photo de larves d'huître <i>C. gigas</i> issus d'une infection par <i>V. tubiashii</i>	36
Figure 3: Le phénomène de la formation de CEVC et leur ressuscitation chez <i>V. cholerae</i> ..	48
Figure 4: Impact du quorum sensing sur l'expression des facteurs de virulence chez <i>V. harveyi</i>	49
Figure 5: Les différentes fonctions attribuées aux protéases bactériennes au cours du processus infectieux.	55
Figure 6: La Classification des différentes familles de métalloprotéase à zinc basée sur la séquence autour du site de fixation du zinc.....	58
Figure 7: Structure du site actif de la thermolysine chez <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	59
Figure 8: Illustration schématique du mécanisme catalytique de la thermolysine.....	60
Figure 9: Les différentes étapes menant à la synthèse d'une métalloprotéase mature chez les bactéries.....	61
Figure 10: La triade catalytique de la chymotrypsine	65
Figure 11: La triade catalytique de la protéase à cystéine (papaine)	67
Figure 12: Exemple de sidérophores chez le genre <i>Vibrio</i>	70
Figure 13: Représentation schématique de l'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries à Gram négatifs.	71
Figure 14: Les différents mécanismes pour endommager la membrane cytoplasmique de l'hôte.....	74
Figure 15: Le processus de formation de pores par les PFTs	75
Figure 16: Anatomie de l'huître creuse <i>C. gigas</i>	81
Figure 17: Développement larvaire chez l'huître creuse, <i>C. gigas</i>	83
Figure 18: Mécanisme de défense chez les bivalves contre l'invasion bactérienne.....	86
Figure 19: Observation microscopique des hémocytes de la palourde japonaise (<i>V. philippinarum</i>).....	88
Figure 20: Etiologie multifactorielle du phénomène de mortalité d'huîtres creuse <i>C. gigas</i> en France.	20
Figure 21: Relation entre le pourcentage d'hémolyse et l'activité protéasique (AP) au cours de la croissance de la souche 07/118 T2	193
Figure 22: Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale utilisée lors de ce projet	228
Figure 23: Représentation générale des mécanismes potentiels de pathogénicité mis en œuvre par la souche française <i>V. tubiashii</i> 07/118 T2	237

Index des tableaux

Tableau 1: Association des espèces de <i>Vibrio</i> pathogènes avec des syndromes cliniques.....	30
Tableau 2: Espèce de <i>Vibrio</i> pathogène de poissons, de crustacées et de mollusques	31
Tableau 3: Les <i>Vibrios</i> chez les mollusques bivalves (larves et juvéniles) issus des épisodes de mortalités	33
Tableau 4: Historique des études réalisées sur l'espèce <i>V. tubiashii</i>	37
Tableau 5: Les différents facteurs de la virulence décrits chez le genre <i>Vibrio</i>	44
Tableau 6: Familles des protéases classées selon la nature de leur site actif.....	54
Tableau 7: Protéases produites par le genre <i>Vibrio</i>	56
Tableau 8: Rôle biologiques de métalloprotéases décrites chez le genre <i>Vibrio</i>	63
Tableau 9: Différents sidérophores décrits au sein du genre <i>Vibrio</i>	73
Tableau 10: Récapitulatif des différentes techniques utilisées en infections expérimentales chez <i>C. gigas</i> par <i>V. aestuarianus</i> , <i>V. splendidus</i> ,	84

Liste des unités et des principales abréviations

aa	acide aminé
ABC	ATP-Binding Cassette
ARN 16S	L'ARN ribosomique 16S
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
Caco-2	Colon carcinoma cell line
CHO	Chinese hamster ovary
CGH	Hybridation <i>Génomique Comparative</i>
Da	Dalton
DL₅₀	Dose létale 50
ECF	ExtraCytoplasmic Function
ECPs	Extracellular products/ produits extracellulaires
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent <i>assay</i>
EMSF	Eau de mer sterile filter
FAO	Food and Agriculture Organization
Fur	Ferric Uptake Repressor
g	gramme
GP-HPLC	Gel Permeation-High Performance Liquid Chromatography
gyrB	Gyrase B
H	Heure/ Hour
HeLa	Henrietta Lacks (Human cervical carcinoma)
kDa	Kilo Dalton
ml	millilitre
LBS	Luria Bertani broth salé
LBSA	Luria Bertani agar salé
LPS	Lipopolysaccharides
LS MS-MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
MA	Marine Agar
MB	Marine Broth
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis
MMP	Métalloprotéase matricielle
NIP	NRPS Independent Pathway
NRPS	Nonribosomal Peptide Synthetase
OMP	Outer membrane protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFTs	Les toxines formant des pores
QPCR	Quantitative polymerase chain reaction
QS	Quorum sensing

REPAMO	REseau de PAthologie des MOllusques
ROS	Espèces <i>réactives de l'oxygène</i>
RTX	Repeats in toxin
SOD	Superoxyde dismutase
SSIII	Système de sécrétion de type trois
TIMPs	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases
Cfu (cfu)	Colony-forming unit
V	<i>Vibrio</i>
VBNC	Viable But Non-Culturable
Vero	Verda Reno

CONTEXTE GENERAL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'histoire de l'ostréiculture française a été marquée par des périodes d'abondance et des périodes de crise avec l'huître plate *Ostrea edulis*. Au début du XIX^{ème} siècle la consommation d'huître *Ostrea edulis* est tellement importante que la France importe pour son marché, des huîtres dites « Portugaises » *Crassostrea angulata*. Dans les années 20, des mortalités déciment les élevages d'huîtres plates de sorte que la culture disparaît des bassins de Marennes et d'Arcachon. La profession dans son ensemble se tourne alors vers *C. angulata*. Mais dans les années 70, c'est au tour de *C. angulata* d'être décimée par une nouvelle épizootie (Comps *et al.*, 1976).

En raison de sa croissance rapide et de sa grande tolérance aux conditions environnementales, l'huître creuse du Pacifique, *C. gigas*, est alors choisie pour la culture dans plusieurs régions du monde et c'est en 1966, que cette espèce a été introduite en France. A ce jour, l'ostréiculture française, classée 1^{er} en Europe et 4^{ème} au rang mondial mondial, est largement dominée par la production de l'huître *C. gigas*.

Néanmoins, depuis les années soixante-dix, l'ostréiculture française fait face à des mortalités importantes d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* sur une période qui s'étend de la fin du printemps à l'été. Ce phénomène souvent traduit sous le terme de mortalité anormale touche une profession fortement éprouvée et pèse sur l'économie de toute une filière.

De nombreux programmes de recherche et des réseaux nationaux (RESCO¹, REPHY², REPAMO³) ont été mis en place pour suivre, analyser et comprendre ces mortalités. L'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a engagé de 2001 à 2005 un grand programme de recherche multidisciplinaire impliquant plusieurs organismes de recherche, désigné par MOREST (acronyme de MORTalité ESTivales). Ce programme a permis de mettre en évidence que l'étiologie des mortalités estivales était multifactorielle et que ces mortalités étaient la résultante d'un ensemble d'événements impliquant des facteurs de l'environnement, la sensibilité de l'hôte (l'huître) et l'intervention d'agents pathogènes (Figure 20).

¹RESCO: Observatoire Conchylicole

²REPHY: Réseau de suivi des populations phytoplanctoniques

³REPAMO: Réseau pathologie mollusques

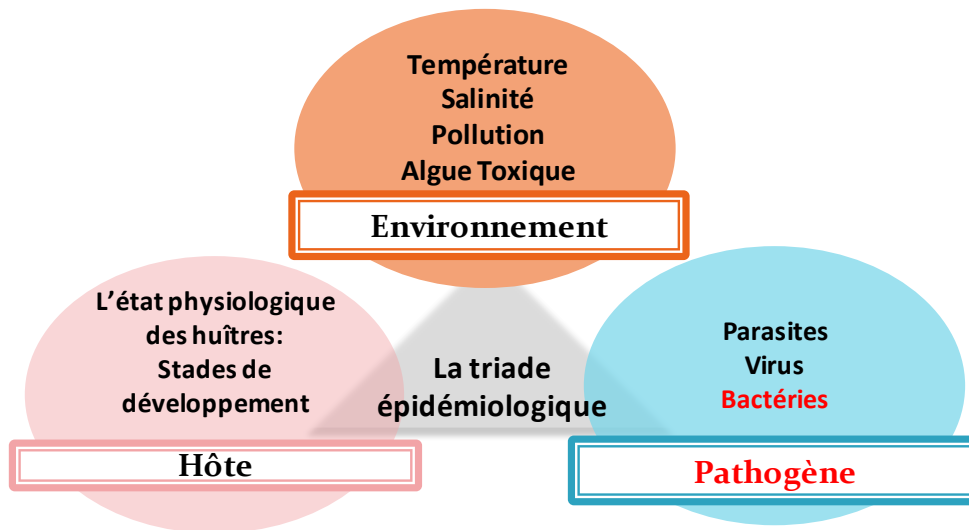


Figure 1: Etiologie multifactorielle du phénomène de mortalité d'huîtres creuse *C. gigas* en France (Samain *et al.*, 2007).

Cependant, si aucun agent pathogène particulier ne semble être associé de manière systématique aux épisodes de mortalités anormales, des bactéries du genre *Vibrio* ainsi que des virus apparentés à la famille des *Herpes viridae* (Renault *et al.*, 1994; Segarra *et al.*, 2010) ont été détectés de façon concomitante à leur déclenchement.

Durant cette dernière décennie, deux souches bactériennes ont été régulièrement identifiées pendant les épisodes de mortalités estivales: *V. aestuarianus* (Nicolas *et al.*, 2002b) et *V. splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001). En 2010, une large étude épidémiologique conduite sur 115 souches de *Vibrio* isolées durant les épisodes de mortalités 2003-2007 a été réalisée dans le cadre du réseau REPAMO (Saulnier *et al.*, 2010). Sur la base du séquençage de l'ARNr16S, en plus de la détection de *V. aestuarianus* et de *V. splendidus*, d'autres isolats appartenant au groupe *Harveyi* ont été identifiées à partir de naissains de *C. gigas* issus d'écloseries. Ce groupe d'isolats a montré une diversité (résultats non publiés) dont l'affiliation au rang d'espèce n'avait pas été suffisamment avancée. C'est pourquoi dans un premier temps, il nous est apparu nécessaire d'affiner leur classification taxonomique. Dans le premier volet de thèse, une approche phylogénétique couplée par une approche phénotypique a été appliquée sur neuf isolats appartenant à ce groupe. Par cette démarche, nous avons pu démontrer que les isolats français étaient plutôt proches de la souche américaine *V. tubiashii*. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une première publication, actuellement sous presse, dans la revue «Journal of Invertebrate Pathology». Par la suite, la démonstration de la pathogénicité de ces isolats a orienté notre étude vers la caractérisation fine des facteurs associés à leur virulence.

Contexte général et objectifs de l'étude

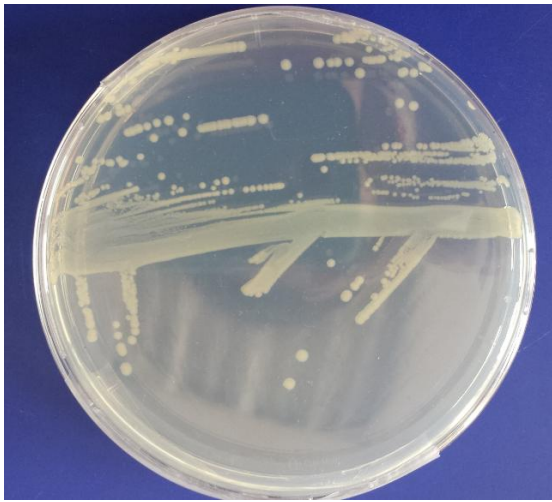
Pour réaliser cela, la souche française *V. tubiashii* (07/118 T2) induisant plus de 60% de mortalité après 24 h d'injection et présentant un phénotype métalloprotéase marqué a été sélectionnée comme souche modèle pour la suite du travail. La caractérisation biochimique et l'évaluation *in vitro* de la toxicité des produits extracellulaires (ECPs) issus de la souche modèle 07/118 T2 a été conduite sur les hémocytes de *C. gigas*. L'ensemble des résultats obtenus sont regroupés dans un second article, en cours de révision, dans la revue «Journal of Invertebrate Pathology»

Un deuxième volet a consisté en l'étude de l'effet *in vitro* des conditions de culture bactérienne sur la toxicité et la composition des ECPs de la souche modèle (07/118 T2). Les principaux résultats ont été regroupés dans une troisième publication qui sera soumise dans le journal «Microbiology».

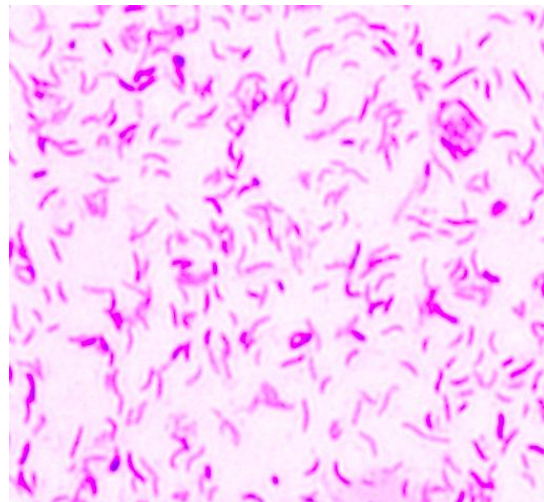
Dans un dernier volet, il est apparu essentiel de caractériser les facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la pathogénicité de la souche française *V. tubiashii*. Dans cet objectif, le stade larvaire de *C. gigas* a été utilisé comme modèle d'interaction par le biais d'infections expérimentales, d'observations microscopiques, d'analyses protéomiques et transcriptomiques. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un quatrième article qui sera soumis prochainement dans le journal «Microbiology».

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Partie A: Les bactéries du genre *Vibrio*



Colonies de la souche *V. tubiashii* (Mersni)



Coloration Gram de la souche française *V. tubiashii*
(Gram négatif) (Mersni)

1. Systématique, caractéristiques biologiques et écologiques

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des micro-organismes aquatiques colonisant le milieu marin. Ces bactéries appartiennent à l'embranchement des *Proteobacteria*, la famille des *Vibrionaceae* et à la classe des *Gamma proteobacteria*.

Les vibrions sont des bacilles gram-négatifs, droits ou incurvés dites en virgule de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,2 à 3,5 µm de longueur. Plusieurs types de motilité sont observés chez ce genre comme: la motilité de type «swimming» qui est assurée souvent par les flagelles polaires dans les environnements liquides, la motilité de type «swarming» via les flagelles latéraux sur les surfaces solides (Shinoda & Okamoto, 1977; Yorimitsu & Homma, 2001) et la motilité de type «twitching» générée par les rétractions du pilus (Ruby *et al.*, 2005).

Les *Vibrio* sont souvent aéro-anaérobies, à métabolisme oxydatif et fermentatif. Ils sont le plus souvent catalase et oxydase positifs, nitrate réductase positifs, produisant généralement de l'acétoïne (un intermédiaire lors de la fermentation butanediolique). Ils sont relativement faciles à isoler à partir de matériel clinique ou de l'environnement, bien que certaines espèces puissent exiger des facteurs spécifiques et / ou des vitamines pour leur croissance. Il existe plusieurs milieux commerciaux qui peuvent être utilisés pour l'isolement des vibrions, comme la gélose tryptone soja additionnée de 1 à 2% de NaCl et le milieu marine agar. Certains vibrions psychrophiles comme, *V. logei*, *V. wodanis*, et *V. salmonicida* se cultivent préférentiellement dans le bouillon Luria-Bertani additionné de 1 à 3 % de NaCl à 15°C et d'autres groupes comme *V. haliotocoli*. et *V. agarivorans*, nécessitent l'addition de l'alginate de sodium (0,5%) dans la gélose marine (Thompson *et al.*, 2004b). Il existe aussi la gélose Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose (TCBS) qui est un milieu sélectif pour isoler les vibrions (Thompson *et al.*, 2004b) mais sa sélectivité repose sur des temps de culture courts et l'identification doit être confirmée par d'autres tests complémentaires. Les vibrions sont capables également de croître dans un milieu minéral contenant du glucose comme seule source d'énergie et de carbone.

Du fait de leur caractère halophile, ces bactéries résistent à des teneurs en sels allant de 0,1 à 30 %. Elles peuvent croître à des températures comprises entre 10°C et 43°C et survivent à des valeurs de pH allant de 5 à 9,6 (Cohen & Karib, 2007).

Généralement, ces bactéries peuvent coloniser de nombreux habitats, sous forme libre planctonique et biofilms ou être associées à des hôtes avec lesquels elles peuvent entretenir des relations du type symbiotique, commensal ou pathogène. Parmi les habitats, on cite les sédiments, l'eau de mer, les estuaires, les infrastructures aquacoles et notamment les organismes marins comme les poissons, les mollusques, les crustacés, les éponges, les coraux, les algues et les zooplanctons (Austin, 2010; Cohen & Karib, 2007).

2. Historique et taxonomie

La première description d'une bactérie du genre *Vibrio*, a été réalisée par le médecin italien Filippo Pacini en 1854 et puis en 1883 par Robert Koch, qui ont contribué à la découverte du rôle de *V. cholerae* dans le choléra. Jusqu'à la moitié du vingtième siècle, l'identification des vibrions a été basée sur quelques descriptions phénotypiques comme la morphologie (flagelle, incurvation de la cellule...) et la croissance dans certains milieux de culture.

Ces simples outils d'identification, ont abouti à une hétérogénéité de classification au sein du genre *Vibrio*. Davis et Park ont montré que 25 souches classées auparavant dans le genre *Vibrio* pouvaient être classées dans trois genres différents (Davis & Park, 1962). À la fin des années soixante, Colwell et Sparks (1967) ont mis en avant le concept de la taxonomie polyphasique qui se base sur des analyses morphologiques, physiologiques, biochimiques et la taxonomie numérique (taxonomie assistée par ordinateur). Cette approche utilisée jusqu'à aujourd'hui a permis de marquer et révolutionner l'histoire de la taxonomie bactérienne. Durant les années 90, quelques tests phénotypiques reposent sur l'utilisation de différentes sources de carbone, la mise en évidence de certaines activités enzymatiques, la tolérance au sel, la croissance à différentes températures, la résistance à des antibiotiques et la composition en GC du génome ont permis une meilleure identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (Alsina & Blanch, 1994a, 1994b).

L'approche phénotypique seule est insuffisante pour identifier une nouvelle espèce d'où la nécessité d'introduire des approches de génotypage moléculaire. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S est devenu un des principaux outils de la taxonomie bactérienne. Pourtant pour la classification des *Vibrio*, cette technique trouve ses limites pour différencier les espèces au sein du même groupe comme le cas pour du groupe *V. splendidus* (Le Roux *et*

al., 2004) et pour distinguer entre *V. brasiliensis* et *V. tubiashii*, *V. coralliilyticus* et *V. neptunius*, *V. anguillarum* et *V. ordalii* (Thompson *et al.*, 2004a). En plus, cette technique reste incomplète pour décrire une nouvelle espèce. Lorsque la similarité des séquences est proche ou au-dessus de 97%, d'autres méthodes d'identification telles que l'hybridation ADN-ADN (DDH) doivent être utilisées (Stackebrandt & Goebel, 1994).

L'hybridation ADN-ADN reste l'outil le plus puissant pour identifier sans ambiguïté les procaryotes, offrant pour la première fois, un moyen fiable pour bien classer le monde bactérien. En utilisant cette technique couplée à des analyses phylogéniques et biochimiques, Ben-Haim et collaborateurs (2003) ont reclassé la souche *V. tubiashii* LMG 10953 (Hada *et al.*, 1984) comme *V. coralliilyticus*. Cependant, cette technique souffre de diverses limitations, y compris la nécessité d'inclure des souches de référence à chaque nouvelle expérience et son utilisation reste limitée à certains laboratoires de référence (Thompson *et al.*, 2009). D'après les règles de classification, une espèce bactérienne est considérée appartenant au sein d'un groupe (y compris la souche de type) lorsque elle présente une DDH similitude > 70%, un T_m (température de dénaturation <5 °C, une % de G+ C <5% et ARNr 16S similarité > 97% (Stackebrandt & Goebel, 1994; Thompson *et al.*, 2009).

En plus, le séquençage du génome complet des différentes bactéries a facilité la comparaison inter et intra-espèces, le regroupement des gènes orthologues et paralogues et la comparaison de l'ordre des gènes (Winsor *et al.*, 2009). Il est intéressant aussi de savoir que l'hybridation génomique comparative (CGH), qui est utilisé en clinique, peut être appliquée dans le typage de souches bactériennes (Lin *et al.*, 2010a).

Aujourd'hui, l'analyse de séquences de plusieurs gènes de ménage (MLSA: Multilocus Sequence Analysis) a permis d'affiner la classification du genre *Vibrio*. En utilisant cet outil, Thompson et collaborateurs (2005) ont montré que *V. harveyi* et *V. campbellii* forment deux groupes distincts et Hoffman et collaborateurs (2012) ont prouvé que *V. communis* et *V. owensii* appartiennent à la même espèce.

Il semble difficile de présenter une classification précise des bactéries appartenant au genre *Vibrio*, groupe qui subit régulièrement des modifications importantes et qui ne cesse d'évoluer. Jusqu'à maintenant 115 espèces et 2 sous-espèces ont été identifiées (J.P. Euzéby: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature [<http://www.bacterio.cict.fr/uw/vibrio.html>]).

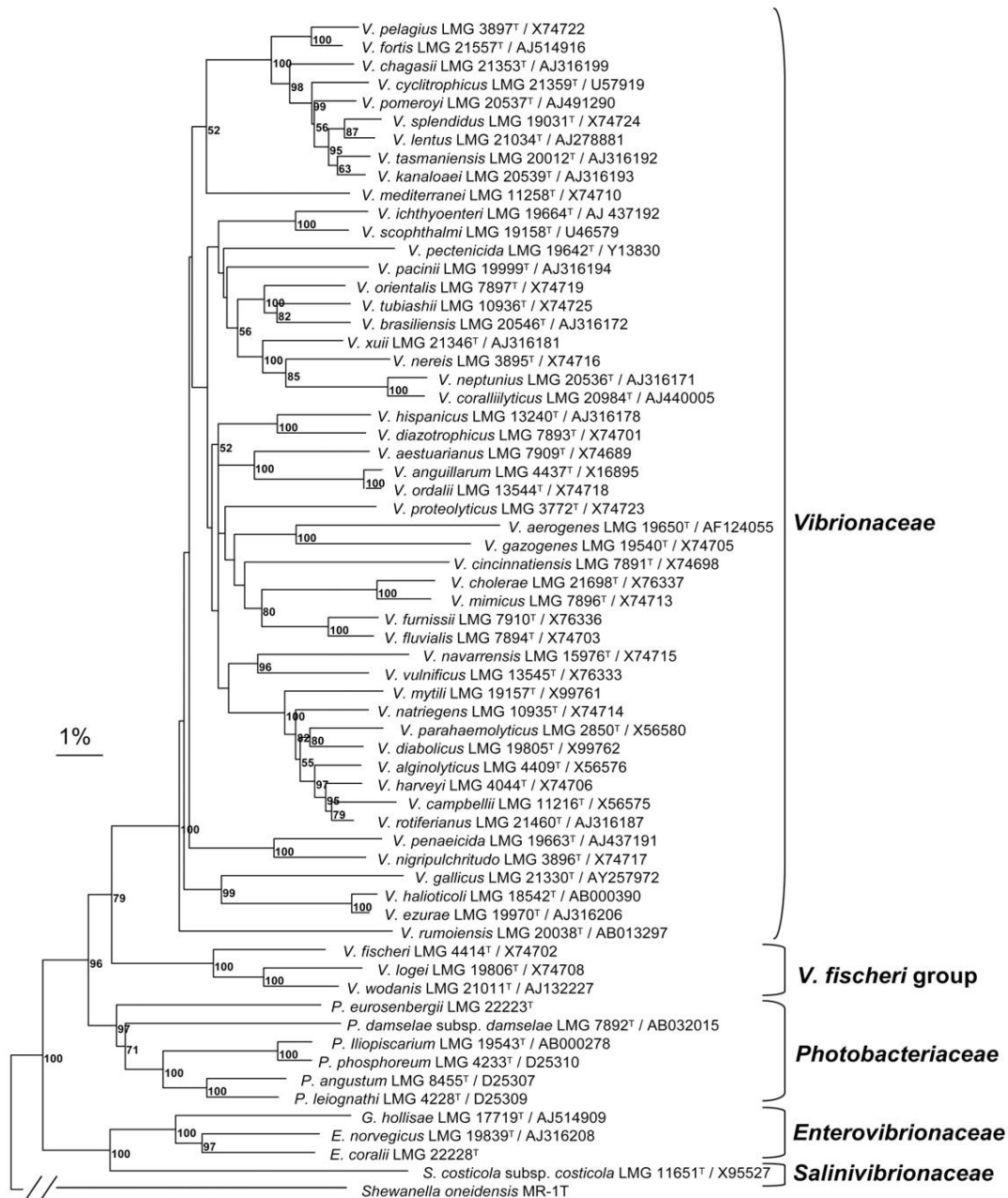


Figure 2: Représentation de l'arbre phylogénétique regroupant les différentes familles de vibrions basé sur la méthode de neighbor-joining, en utilisant les séquences des gènes concaténés d'ARNr 16S, recA et rpoA (2898 pb). L'estimation des distances a été obtenue par le modèle de Jukes et Cantor (Thompson *et al.*, 2004b).

3. Structure du génome

Le génome de *V. cholerae* a été initialement décrit comme un seul chromosome de 3,2 Mb (Majumder *et al.*, 1996). Grâce à la technique d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), Trucksis et collaborateurs (1998) ont montré que cette espèce possède deux mégas plasmides

séparés. Depuis, toutes les études de séquençage de génomes complets (Schoolnik & Yildiz, 2000; Chen *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Ruby *et al.*, 2005) ainsi que les analyses en PFGE (Okada *et al.*, 2005) de différentes espèces de *Vibrio* ont confirmé que cette organisation structurale était une caractéristique commune des *Vibrionaceae*. Ainsi, le génome des *Vibrio* est composé de deux chromosomes circulaires, un chromosome I, de taille plus importante que le chromosome II (*V. cholerae*, 2,4 Mb pour le chromosome I et 1,5 Mb pour le chromosome II (Trucksis *et al.*, 1998))

Généralement, le chromosome I, contient les gènes codant pour les principales fonctions vitales de la bactérie: la réplication et la réparation de l'ADN, la transcription, la traduction, la biosynthèse de la membrane cellulaire, des gènes impliqués dans des voies centrales cataboliques ou de biosynthèse et les gènes connus pour être essentiels dans la pathogénicité bactérienne (les gènes codant les toxines, lipopolysaccharides et toute la machinerie de sécrétion des protéines extracellulaires). Contrairement au chromosome I, le chromosome II contient une proportion importante de gènes hypothétiques et des gènes à fonctions inconnues (Heidelberg *et al.*, 2000).

4. Espèces pathogène du genre *Vibrio*

4.1. Les vibrions pathogènes pour l'Homme

V. cholerae, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* sont les espèces les plus pathogènes pour l'Homme et à l'origine des plus grands risques en termes de santé publique.

V. cholerae, l'espèce type du genre *Vibrio*, est l'agent causal du choléra. Cette maladie infectieuse à caractère le plus souvent épidémique se manifeste par une violente diarrhée accompagnée de vomissements après une incubation variant de quelques heures à quelques jours. Cette espèce est subdivisée en 200 sérogroupes établis à partir de l'antigène O (un constituant du complexe lipo-saccharidique situé dans la membrane externe de bactéries). Seuls les sérogroupes O1 et O139 sont à l'origine des pandémies cholériques (Reidl & Klose, 2002). Cette souche qui infecte l'hôte à travers l'eau et/ou une alimentation contaminée s'adhère au niveau des intestins et produit une entérotoxine désignée par «cholera toxin» (CT) provoquant une diarrhée intense qui peut conduire à la mort. Cependant, dans

l'environnement *V. cholerae* ne présente aucun effet sur les organismes marins (Reidl & Klose, 2002; Thompson *et al.*, 2004b).

Depuis 2000, l'incidence du choléra a augmenté régulièrement. Entre 2003 et 2004, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a signalée 15 000 nouveaux cas de choléra seulement en Afrique, principalement au Mali, au Mozambique et en Zambie. En octobre 2010, des cas de choléra ont été rapportés en Haïti pour la première fois depuis plus de cent ans. La recherche a révélé qu'il s'agit du *V. cholerae* sérogroup O1, biotype Ogawa. Jusqu'en juillet 2011, plus de 220 000 cas avaient été enregistrés, dont 5 968 décès (Ceccarelli *et al.*, 2011; Pfrimmer, 2010; Tappero & Tauxe, 2011).

V. parahaemolyticus cause de sévères gastroentérites à caractère parfois pandémique chez l'Homme. Il existe 13 sérogroupes de type O et 71 sérogroupes de type K. Il a été décrit que le pouvoir pathogène de cette bactérie est lié à la présence de l'hémolysine TDH (Thermostable Direct Hemolysin) et l'hémolysine TRH (Tdh-Related Hemolysin) produites dans le tube digestif. Ces deux toxines présentent des activités lytiques, cytotoxiques et entérotoxiques (Nishibuchi & Kaper, 1995; Okuda *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 2004b). Le séquençage du génome complet de *V. parahaemolyticus* (Makino *et al.*, 2003) a révélé la présence du système de sécrétion de type III (SSTT), qui est essentiel pour la pathogénicité de plusieurs bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia* mais absent chez *V. cholerae* (Thompson *et al.*, 2004b). Cette souche est largement distribuée en milieu marin côtier; elle a été décelée dans l'eau de mer et les sédiments et fait partie de la flore normale des produits de la mer.

La première épidémie confirmée est survenue au Japon en 1950. 272 malades et 20 morts ont été recensés après la consommation de jeune sardines mi-séchées (Nair *et al.*, 2007). Depuis, cette bactérie, particulièrement le sérotype O3: K6, a été détectée dans plusieurs endroits dans le monde où la consommation de poissons et fruits de mer crus est importante comme au Chili, en France, au Japon, en Corée, en Espagne, à Taïwan, aux États-Unis, et particulièrement dans les pays d'Extrême-Orient comme l'Inde, le Bangladesh et la Thaïlande (Nair *et al.*, 2007).

V. vulnificus, désigné dans un premier temps comme «lactose-positive *Vibrio*», est un agent étiologique important des infections des plaies exposées à l'eau de mer et de septicémie primaire avec des lésions secondaires suite à la consommation des coquillages chez l'Homme (Blake *et al.*, 1979; Thompson *et al.*, 2004b). Ce type de septicémie survient principalement

chez les personnes immunodéprimées ou souffrant de désordres hépatiques (alcoolisme ou surcharge en fer). Le taux de mortalité chez ces malades est de l'ordre de 50 % mais il peut atteindre 90 % chez des patients souffrant d'hypotension. Chez les immunocompétents, uniquement des gastro-entérites, sans septicémie, sont observées (Miossec, 2002). Deux biotypes ont été définis pour *V. vulnificus*, Biotype 1 et 2, classés selon des critères phénotypiques et selon l'espèce de l'hôte (Tison *et al.*, 1982). Quelques facteurs de virulence ont été caractérisés chez cette espèce comme: la présence de polysaccharide capsulaire (CPS), qui confère à la bactérie une résistance à la phagocytose et aux protéines de compléments (Miyoshi *et al.*, 2002), des chélateurs du fer comme les sidérophores et la production des exotoxines (Amaro & Biosca, 1996).

D'autres vibrions, comme, *Grimontia hollisae*, *Photobacterium damsela*, *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. harveyi*, *V. metschnikovii* et *V. mimicus*, ont été trouvés dans des infections humaines avec un nombre limité de cas cliniques (Tantillo *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004b).

Tableau 1: Association des espèces de *Vibrio* pathogènes avec des syndromes cliniques (Tantillo *et al.*, 2004). +++ Association courante; ++ Association possible; + Association rare; * Association non établie avec certitude

Espèces de <i>Vibrio</i>	Septicémie primaire	Gastroentérite	Infection des plaies
<i>V. cholerae</i> O1	*	+++	+
<i>V. cholerae</i> non-O1	+	+++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	+	+++	++
<i>V. vulnificus</i>	+++	++	+++
<i>V. fluvialis</i>	*	++	*
<i>V. alginolyticus</i>	+	*	+++
<i>V. damsela</i>	*	*	+++
<i>V. furnisii</i>	*	+	*
<i>V. hollisae</i>	+	++	*
<i>V. mimicus</i>	*	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	+	+	*
<i>V. cincinnatiensis</i>	+	*	*

4.2. Les vibrions pathogènes des organismes marins

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries dominantes des écosystèmes marins. A part quelques espèces pathogènes pour l'Homme, la majorité des espèces pathogènes affecte les animaux marins. le genre *Vibrio*, associé à d'autres groupes comme *Achromobacter*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*, constitue une grande proportion de la flore bactérienne du monde aquatique (Colwell & Liston, 1960; Urdaci *et al.*, 1988; Cahill, 1990; Vandenberghe *et al.*, 2003). Cependant, certaines espèces sont classées comme des agents étiologiques responsables des pertes économiques importantes dans plusieurs filières aquacoles. Le tableau

2 réunit l'ensemble des vibrions décrits comme pathogènes chez les poissons, les crustacés et autres organismes marins (coraux, mollusques ...). Ceux affectant les bivalves vont être décrits ultérieurement.

Tableau 2: Espèce de *Vibrio* pathogène de poissons, de crustacées et de mollusques

Poissons	Espèces pathogènes	Organismes Susceptibles	Références
	<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>aestuarianus</i> .	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Fugu vermicularis</i> <i>Sparus aurata</i> .	(Noguchi <i>et al.</i> , 1987) (Colorni <i>et al.</i> , 1981)
	<i>V. anguillarum</i>	<i>Salmo salar</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Plecoglossus altivelis</i>	(Frans <i>et al.</i> , 2011)
	<i>V. cholerae</i> non O1	<i>Plecoglossus altivelis</i>	(Kiiyukia <i>et al.</i> , 1992)
	<i>V. damsela</i>	<i>Chromis punctipinnis</i> <i>Seriola quinqueradiata</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Dasyatis pastinaca</i> <i>Orectolobus ornatus</i>	(Love <i>et al.</i> , 1981) (Sakata <i>et al.</i> , 1989) (Fouz <i>et al.</i> , 1992) (Pedersen <i>et al.</i> , 1997)
	<i>V. harveyi</i>	<i>Epinephelus coioides</i> et autres espèces de poissons <i>Paralichthys dentatus</i> <i>Acanthurus sohal</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2002; Yii <i>et al.</i> , 1997) (Soffientino <i>et al.</i> , 1999) (Hashem & El-Barbary, 2013)
	<i>V. ordalli</i>	<i>Oncorhynchus keta</i>	(Ransom <i>et al.</i> , 1984; Schiewe <i>et al.</i> , 1981)
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Aphanius iberus</i> Plusieurs espèces de poissons démersaux et poissons pélagiques	(Alcaide <i>et al.</i> , 1999) (Sudha <i>et al.</i> , 2012)
	<i>V. splendidus</i>	<i>Labrus bergylta</i> <i>Ctenolabrus rupestris</i>	(Birkbeck & Treasurer, 2014)
	<i>V. vulnificus</i> biotype 2	<i>Anguilla japonica</i> <i>Anguilla anguilla</i>	(Tison <i>et al.</i> , 1982) (Biosca <i>et al.</i> , 1991)

Crustacés	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i> <i>Charybdis japonica</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2004) (Xu <i>et al.</i> , 2013)
	<i>V. harveyi</i>	<i>Peneaus monodon</i> <i>Litopenaeus vannamei</i>	(Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> , 1990) (Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>V. metschnikovii et V. fluvialis</i>	<i>Peneaus monodon</i>	(Alavandi <i>et al.</i> , 2008)
	<i>V. nigripulchritudo</i>	<i>Litopenaeus stylirostris</i>	(Goarant <i>et al.</i> , 2006)
	<i>V. owensii</i>	<i>Panulirus ornatus</i> <i>Peneaus monodon</i>	(Cano-Gómez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>V. penaeicida</i> <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Peneaus stylirostris</i> <i>Peneaus monodon</i>	(Costa <i>et al.</i> , 1998) (Alapide-Tendencia & Dureza, 1997)
Mollusques	<i>V. coralliilyticus</i> <i>V. harveyi</i>	<i>Pocillopora damicornis</i> <i>Scleractinian</i>	(Ben-Haim & Rosenberg, 2002; Ben-Haim <i>et al.</i> , 2003) (Weil <i>et al.</i> , 2006)
	<i>V. lentus</i> <i>V. alginolyticus</i>	<i>Octopus vulgaris</i> <i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	(Farto <i>et al.</i> , 2003) (Liu <i>et al.</i> , 2001)
	<i>V. harveyi</i>	<i>Haliotis tuberculata</i> <i>Haliotis diversicolor</i> <i>Pinctada maxima</i>	(Nicolas <i>et al.</i> , 2002a; Travers <i>et al.</i> , 2008) (Jiang <i>et al.</i> , 2013) (Pass <i>et al.</i> , 1987)
	<i>Vibrio shiloi</i>	<i>Oculina patagonica</i>	(Kushmaro <i>et al.</i> , 2001)

Chez les mollusques bivalves, les vibrions sont considérés comme le genre le plus fréquemment isolé lors des épisodes de mortalités anormales. Ces mortalités affectent les différents stades de la vie : les stades larvaires et post-larvaires au sein des écloséries et des nurseries et les stades juvéniles et adultes dans leur milieu naturel (Romalde & Barja, 2010).

Introduction bibliographique: Partie A

Pour l'huître creuse *C. gigas* les causes de mortalité restent incertaines, bien que plusieurs études suggèrent que ce phénomène émane d'une étiologie complexe impliquant des facteurs de stress environnementaux (épuisement de l'oxygène, le manque de nourriture, la salinité, la température, la pollution industrielle, les pesticides, les pratiques d'aquaculture...), des facteurs biologiques incluant les parasites, les virus et les bactéries et l'altération de la physiologie de l'hôte (Samain *et al.*, 2007). Concernant l'implication du genre *Vibrio* dans ces événements de mortalité, les principaux hôtes et espèces pathogènes sont référencés dans le tableau 3.

Tableau 3: Les *Vibrios* chez les mollusques bivalves (larves et juvéniles) issus des épisodes de mortalités (Paillard *et al.*, 2004a; Romalde & Barja, 2010; Romalde *et al.*, 2014). * Certaines espèces de *Vibrio* ont été reclassées après.

Espèces pathogènes	Hôte (s)	Stage de vie	Références
<i>V. aestuarianus</i> <i>subsp. francensis</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Juvéniles/Adultes	(Garnier <i>et al.</i> , 2007, 2008)
		Naissain/Adultes	(Saulnier <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. alginolyticus</i> *	<i>Crassostrea virginica</i> <i>Mercenaria mercenaria</i>	Larves/Juvéniles	(Tubiash <i>et al.</i> , 1965, 1970)
			(Jeffries, 1982)
	<i>Crassostra gigas</i> <i>Ostrea edulis</i>	Larves	(Riquelme <i>et al.</i> , 1996)
	<i>Argopecten purpuratus</i>	Larves	(Gómez-León <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Venerupis decussatus</i>	Larves	
<i>V. anguillarum</i> *	<i>Crassostrea virginica</i> <i>Mercenaria mercenaria</i>	Larves/Juvéniles	(Tubiash <i>et al.</i> , 1965, 1970)
			(C Riquelme, 1995)
<i>V. brasiliensis</i>	<i>Argopecten purpuratus</i>	Larves	
	<i>Nodipecten nodosus</i>	Larves	(Thompson <i>et al.</i> , 2003a)
<i>V. crassostreae</i>	<i>Crassostra gigas</i>	Juvéniles	(Fauray <i>et al.</i> , 2004)
<i>V. coralliilyticus</i>	<i>Perna canaliculus</i>	Larves	(Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Ostrea edulis</i>	Larves	(Prado <i>et al.</i> , 2005)
<i>V. fortis</i>	<i>Nodipecten subnodosus</i>	Larves	(Thompson <i>et al.</i> , 2003b)
	<i>Crassostra gigas</i>		

Introduction bibliographique: Partie A

Groupe <i>Harveyi</i> *	<i>Crassostrea gigas</i>	Naissain	(Saulnier <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. neptunius</i>	<i>Ostrea edulis</i>	Larves	(Prado <i>et al.</i> , 2005)
<i>V. neptunius-like</i>	<i>Perna canaliculus</i>	Larves	(Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2009)
<i>V. pectenica</i>	<i>Pecten maximus</i>	Larves	(Lambert <i>et al.</i> , 1998; Nicolas <i>et al.</i> , 1996)
Groupe <i>Splendidus</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	Larves	(Le Roux, 2002; Sugumar <i>et al.</i> , 1998; Gay <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Venerupis decussatus</i>	Larves	(Gómez-León <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Pecten maximus</i> <i>Crassostrea gigas</i>	Adultes Juvéniles	(Lambert <i>et al.</i> , 1999) (Lacoste <i>et al.</i> , 2001)
<i>V. tapetis</i>	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Venerupis philippinarum</i>	Naissains Adultes	(Saulnier <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Venerupis philippinarum</i> et <i>decussatus</i>	Juvéniles/Adultes	(Borrego <i>et al.</i> , 1996; Paillard & Maes, 1995; Paillard <i>et al.</i> , 1989)
<i>V. tubiashii</i>	<i>Ostrea edulis</i> <i>Crassostrea gigas</i>	Larves	(Elston <i>et al.</i> , 2008; Lodeiros <i>et al.</i> , 1987; Takahashi <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Crassostrea sikamea</i> <i>Panope abrupta</i>	Larves/Juvéniles	(Elston <i>et al.</i> , 2008)

En France, lors des épisodes de mortalités observés chez les mollusques bivalves, des bactéries appartenant au genre *Vibrio* ont été détectées. En effet, dans le cadre de la surveillance nationale des maladies des mollusques entre 2003 et 2007, Saulnier et collaborateurs (Saulnier *et al.*, 2010) ont analysé 92 lots d'échantillons principalement des huîtres du Pacifique (*C. gigas* qui représentent 80% des échantillons). Par séquençage de l'ARNr 16S et du *gyrB* (gyrase B), les bactéries majoritaires identifiées sont *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, mais également des souches bactériennes du groupe *harveyi*.

Dans le chapitre suivant, nous nous intéresserons à la souche *V. tubiashii* en raison de son importante implication dans les épisodes de mortalités affectant principalement les larves de l'huître creuse *C. gigas* et en plus cette espèce fera l'objet de l'étude menée au cours de ces travaux de thèse.

4.3. *Vibrio tubiashii*

En 1965, trois souches codées ATCC 19105, 19106 et 19109 isolées chez des mollusques bivalves (larves et juvéniles d'huîtres et de praire) pendant un épisode de mortalité à Milford aux Etats-Unis ont montré une similarité avec la souche *V. anguillarum* (Tubiash *et al.*, 1965, 1970). En 1984, suite à des progrès dans la taxonomie bactérienne (West *et al.*, 1983), Hada et collaborateurs (1984) ont reclassé ces trois souches en tant qu'une nouvelle espèce du genre *Vibrio* désignée *V. tubiashii* hommage à Tubiash, et ATCC 1909 a été désignée comme la souche type pour cette nouvelle espèce.

V. tubiashii est une bactérie gram négatif, non lumineuse, sous forme de bâtonnet court droit ou incurvé (0,5 à 1,5 µm). Elle est dotée d'une grande motilité assurée par un seul flagelle polaire. Les colonies sur le milieu Marine agar sont blanchâtres, lisses, circulaires avec une texture crémeuse. Sur TCBS, les colonies sont aussi lisses et circulaires mais avec une coloration jaunâtre (fermentation du saccharose). Le chlorure de sodium est nécessaire pour sa croissance avec une concentration optimale de 1 à 3 % (m/v) et pas de croissance à 8 % de NaCl. Elle est anaérobie facultative, catalase et oxydase positive, Voges-Proskauer négative et elle réduit le nitrate en nitrite. Elle hydrolyse d'une manière extracellulaire la chitine, l'ADN, la gélatine, la lécithine, l'amidon, le Tween 80, la tyrosine, et la xanthine mais pas l'alginate de sodium et l'élastine. Elle peut croître sur un milieu minéral simple sur une variété de sources de carbone dont la glycine, le mannose et le galactose mais pas en présence de D-sorbitol ou γ -aminobutyrate et elle exprime la β -galactosidase. Elle fermente le saccharose et le D-mannose en acide mais pas le L-arabinose, l'arbutine (β -glucoside d'hydroquinone), le m-inositol, le lactose, le raffinose, le L-rhamnose, la salicine, le D-sorbitol et le D-xylose. Elle est sensible à l'agent vibriostatique O/129 et à la polymyxine (Hada *et al.*, 1984). Ce qui caractérise la souche *V. tubiashii* par rapport aux autres espèces du genre *Vibrio*, est sa capacité d'hydrolyser la xanthine et la tyrosine et de croître sur l'adénine et le mélibiose (Hada *et al.*, 1984).

La nécrose bacillaire «bacillary necrosis» est la première maladie décrite causée par la souche *V. tubiashii*. Cette infection touche particulièrement les larves et les juvéniles de mollusques bivalves et constitue aux USA l'un des problèmes majeurs rencontrés dans les écloséries entraînant des pertes graves dans la filière conchylicole. Tubiash et collaborateurs étaient les premiers à décrire les symptômes de cette maladie: «une maladie rapide et dramatique». Dès les premières heures d'infection (4 à 5 h), les premiers signes apparaissent: une réduction de la motilité avec un velum étendu et des amas de bactéries commençant à

apparaître autour des larves et ses organes (Figure 2a et b). La formation de ses amas bactériens présente le symptôme pathognomonique de la nécrose bacillaire. Plus tard, les essaims deviennent de plus en plus denses et omniprésents, d'une manière semblable à l'essaimage des abeilles le long du manteau et de la coquille interne. Une perte de la ciliature et des exfoliations des cellules épithéliales du velum surviennent alors et le plateau de mortalité est souvent atteint en 18 heures (Tubiash *et al.*, 1965; Estes *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008). Les coupes histologiques effectuées sur des larves infectées montrent parfaitement l'invasion, la prolifération bactérienne et la destruction cellulaire (Figure 2c) (Tubiash *et al.*, 1965). Il est important de signaler que les mêmes signes d'infection ont été retrouvés chez des larves de l'huître creuse avec d'autres espèces de *Vibrio* (Nicolas *et al.*, 1996; Sugumar *et al.*, 1998).

D'autre part, des études ont montré que *V. tubiashii* peut induire la maladie par le biais de toxines extracellulaires (Brown & Losee, 1978; Brown & Roland, 1984).

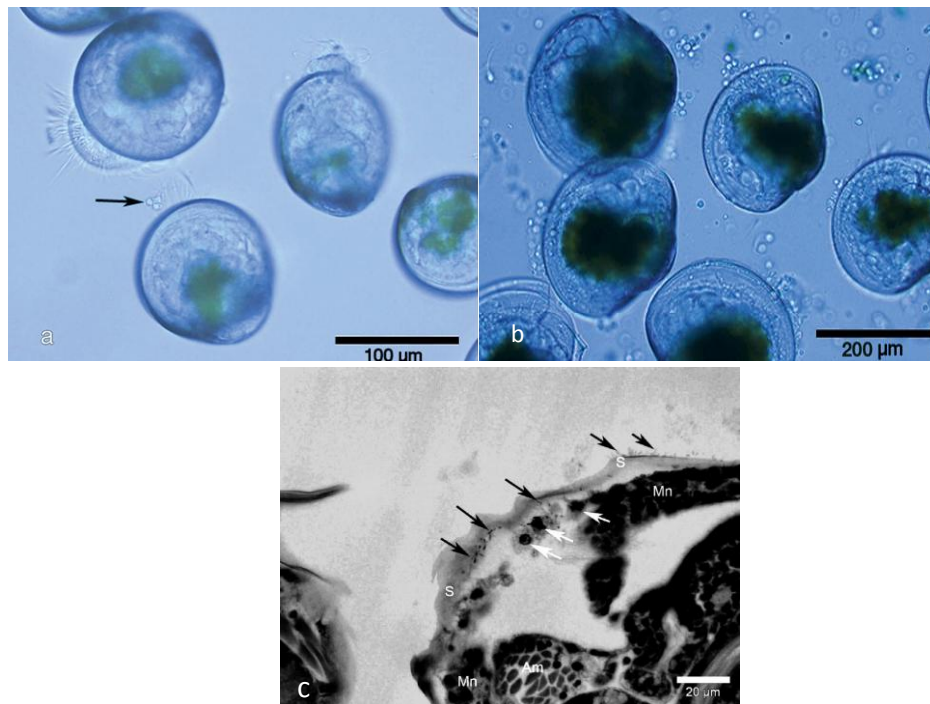


Figure 3: Photo de larves d'huître *C. gigas* issus d'une infection par *V. tubiashii* (a): Stade véligère: velums déformés et perte de cellules vélaires (indiqué par la flèche). (b) Stade intermédiaire: desquamation des cellules épithéliales du velum. (c): Coupe histologique d'une larve infectée; flèches noires et (S), montrent les cellules bactériennes à la surface extérieure de la coque et les flèches blanches montrent les cellules épithéliales du manteau nécrosées ou mortes. Mn: manteau et Am: muscle adducteur (Elston *et al.*, 2008).

Concernant la répartition géographique du *V. tubiashii*, cette espèce a été tout d'abord isolée à partir de larves et juvéniles moribondes de praire (*M. mercenaria*) et chez l'huître

juvénile (*C. virginica*) sur la Côte Est des Etats-Unis (Tubiash *et al.*, 1965; Hada *et al.*, 1984). Après, cette espèce a été retrouvée dans des écloséries en Angleterre et en Espagne infectant des larves de l’huître creuse du Pacifique (*C. gigas*) et l’huître plate (*O. edulis*) (Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987). Durant cette dernière décennie, une réapparition de *V. tubiashii* a été détectée sur la Côte Ouest de l’Amérique du Nord et Hawaï infectant des stades larvaires et juvéniles. En plus de l’huître creuse, cette espèce a été isolée de l’huître Kumamoto (*C. sikamea*) et de la palourde royale (*P. abrupta*) (Estes *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008).

Le premier génome de *V. tubiashii* (ATCC 19106) a été séquencé en 2011 par Temperton et collaborateurs. Ils ont montré que cette dernière est phylogénétiquement proche de *V. orientalis* et *V. coralliilyticus*. Elle possède un long génome composé de deux chromosomes (un petit de 1,9 Mb et un grand chromosome de 3,4 Mb). Un total de 4 950 gènes ont été prédits dont 4 864 sont des gènes codant pour des protéines. 74,22 % des gènes codant pour des protéines ont été affectés à une fonction putative et le reste annoté comme protéines hypothétiques (Temperton *et al.*, 2011). Le tableau 3 résume les différentes études menées sur *V. tubiashii*.

Tableau 4: Historique des études réalisées sur l’espèce *V. tubiashii*

Principaux résultats	Souches étudiées	Références
Avant l’identification de <i>V. tubiashii</i>		
Cinq souches bactériennes différentes issues de bivalves moribondes: larves et juvéniles de praire (<i>M. mercenaria</i>) et d’huître Américaine (<i>C. virginica</i>). Ces bactéries sont responsables à une maladie appelée nécrose bacillaire (écloséries/sur les côtes Est Américaine).	M27, M74, M17, V65 et V67 M: Milford V: Virginia	(Tubiash <i>et al.</i> , 1965)
Appartenance de ces souches au genre <i>Vibrio</i> .	<i>V. alinolyticus</i> : ATCC 19108 <i>V. anguillarum</i> : ATCC 19105 (M17), 19106 (M27), 19109 (M74), CB4 <i>V. sp</i> : 19107 et CB25	(Tubiash <i>et al.</i> , 1970)
	Isolats bactériens	(Brown & Losee,

Implication de toxines bactériennes dans la virulence des bactéries isolées à partir de larves moribondes de l'huître Américaine.	d'huître <i>C. virginica</i> similaire à <i>V. anguillarum</i>	1978; Brown & Roland, 1984)
Caractérisation de trois souches de <i>Vibrio</i> , similaires aux souches décrites par Tubiash (1965), pathogènes de larves de <i>C. gigas</i> et <i>O. edulis</i> (écloseries/Angleterre)	NCMB 2164(B-Z), NCMB 2165 (B-SS) NCMB 2166 (B-TE)	(Jeffries, 1982)
Après l'identification de <i>V. tubiashii</i>		
Description de l'espèce: <i>V. tubiashii</i> .	NCMB 2164(B-Z), NCMB 2165 (B-SS), NCMB 2166 (B-TE), ATCC 19105 ATCC 19106 et ATCC 19109	(Hada <i>et al.</i> , 1984)
Pathogénicité de la souche et modèles infectieux		
Implication de <i>V. tubiashii</i> dans les mortalités de larves de l'huître plate (<i>O. edulis</i>) → Symptômes typiques de la nécrose bacillaire et production des exotoxines toxiques (écloseries/nord-ouest de l'Espagne).	<i>V. tubiashii</i> EX1,	(Lodeiros <i>et al.</i> , 1987)
Protection des larves d'huîtres creuses de l'infection par <i>V. tubiashii</i> par mise en contact avec l'ovoglobuline.	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19106	(Takahashi <i>et al.</i> , 2000)
Criblage des souches pathogènes de larves et de juvéniles d'huître creuse (écloseries/côte Ouest de l'Amérique du Nord).	33 isolats testés, les plus pathogènes sont: RE 22, RE 98 et RE 101 et RE 60) (issus de larves de <i>C. gigas</i>)	(Estes <i>et al.</i> , 2004)
Réapparition de <i>V. tubiashii</i> affectant de nouveaux hôtes autres que <i>C. gigas</i> (Larves et juvéniles) (écloseries/côte Ouest de l'Amérique du Nord et Hawaii).	Isolats entre 2006-2007	(Elston <i>et al.</i> , 2008)

Evaluation de la réponse transcriptomique de l'huître creuse suite à une infection par <i>V. tubiashii</i>	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19106	(Taris <i>et al.</i> , 2009)
Utilisation de <i>V. tubiashii</i> et <i>M. edulis</i> comme modèles pour étudier l'interaction hôte-pathogène face au problème d'acidification des océans.	<i>V. tubiashii</i> NCIMB 1337 (ATCC19106)	(Asplund <i>et al.</i> , 2013)
Implication de facteurs de virulence		
Mise en évidence d'une cytolysine présentant des effets cytotoxiques et cytolytiques envers des modèles cellulaires.	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19105 et ATCC 19109	(Kothary <i>et al.</i> , 2001)
Caractérisation d'une métalloprotéase possédant des propriétés d'agglutination des érythrocytes.	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19105	(Delston <i>et al.</i> , 2003)
Caractérisation de protéines de la membrane externe (OMP) de <i>V. tubiashii</i> : la protéine OmpU	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19105 et ATCC 19109	(Beaubrun <i>et al.</i> , 2008)
Evaluation <i>in vitro</i> de l'importance de la métalloprotéase VtpA dans la pathogénicité de <i>V. tubiashii</i> pour les larves de l'huître creuse.	<i>V. tubiashii</i> RE 22 et RE 98	(Hasegawa <i>et al.</i> , 2008)
Inhibition de l'activité hémolytique présente dans le surnageant de culture par la métalloprotéase VtpA au cours de la croissance de <i>V. tubiashii</i> .	<i>V. tubiashi</i> RE 22, RE 98, RE 78 et ATCC 19105	(Hasegawa & Häse, 2009a)
Stimulation de la production de sidérophores (hydroxymate) et expression des protéines de la membrane externe dans des conditions limitées en fer.	<i>V. tubiashii</i> ATCC 19105 et ATCC 19109	(Junia Jean-Gilles Beaubrun 2011).
Outils de diagnostiques		
Développement d'un outil (Q-PCR) ciblant le gène Vtp A pour la détection	<i>V. tubiashii</i> 00-90-6 <i>V. tubiashii</i> 00-90-7	(Gharaibeh <i>et al.</i> , 2009)

de *V. tubiashii* en écloséries.

V. tubiashii RE22
V. tubiashii RE98
V. tubiashii
ATCC19105

Développement d'un anticorps utilisé pour des tests immuno-enzymatiques et des tests immunologiques pour la détection de *V. tubiashii* à travers sa métalloprotéase VtpA.

V. tubiashi RE 22 et
RE 98

(Gharaibeh *et al.*,
2013)

5. Les facteurs de virulence du genre *Vibrio*

5.1. Les notions de pathogénicité et de virulence

Avant de décrire les facteurs de virulence associés au genre *Vibrio*, il est indispensable de différencier les notions de pathogénicité et de virulence et de comprendre la relation entre ces deux concepts.

Classiquement décrit, un agent pathogène est un microorganisme qui provoque une maladie ou qui peut se multiplier dans le tissu vivant et induire des maladies (Casadevall & Pirofski, 1999) et le pouvoir pathogène est la capacité d'un microorganisme à induire une maladie (Smith, 1977). Cette interprétation des termes suggère que la pathogénicité est une caractéristique liée seulement au microorganisme et indépendante de l'hôte. Or cette définition semble insuffisante car un microorganisme peut coloniser sans nuire à l'hôte. En 1999, Casadevall et Pirofski ont apporté des améliorations dans les définitions de base (Casadevall & Pirofski, 1999). Ainsi, un agent pathogène est un microorganisme capable de causer des dommages à l'hôte et le pouvoir pathogène est la capacité d'un microorganisme à causer des dommages à l'hôte. Avec cette nouvelle reformulation des définitions, la pathogénicité n'est plus une caractéristique invariante et indépendante de l'hôte mais le résultat d'une interaction entre l'hôte et le microorganisme (Casadevall & Pirofski, 1999, 2003)

Concernant la virulence, plusieurs définitions ont été aussi proposées à cette la notion (Casadevall & Pirofski, 1999):

- Le degré de la pathogénicité,
- La force de l'activité d'un pathogène,
- Le synonyme de la pathogénicité,
- Le pourcentage de mortalité par infection,
- La capacité relative de surmonter la défense disponible d'un hôte,
- La mesure de la capacité d'un microorganisme à infecter ou endommager un hôte,
- La capacité relative d'entrer et de se multiplier dans un hôte donné,
- La gravité de la maladie.

Plus tard, une définition plus drastique a été accordée à la notion de la virulence et qui associe de la même manière l'hôte et l'agent infectieux: c'est la capacité relative d'un microorganisme à causer des dommages à l'hôte (Casadevall & Pirofski, 1999).

Certaines définitions varient entre et au sein des disciplines (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005) et peuvent entraîner une confusion. Ainsi, la majorité des pathologistes choisissent d'utiliser une définition au sens large qui associe la notion de la virulence à la notion de la pathogénicité (Thomas & Elkinton, 2004).

De même, la terminologie utilisée pour décrire les facteurs de virulence a été modifiée pour passer de « produits microbiens qui permettent à un agent pathogène de provoquer une maladie » (Smith, 1977) à une définition au sens large « tout composant d'un microorganisme qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie » (Schaechter *et al.*, 1999). Cette définition absolue inclut implicitement les substances non toxiques pour l'hôte qui peuvent quand même être considérées comme des facteurs de virulence si leur absence rendent le microorganisme moins virulent (Schaechter *et al.*, 1999).

Enfin, il est important de considérer les thèmes suivants: (1) très peu de facteurs de virulence fonctionnent comme des facteurs déterminants de la virulence; (2) les dommages sont causés soit directement par les microorganismes ou par un composant microbien soit par la réponse immunitaire de l'hôte et (3) les réponses immunitaires peuvent neutraliser plusieurs ou une partie des facteurs de virulence (Casadevall & Pirofski, 2009).

5.2. Les mécanismes de virulence chez les *Vibrio*

Pour provoquer la maladie chez l'hôte, l'agent pathogène doit posséder de nombreux attributs: la possibilité de pénétrer un hôte, la capacité à échapper aux défenses de l'hôte, l'aptitude à croître dans l'hôte, la capacité d'affronter les réponses immunitaires de l'hôte, la capacité à acquérir le fer et les nutriments nécessaires de l'environnement (Casadevall & Pirofski, 2009).

Avec toutes ces propriétés, la classification des facteurs de virulences semble être un exercice difficile (Casadevall & Pirofski, 2009) car plusieurs déterminants de virulence partagent les mêmes mécanismes et les mêmes caractéristiques (Finlay & Falkow, 1997) et même si leur classification en catégorie fonctionnelle paraît plus rationnelle, nous ne pouvons

pas ignorer que certains composants peuvent être attribués à plus d'une fonction (Casadevall & Pirofski, 1999, 2009).

Concernant le genre *Vibrio*, plusieurs facteurs de virulence ont été décrits dans la littérature. Le Tableau présenté ci-dessous (Tableau 5) résume les principaux facteurs de virulence identifiés chez des *Vibrio* pathogènes pour l'Homme et pathogènes pour les organismes marins classés arbitrairement par rapport à leurs fonctions pendant les différentes étapes de l'infection.

Tableau 5: les différents facteurs de la virulence décrits chez le genre *Vibrio*

	Facteurs	Fonction (s) principale (s)	Références
Les facteurs d'adhésion et de colonisation (Mise en contact hôte-pathogène)	Le flagelle	<ul style="list-style-type: none"> - Facilite le mouvement chimiotactique dirigé (swarming et swimming). - Attachement. - Formation de biofilm. - Impliqué dans la virulence (pénétration). 	(Guentzel & Berry, 1975; Milton <i>et al.</i> , 1996; Richardson, 1991; R. & E., 2012)
	Les pili (adhésines)	<ul style="list-style-type: none"> - Mobilité (twitching). - Colonisation. - Adhésion. - Formation de biofilm. 	(Voss & Attridge, 1993; Thelin & Taylor, 1996; Attridge <i>et al.</i> , 1996; Voss <i>et al.</i> , 1996; Bardy <i>et al.</i> , 2003; Shime-Hattori <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2008)
	Les protéines de la membrane externe (OMP)	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion. - Invasion. - Adaptation du pathogène à divers environnements. - Impliqué dans la virulence: adhésion et invasion aux cellules de l'hôte. 	(Beaubrun <i>et al.</i> , 2008; Duperthuy <i>et al.</i> , 2010, 2011; Goo <i>et al.</i> , 2006; Lin <i>et al.</i> , 2002; Nandi <i>et al.</i> , 2005)

<p>Les facteurs d'altération et de multiplication (au niveau membranaire et à l'intérieur de l'hôte)</p>	<p>Enzymes hydrolytiques: Lipases, protéases, nucléases, hyaluronidases, hémolysines (action locale)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Permet aux bactéries: d'échapper à la réponse immunitaire humorale et de proliférer dans une niche bien protégée. - Réarrangements du cytosquelette d'actine. - Augmente la perméabilité vasculaire et induit la formation d'œdème. - Dégradation de substrats comme le collagène et l'élastine. 	<p>(Chuang <i>et al.</i>, 1997; Kochut & Dersch, 2013; Miyoshi <i>et al.</i>, 1987; Miyoshi & Shinoda, 1992; Niemann <i>et al.</i>, 2004; Oliver <i>et al.</i>, 1986; Shinoda & Miyoshi, 2011; Teo <i>et al.</i>, 2003a)</p>
	<p>Sidérophores</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Approvisionnement en fer (Fe³⁺). - Impliqué dans la virulence (multiplication). 	<p>(Andrus <i>et al.</i>, 1983; Guan <i>et al.</i>, 2001; Simpson & Oliver, 1983)</p>
	<p>Toxines:</p> <p>1/ Exotoxines :</p> <p>i): Les toxines ciblant la membrane plasmique</p> <p><i>Les hémolysines</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lyse cellulaire. - Lésion tissulaire. - Destruction des cellules du système immunitaire. - Induction d'apoptose. - Impliqué dans la virulence (formation de pores et désorganisation cellulaire). 	<p>(Chen <i>et al.</i>, 2004; Olivier <i>et al.</i>, 2007; Rodkhum <i>et al.</i>, 2005; Wong <i>et al.</i>, 2012)</p>
	<p><i>RTX (repeats in toxin)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lyse cellulaire par formation des pores - Induction d'apoptose. - Choc osmotique. - Impliqué dans la virulence (formation de pores et désorganisation cellulaire). 	<p>(Lee <i>et al.</i>, 2008; Lin <i>et al.</i>, 1999)</p>

<p>Les facteurs d'altération et de multiplication</p> <p>(au niveau membranaire et à l'intérieur de l'hôte)</p>	<p>ii) les toxines à cible intracellulaire</p> <p><i>Les toxines du type AB: le plus connu est la toxine cholérique (CT)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Entérotoxine: provoque l'augmentation d'AMP cyclique qui induit un déséquilibre dans l'absorption des ions Na⁺ et Cl⁻. - Modulation de l'immunité de l'hôte. - Toxicité 	<p>(Fullner Satchell, 2003; Sanchez & Holmgren, 2011)</p>
	<p>iii) Les toxines injectées</p> <p><i>Le système de sécrétion de type trois ou SSTT),</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sécrétion et translocation des facteurs de virulence dans la cellule de l'hôte. - Impliqué dans la virulence (subvertir le système de signalisation de l'hôte). 	<p>(Ham & Orth, 2012; Park <i>et al.</i>, 2004)</p>
	<p>2/ Endotoxines (composés toxiques structuraux de la membrane bactérienne)</p> <p><i>Lipopolysaccharides (LPS)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induction de l'apoptose - Sur-stimulation du système immunitaire - Toxicité 	<p>(Foster <i>et al.</i>, 2000; Jones & Oliver, 2009; Kabir, 1982)</p>

<p>Les facteurs de résistance au système immunitaire de l'hôte</p> <p>(en contact avec les acteurs du système immunitaires de l'hôte)</p>	<p>Capsule</p> <p>Pompes à efflux</p> <p>Superoxyde dismutase (SOD) et catalase</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion - Résistance à la phagocytose et aux effets bactéricides du sérum de l'hôte. - Impliqué dans la virulence (protection de pathogène). - Résistance multiple aux antibiotiques - Inhibition de la production d'espèces oxygénées réactives 	<p>(Casadevall & Pirofski, 2009; Johnson <i>et al.</i>, 1992; Trigiani-Fernandez, 2001)</p> <p>(Bina <i>et al.</i>, 2008)</p> <p>(Banin <i>et al.</i>, 2003; Daily <i>et al.</i>, 1978)</p>
--	--	---	---

5.3. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

Les bactéries ont la capacité de développer plusieurs stratégies ou «style de vie», de réguler l'expression et la sécrétion de leurs facteurs de virulence et de s'adapter aux variabilités de l'environnement extérieur comme la variation de la salinité, la température et la disponibilité et la qualité des nutriments. Il a été rapporté que certaines bactéries comme *V. vulnificus* et *V. cholerae* peuvent survivre dans des conditions environnementales dures pour des périodes de temps prolongées dans un état viable métaboliquement mais non cultivable (pas de formation de colonies) désigné par VBNC pour «Viable But Non-Culturable», ABNC pour «Active But Not cultivable» et CVEC pour «Conditionally Viable Environmental Cells» (Igbinosa & Okoh, 2008; Nelson *et al.*, 2008). Suite au changement climatique, les bactéries restaurent leur état cultivable à l'aide des facteurs dépendants secrétés par d'autres bactéries environnantes et plus précisément les acteurs du quorum sensing (QS) qui prennent le relais pour déclencher de nouveau la virulence des bactéries en état CVEC (Bari *et al.*, 2013). La figure 3 schématise la formation du CVEC et le phénomène de leur ressuscitation par le biais du QS.

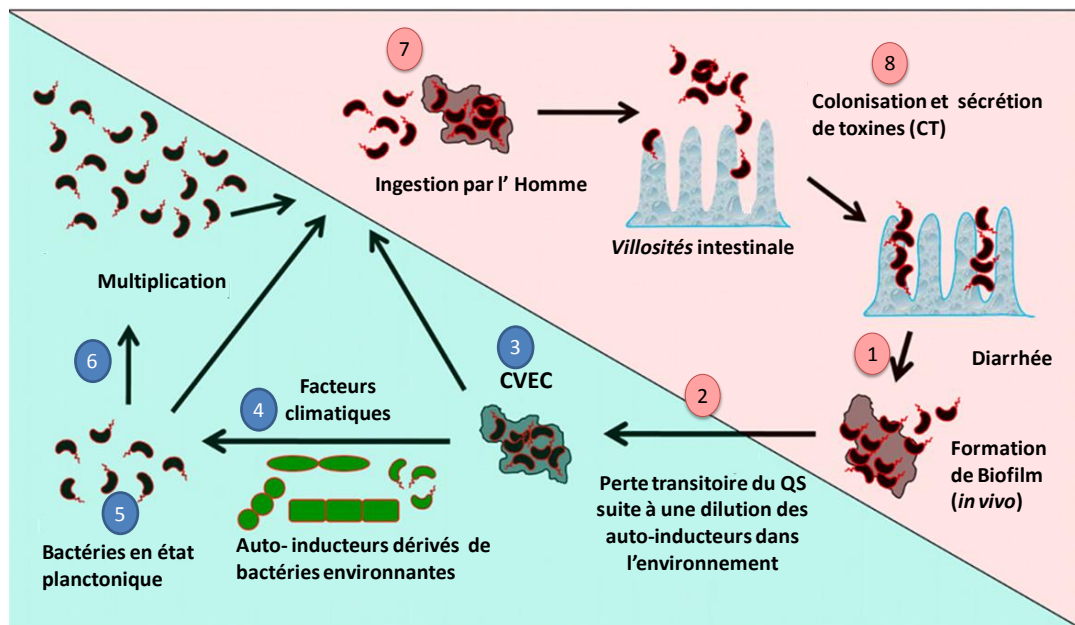


Figure 4: Le phénomène de la formation de CEVC et leur ressuscitation chez *V. cholerae* (Bari *et al.*, 2013).

Quorum sensing (QS)

D'une manière générique, le Quorum Sensing est un processus de communication entre les bactéries impliquant des molécules appelées les auto-inducteurs qui contrôlent la production de plusieurs facteurs de virulence. Ces derniers sont de petites molécules qui régulent habituellement l'expression de certains gènes bactériens en réponse à une densité cellulaire ou à des interactions interspécifiques entre les bactéries. On distingue des auto-inducteurs de nature peptidique pour les bactéries à Gram⁺ et des dérivés d'acides gras pour les bactéries à Gram⁻.

L'espèce *V. harveyi* est la bactérie la plus étudiée pour son système de quorum sensing. Natrah et collaborateurs (2011) ont montré que le QS est le système majeur de régulation (positif ou négatif) de l'expression des facteurs de virulence extracellulaires chez *V. harveyi*. Ce système régule positivement l'activité gélatinase et caséinase et régule négativement l'activité phospholipase. Des travaux ont dévoilé qu'à haute densité cellulaire, le QS réprime l'expression du système de type III chez *V. harveyi* et *V. parahaemolyticus* (Henke & Bassler, 2004). La figure 4 représente l'implication du QS sur l'expression de quelques facteurs de virulence chez *V. harveyi*.

Chez *V. cholerae*, le QS est impliqué dans la formation du biofilm (Hammer & Bassler, 2003) et le renforcement de sa capacité à coloniser (Zhu & Mekalanos, 2003).

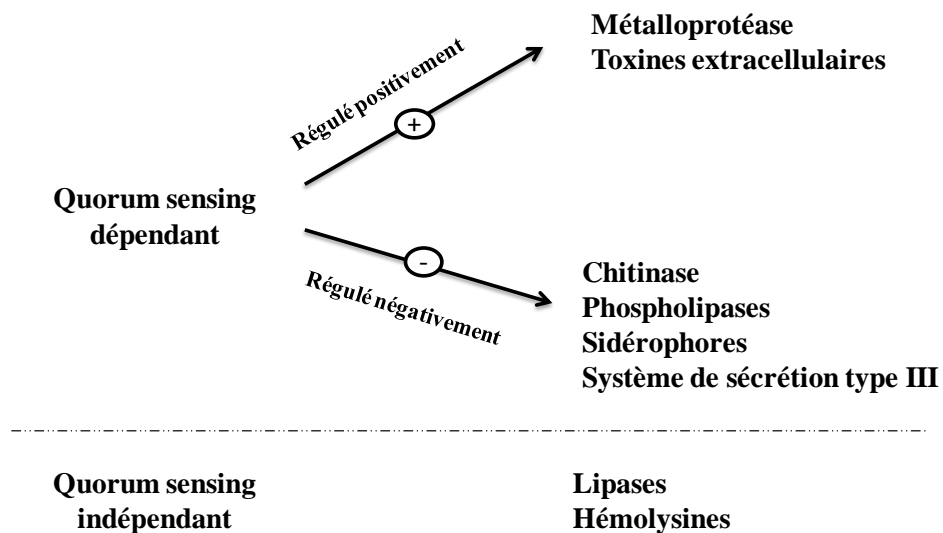


Figure 5: Impact du quorum sensing sur l'expression des facteurs de virulence chez *V. harveyi* (Natrah *et al.*, 2011).

Il faut noter qu'il existe d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas régulés par le QS comme les hémolysines et les lipases (Natrah *et al.*, 2011). De plus, même si la perturbation de la communication intracellulaire pourrait constituer une stratégie pour lutter contre les infections dans le domaine de l'aquaculture (Defoirdt *et al.*, 2004) il ne faut pas nier que dans le domaine médical malgré la perte du QS, certaines bactéries sont capables de provoquer des infections (Schaber *et al.*, 2004).

6. Méthodes de détection du genre *Vibrio*

La détection des espèces au sein du genre *Vibrio* a été toujours basée sur des techniques phénotypiques traditionnelles (Vandenberghe *et al.*, 2003) et plus récemment sur des outils innovants de biologie moléculaire (Kim & Jeong, 2001; Saulnier *et al.*, 2009; Gharaibeh *et al.*, 2009; Hossain *et al.*, 2013).

En général, les méthodes classiques d'identification bactérienne nécessitent plusieurs étapes: commençant par l'isolement, l'enrichissement, l'étalement sur milieux sélectif, suivis de caractérisation, d'observation morphologique et finissant par des analyses biochimiques. Cependant, toute cette procédure traditionnelle de détection bactérienne reste lente, laborieuse et nécessite souvent plusieurs jours pour sa réalisation. En plus, certains tests phénotypiques sont insensibles pour la détection des bactéries à faible concentration ou qui présentent des profils phénotypiques inhabituels (Iii & Hickman-Brenner, 2006).

La variabilité des caractères biochimiques atypiques des souches de *Vibrio* isolées de l'environnement rend leur identification et leur distinction difficile. Vandenberghe et collaborateurs (2003) ont montré les limites des tests biochimiques dans l'identification des bactéries appartenant au genre *Vibrio* isolées à partir de différents systèmes d'aquaculture dans de nombreux pays. En outre, certaines bactéries peuvent subir des lésions ou être dans des états de dormance, à cause des conditions de stress ou des changements défavorables comme la variation de la salinité, le changement de la température ou la carence en quelques éléments nutritifs, et deviennent non détectables par les méthodes bactériologiques classiques (Brauns *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1998b; Cohen & Karib, 2007).

Les progrès spectaculaires de diverses technologies moléculaires dans la discipline de microbiologie ont permis le développement des outils d'identification plus fiables, rapides, sensibles et spécifiques pour la détection des bactéries même à très faible concentration cellulaire dans leur environnement naturel. Les outils les plus utilisés sont la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) et outils dérivés: la qPCR (PCR en temps réel), l'AFLP (le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés), la FISH (l'hybridation fluorescente in situ), la MLEE (électrophorèse enzymatique multilocus), la RFLP (Polymorphisme de taille des fragments de restriction) et la Ribotypie (Igbinosa & Okoh, 2008).

La PCR a été souvent utilisée pour identifier des espèces du genre *Vibrio*, déterminer leurs relations phylogénétiques et taxonomiques et rechercher des gènes codant pour des facteurs de virulence par le biais de plusieurs cibles moléculaires. En visant une région variable de l'ARNr 16S, la PCR a été utilisée pour la détection et la différenciation de *V. vulnificus* dans les milieux marins (Kim & Jeong, 2001). Egalement, la PCR a été utilisé pour détecter *V. parahaemolyticus*, en ciblant plusieurs gènes de virulence comme *toxR* ou les deux hémolysines TDH et TRH (Kim *et al.*, 1999; Robert-Pillot *et al.*, 2004). De même, la *V. cholerae*, est systématiquement recherchés par PCR à travers les gènes *ctxA* et *ctxB*, codant pour la toxine cholérique (Fields *et al.*, 1992). La technique dz multiplexe PCR a été aussi employée pour détecter le genre *Vibrio* (Panicker *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2013; Paydar *et al.*, 2013).

La méthode qPCR a été développée récemment pour détecter et quantifier des espèces de *Vibrio* en ciblant différents gènes éventuellement impliqués dans la virulence de l'espèce. La QPCR a été utilisée pour la détection de *V. aestuarianus* (Saulnier *et al.*, 2009) et *V. tubiashii* (Gharaibeh *et al.*, 2009) durant les épisodes de mortalités de l'huître creuse *C. gigas*. Aussi, cet outil a été utilisé pour détecter et quantifier *V. cholerae* dans l'eau et les produits de la pêche (Gubala & Proll, 2006). Cependant, cette technique exige un niveau élevé de compétences en laboratoire et un matériel onéreux non compatible à une utilisation directe par exemple sur site.

Des méthodes sérologiques ont été aussi utilisées avec succès pour l'identification des espèces de *Vibrio* dans les aliments et les environnements aquatiques. La méthode ELISA est le test immunologique le plus utilisé (Igbinosa & Okoh, 2008; Tantillo *et al.*, 2004). Récemment, Gharaibeh et collaborateurs (2013) ont développé un test ELISA et un test

immunologique à flux latéral (test de jauge) pour la détection de la métalloprotéase à zinc sécrétée par la souche *V. tubiashii*. Ces deux outils s'appuient sur la spécificité des anticorps monoclonaux qui reconnaissent des épitopes spécifiques de la métalloprotéase VtpA mature.

Partie B: Les facteurs de virulence chez les vibrions marins, types et mode d'action

Les *Vibrio* sont connus pour leur capacité à produire divers facteurs impliqués dans leur virulence spécifique, incluant des protéases, des entérotoxines, des cytolysines, des sidérophores, des facteurs d'adhésion, et des hémagglutinines (Shinoda, 2005). Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur la description de quelques facteurs de virulence : les protéases, les hémolysines et les sidérophores. Ainsi, la description de chaque facteur de virulence s'organisera en trois parties : (1) généralités et mode d'action, (2) synthèse et régulation et (3) implication dans la virulence du genre *Vibrio*.

1. Les protéases extracellulaires chez le genre *Vibrio*

1.1 Généralités sur les protéases

Le clivage protéolytique est une des réactions enzymatiques les plus fréquentes. Antérieurement, les protéases ont été classées selon leur taille moléculaire, leur charge ou leur spécificité pour un substrat. Plus tard, un système de classification plus rationnel a été utilisé sur la base de leur site actif, leur mécanisme d'action et leur structure tertiaire. Quatre mécanismes d'actions sont reconnus par l'International Union of Biochemistry : les protéases aspartiques, les protéases à cystéine, les métalloprotéases (I et II) et les protéases à sérine (I et II) et au sein de ces classes six familles de protéases sont distinguées (Table 6). Il faut aussi différencier les endopeptidases qui clivent un substrat au centre de la chaîne d'acide aminé du substrat, et les exopeptidases qui libèrent un acide aminé terminal qui sont les aminopeptidases et les carboxypeptidases (Hooper, 1990).

Tableau 6: Familles des protéases classées selon la nature de leur site actif

Familles	Protéases représentatives	Site actif ^a
Protéases à sérine I	Chymotrypsine	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵
Protéases à sérine II	Subtilisine	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Protéases à cystéine	Papain	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asp ¹⁵⁸
Protéases à acide aspartique	Penicillopepsine	Asp ³³ , Asp ²¹³
Métalloprotéase I	Carboxypeptidase A	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸
Métalloprotéase II	Thermolysine	Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

1.2 Rôle des protéases dans la virulence du genre *Vibrio*

Les bactéries sécrètent plusieurs types de protéases avec des fonctions différentes. Décrites comme étant de véritables facteurs de virulence (Miyoshi & Shinoda, 2000), ces protéases agissent soit directement en endommageant les tissus de l'hôte et en interagissant avec leur système de défense, soit indirectement en stimulant l'expression d'autres facteurs de virulence (Shinoda & Miyoshi, 2011).

Chez l'Homme, plusieurs rôles critiques attribués à ces protéases ont été décrits : (1) le renforcement de la perméabilité vasculaire et la formation d'œdème par l'activation de la cascade de la kinine (ensemble de protéines sanguines jouant un rôle dans l'inflammation et la coagulation) ; (2) la dégradation des protéines de défense ainsi que la destruction des protéines de la matrice cellulaire telles que la fibronectine, les protéoglycanes et le collagène ; (3) l'inactivation du système du complément et (4) l'inactivation des inhibiteurs de protéase à sérine (Maeda & Molla, 1989).

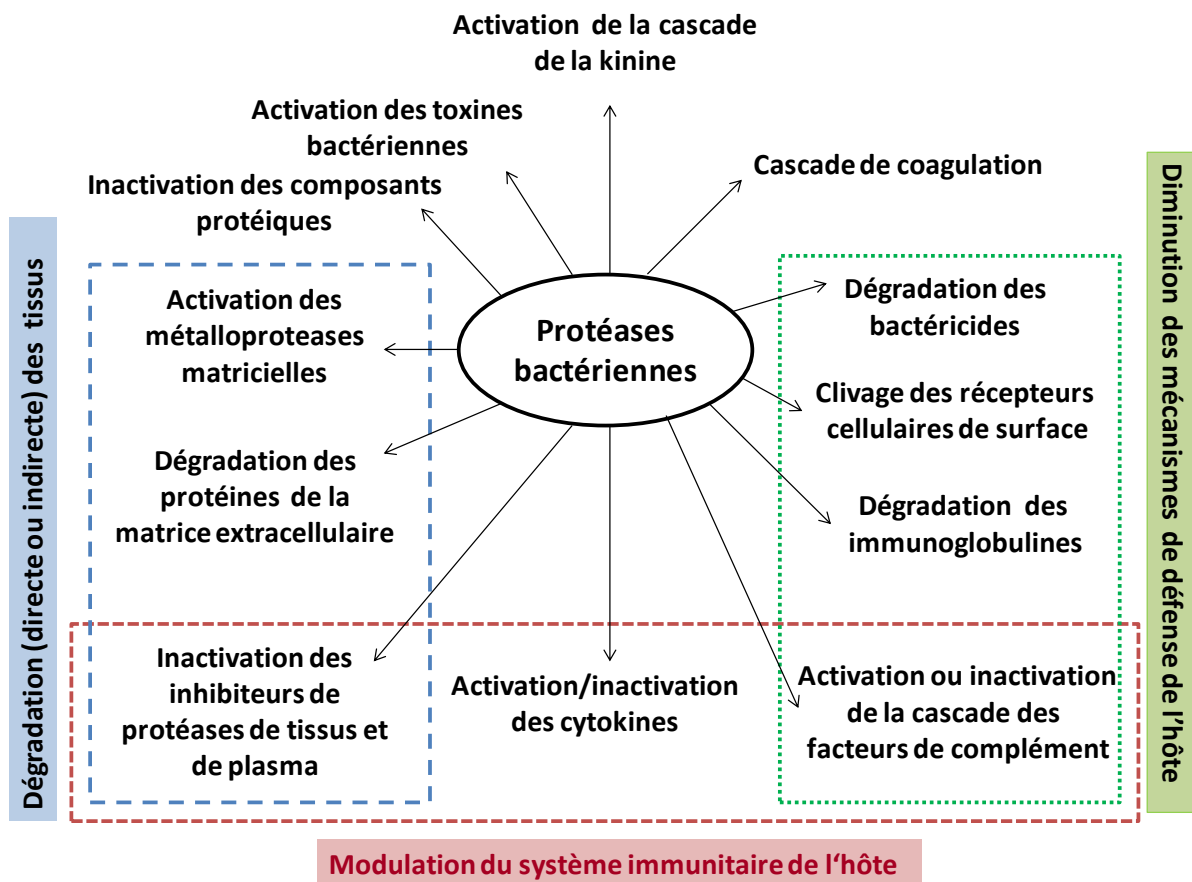


Figure 6: Les différentes fonctions attribuées aux protéases bactériennes au cours du processus infectieux (Travis *et al.*, 1995).

Les bactéries du genre *Vibrio* produisent également différents facteurs de virulence dont les protéases sont considérées comme étant les acteurs principaux dans le processus infectieux. La majorité des protéases bactériennes sont des métalloprotéases qui possèdent un ion zinc dans leur site catalytique (Shinoda & Miyoshi, 2011), mais aussi d'autres types de protéases sont produites par les *Vibrio* comme les protéases à sérine (Lee *et al.*, 1997; Syngkon *et al.*, 2010) et les protéases à cystéines (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2005). Le tableau 7 regroupe une grande partie des protéases produites par le genre *Vibrio*.

Tableau 7: Protéases produites par le genre *Vibrio* (Shinoda & Miyoshi, 2011). T^a: Famille des thermolysines, X^b: Métalloprotéases autres que les thermolysines.

Espèces	Protéases	Références
Agents pathogènes humains		
<i>Infections intestinales</i>		
<i>V. cholerae</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Hase & Finkelstein, 1991) (Vaitkevicius <i>et al.</i> , 2008)
<i>V. fluvialis</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Miyoshi <i>et al.</i> , 2002)
<i>V. mimicus</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Chowdhury <i>et al.</i> , 1990)
	Métalloprotéase à zinc (X ^b)	(Lee <i>et al.</i> , 1998a)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Protéase à sérine	(Ishihara <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2002)
	Métalloprotéase à zinc (X ^b)	(Kim <i>et al.</i> , 2002; Yu & Lee, 1999)
<i>Infections extra-intestinales</i>		
<i>V. alginolyticus</i>	Protéase à sérine	(Chen <i>et al.</i> , 1999)
	Métalloprotéase à zinc (X ^b)	(Takeuchi <i>et al.</i> , 1992)
<i>V. metschnikovii</i>	Protéase à sérine	(Kwon <i>et al.</i> , 1995)
<i>V. vulnificus</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Shinoda <i>et al.</i> , 1996)
	Protéase à sérine	(Wang <i>et al.</i> , 2008)
Agents pathogènes animaux marins		
<i>V. aestuarianus</i> ^c	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Labreuche <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. anguillarum</i> ^c	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Milton <i>et al.</i> , 1992; Norqvist <i>et al.</i> , 1990)

<i>V. carchariae</i>	Protéase à sérine	(Chen <i>et al.</i> , 1999; Lee <i>et al.</i> , 2002)
<i>V. harveyi</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Teo <i>et al.</i> , 2003b)
<i>V. pelagius</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Farto <i>et al.</i> , 2002)
<i>V. penaeicida</i>	Protéase à cystéine	(Aguirre-Guzmán <i>et al.</i> , 2005)
<i>V. proteolyticus</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(David <i>et al.</i> , 1992)
<i>V. tubiashii</i>	Métalloprotéase à zinc (T ^a)	(Delston <i>et al.</i> , 2003)

1.3 Les métalloprotéases

1.3.1 Généralités et classification

Les métalloprotéinases ou métalloprotéases constituent une famille d'enzyme de la classe des peptidases, appelées ainsi en raison de la présence dans leur site actif d'un ion métallique qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique dans les protéines. Il existe deux sous-groupes : les métallocarboxypeptidases (EC 3.4.17) et les métalloendopeptidases (EC 3.4.24).

Les métalloprotéases à zinc sont largement partagées entre les procaryotes et les eucaryotes et sont classées en quatre groupes (Figure 6). Parmi les familles qui constituent le groupe des métalloprotéases à zinc, la majorité possède un motif consensus «HEXXH»: ce sont les zincines. Ce motif fondamental pour la fonction de l'enzyme contient deux résidus histidine impliqués dans la fixation de l'ion Zn²⁺ et un résidu d'acide glutamique participant à l'hydrolyse de la liaison peptidique (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994).

Cette superfamille «zincines» est subdivisée en plusieurs familles sur la base de l'emplacement du troisième ligand du zinc. Les métalloprotéases bactériennes peuvent se répartir en trois familles : famille des thermolysines, famille des serralysines et famille des neurotoxine (Miyoshi & Shinoda, 2000).

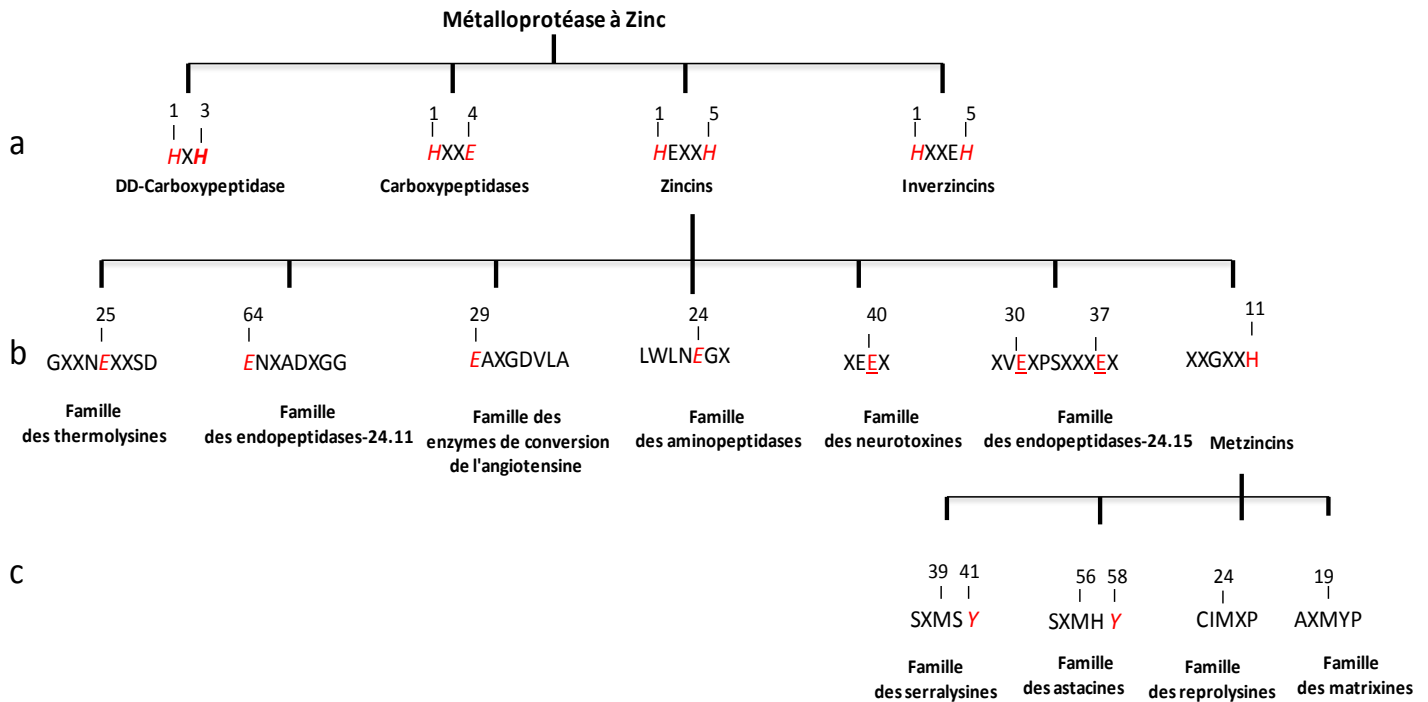


Figure 7: La classification des différentes familles de métalloprotéase à zinc basée sur la séquence autour du site de fixation du zinc. Les lettres rouges en italique représentent les ligands de l'atome de zinc identifiés; les lettres rouges soulignées représentent les ligands putatifs de l'atome de zinc, et la lettre X représente un acide aminé quelconque. Ligne (a) correspond au premier et deuxième ligand de l'atome de zinc (b) au troisième ligand et (c) au cinquième ligand putatif (Miyoshi & Shinoda, 2000).

1.3.2 Mécanisme d'action de la métalloprotéase

Plusieurs métalloprotéases bactériennes appartiennent à la famille des thermolysines (métalloprotéase II) (Shinoda & Miyoshi, 2011). Dans la base de données MEROPS (Base de données de peptides), les thermolysines produites par le genre *Vibrio* sont classées en vibriolysine (Miyoshi *et al.*, 2002). Cette famille possède deux sites, bien conservés, impliqués dans la liaison du zinc: les deux histidines sur le premier motif HEXXH et un acide glutamique qui se situe environs 20 aa au-delà du premier motif GXXN**E**XXSD. L'acide glutamique du motif HEXXH constitue le résidu catalytique (Figure 7) (Xie *et al.*, 2009). Il a été rapporté que la thermolysine a besoin d'ion Zn^{2+} pour son activité et d'ion Ca^{2+} pour sa stabilité (Norqvist *et al.*, 1990).

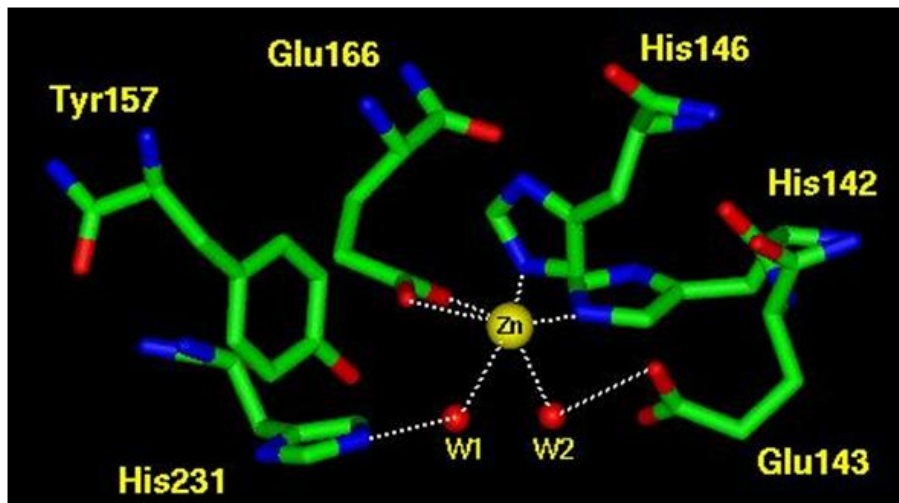


Figure 8: Structure du site actif de la thermolysine chez *Bacillus thermoproteolyticus* (de RCSB Protein Data Bank www.rcsb.org)

Grâce à la cristallographie, la structure tridimensionnelle de la thermolysine ainsi que son mécanisme d'action ont été bien étudiés (Colman *et al.*, 1972; Kudryashova *et al.*, 1998). Comme décrit précédemment, chez la thermolysine, l'ion Zn^{2+} est liée à deux histidines (His-142 et 146) et à un acide glutamique (Glu-166). En absence de substrat, une molécule d'eau joue le rôle d'un quatrième ligand. Au moment de la catalyse, l'acide glutamique catalytique (Glu 143 dans le cas de la thermolysine) accepte un proton de la molécule d'eau nucléophile liée au zinc et le transfère au substrat au niveau du groupement carbonyle (Kudryashova *et al.*, 1998). Ce qui caractérise la thermolysine par rapport aux autres métalloprotéases est la présence de deux résidus électrophiles la Tyrosine 157 et l'Histidine 231 qui confèrent la stabilisation du complexe intermédiaire tétraédrique (Giraudier, 2004). A la fin de la réaction, le produit du coté amine est libéré en premier, suivi par le produit du coté carboxyle (Figure 8).

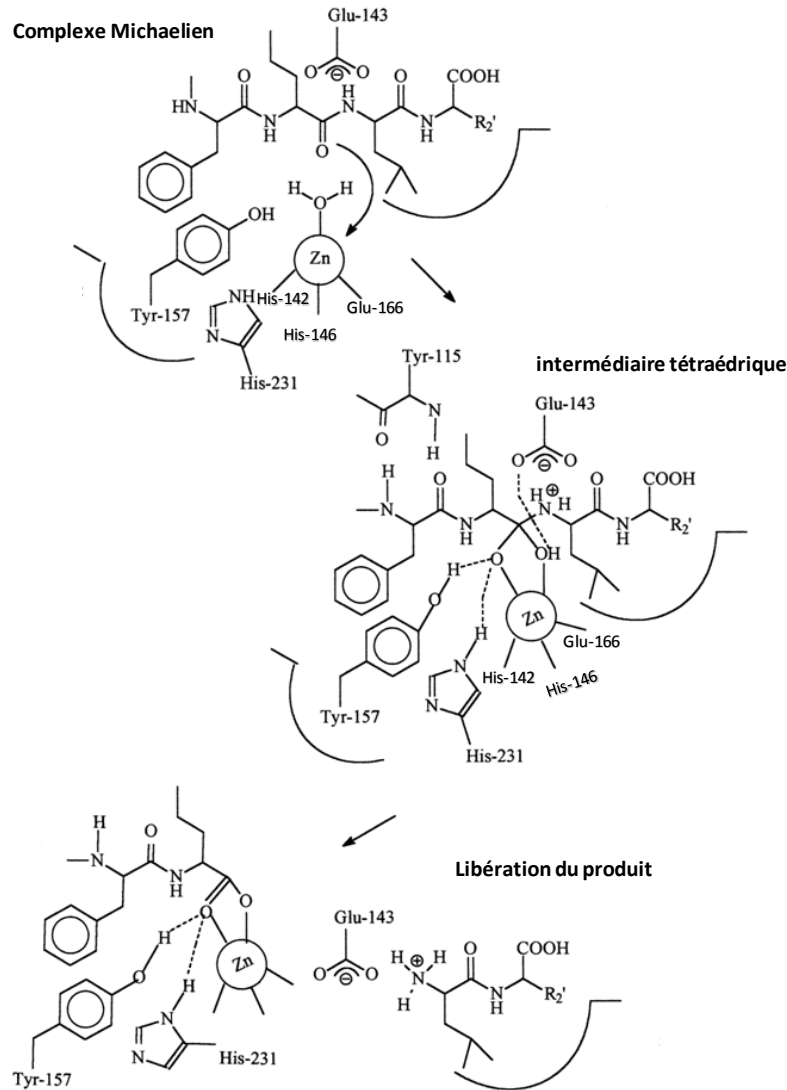


Figure 9: Illustration schématique du mécanisme catalytique de la thermolysine (Kudryashova *et al.*, 1998)

Étant donné que les métalloprotéases contiennent un métal dans leur site actif, ces protéases peuvent être inhibées par des chélateurs de métaux comme l'EDTA, l'EGTA et le 1,10-phenanthroline ou par des inhibiteurs compétitifs comme le phosphoramidon et le zincov (Miyoshi & Shinoda, 2000; Supuran *et al.*, 2002). Plusieurs dérivés d'acide hydroxamique ont été aussi rapportés comme étant des inhibiteurs puissants des métalloprotéases matricielles. L'activité métalloprotéasique peut être stimulée ou restaurée par de faibles concentrations de chlorure de zinc mais peut également être inhibée par des concentrations élevées (Supuran *et al.*, 2002).

1.3.3 Synthèse et régulation

La plupart des protéines bactériennes, y compris de nombreuses métalloprotéases, sont sécrétées par la voie de sécrétion générale Sec-dépendante qui se base sur la reconnaissance d'une séquence signalale N-terminale sur la protéine à exporter (Häse & Finkelstein, 1993).

Généralement, les métalloprotéases sont synthétisées comme des précurseurs inactifs dont leur maturation est obtenue suite à une cascade d'étapes. Par exemple, l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* de 33 kDa (301 aa) est initialement synthétisée en tant que proprotéine de 54 kDa (498 aa). Le peptide signal de 3 kDa (23 aa) est clivé au cours de son passage à travers la membrane interne (Figure 9, étape 1). Au niveau du périplasma, le propeptide de côté N-terminal de 18 kDa (174 aa) est clivé par un mécanisme d'auto-protéolyse (Figure 9, étape 3) et l'élastase mature biologiquement active est ensuite générée (Figure 9, étape 4). Le propeptide N-terminal semble agir comme un inhibiteur spécifique de l'élastase mature pour la protéger contre des potentielles protéolyses intracellulaires et jouer le rôle d'un chaperon intramoléculaire pour contrôler son activité enzymatique et sa compétence pour la sécrétion (Figure 9, étape 2) (Braun *et al.*, 1998; McIver *et al.*, 1995). La métalloprotéase de *V. vulnificus* (VVP) de poids moléculaire de l'ordre de 45 kDa est générée à partir d'un précurseur de 66 kDa par élimination du peptide signal et du propeptide N-terminal (Miyoshi & Shinoda, 2000). Pour la souche *V. harveyi*, la métalloprotéase (Pap6) mature de 35 kDa est issue de la disposition d'un peptide signal de 1,7 kDa (15 aa), un propeptide N-terminal de 19,2 kDa (174 aa) et d'un éventuel propeptide C-terminal de 19,1 kDa (Teo *et al.*, 2003b).

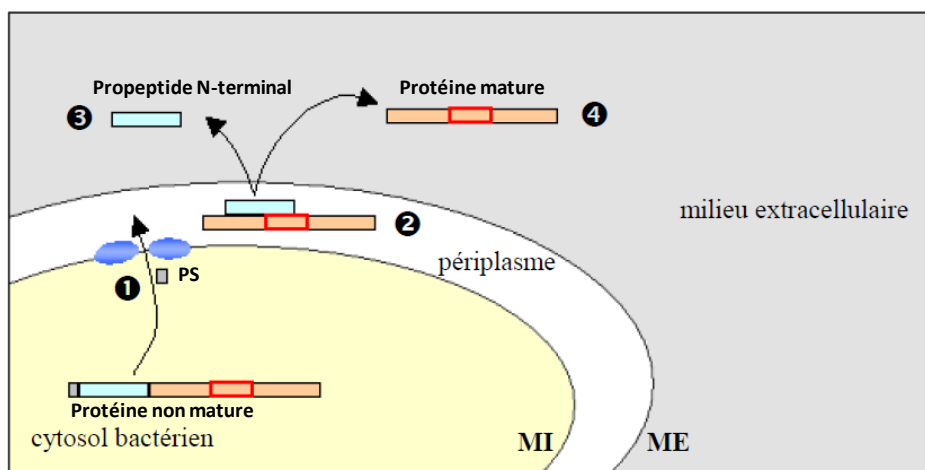


Figure 10: Les différentes étapes menant à la synthèse d'une métalloprotéase mature chez les bactéries. MI : membrane bactérienne interne, ME : membrane bactérienne externe, PS: peptide signal (Labreuche, 2006).

Concernant la régulation des métalloprotéases, il a été démontré que l'expression de Vvp (*V. vulnificus*), hemagglutinine/protease (*V. cholerae*) et l'EmpA (*V. anguillarum*) est régulée par Smcr, HapR et VanS respectivement, qui sont des systèmes homologues à LuxR. Cette protéine est un activateur de transcription qui contrôle l'expression de l'opéron *lux* chez *V. harveyi* à haute densité bactérienne et qui fait partie du quorum-sensing (Shao & Hor, 2001). Chez *V. tubiashii*, un système de régulation de type VtpR (pour *V. tubiashii* protease regulator) homologue au HapR de *V. cholerae* a été décrit comme responsable de l'activation de la sécrétion de deux métalloprotéases VtpA et VtpB (Hasegawa & Häse, 2009b).

Il existe également des inhibiteurs endogènes spécifiques de types TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases) pour réguler l'activité protéasique des métalloprotéases matricielles (MMP, famille des matrixines) (Gomis-Rüth *et al.*, 1997). Chez les vertébrés, ces TIMPs occupent plusieurs fonctions biochimiques, physiologiques et biologiques, y compris l'inhibition de la MMP active, la promotion de la croissance cellulaire, l'inhibition de l'angiogenèse et de l'induction de l'apoptose (Brew *et al.*, 2000). Chez les invertébrés, un gène codant une protéine comportant une organisation et une signature analogue à celle des TIMPs de vertébrés a été caractérisé chez l'huître creuse *C. gigas*. L'expression de la TIMPs est régulée positivement quand l'huître est soumise à des dommages au niveau de sa coque ou à des infections bactériennes (Montagnani *et al.*, 2001).

1.3.4 Implication des métalloprotéases dans la virulence du genre *Vibrio*

L'implication des métalloprotéases dans la virulence des bactéries du genre *Vibrio* fait l'objet d'un intérêt marqué, comme l'atteste le nombre croissant des publications sur le sujet. Différents travaux ont ainsi établi que les métalloprotéases exercent des effets pathologiques variés. En plus de leur pouvoir protéolytique *via* la dégradation d'une grande variété de substrats protéiques de l'hôte, comme la lactoferrine, le collagène, l'élastine, les protéines plasmatiques, ou encore l'albumine, les métalloprotéases entraînent l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le déclenchement de réactions hémorragiques liées à la stimulation du système kallikreine-kinine, l'hémagglutination des érythrocytes et l'induction de nécroses tissulaires (Shinoda *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 2002). Les différentes métalloprotéases sécrétées par des espèces de *Vibrio* ainsi que leurs rôles biologiques dans la virulence sont référencées dans le tableau présenté ci après.

Tableau 8: Rôle biologiques de métalloprotéases décrites chez le genre *Vibrio*
nd: non déterminé

Espèces	Métalloprotéase (désignation)	Rôle dans la virulence	Références
<i>V. cholerae</i>	PrtV	- Effet cytotoxique sur des lignées épithéliales intestinales humaines - Dégradation des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le fibrinogène	(Vaitkevicius <i>et al.</i> , 2008)
	nd	- Dégradation du mucus épithélium chez la souris (<i>in situ</i>)	(Crowther <i>et al.</i> , 1987)
	HA/protease	- Changement morphologique des cellules épithéliales - Altération des filaments d'actine et des protéines des jonctions serrées	(Wu <i>et al.</i> , 1996)
<i>V. mimicus</i>	VMP	- Hémagglutination des érythrocytes	(Chowdhury <i>et al.</i> , 1990)
	VMC	- Cytotoxicité sur les cellules de poissons - Dégradation de collagènes	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
<i>V. pelagius</i>	nd	- Effets toxiques envers le poisson (turbot) - Hémorragie externe au niveau des nageoires, la bouche et des pétéchies dans les organes internes	(Farto <i>et al.</i> , 2002)
<i>V. harveyi</i>	Pap6	- Dégradation d'un ensemble de protéines structurales y compris la gélatine, la fibronectine et le collagène de type IV	(Teo <i>et al.</i> , 2003b)
<i>V. anguillarum</i>	Pa	- Implication dans l'invasion	(Norqvist <i>et al.</i> , 1990)
	EmpA	- Effet toxique sur le poisson (turbot) - Implication dans la motilité et dans l'activité hémolytique	(Han <i>et al.</i> , 2011)

<i>V. splendidus</i>	Vsm	- Effet toxique par injection à des huîtres creuse et cytotoxique sur des lignées cellulaires	(Binesse <i>et al.</i> , 2008)
<i>V. tubiashii</i>	hémagglutinine/ protéase	- Agglutination des érythrocytes d'origine humaine et animale	(Delston <i>et al.</i> , 2003)
	VtpA et VtpB	- Effet toxique par baignade sur des larves d'huître creuse	(Hasegawa & Häse, 2009b; Hasegawa <i>et al.</i> , 2009)
<i>V. aestuarianus</i>	Vam	- Effet léthal sur les huîtres du Pacifique et effet cytotoxique sur leurs hémocytes	(Labreuche <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. vulnificus</i>	VVP	- Dégradation de l'élastine, le fibrinogène et des inhibiteurs protéasiques du plasma - Dommages tissulaires - Lésions hémorragiques	(Shinoda, 2005)
<i>V. parahaemolyticus</i>	VPPC	- Dégradation du collagène de type I	(Kim <i>et al.</i> , 2002)
	VPM	- Effet cytotoxique sur des cellules de branchies du poisson - Hémorragie au niveau de cavité péritonéale après infections expérimentales des poissons	(Luan <i>et al.</i> , 2007)
	PrtVp	- Faible activité hémolytique	(Lee <i>et al.</i> , 1995)

1.4 Les protéases à sérine

1.4.1 Généralités et mode d'action

Plusieurs enzymes protéolytiques (1/3 des protéases) sont des protéases à sérine. Leurs mécanismes de catalyse impliquent une sérine qui est particulièrement réactive.

Les protéases à sérine (EC 3.4.21.n) clivent la liaison peptidique grâce à une triade catalytique active composée d'une sérine, d'une histidine et d'un acide aspartique (Ser-His-Asp). Bien que ce domaine soit hautement conservé, les analyses phylogénétiques et les modélisations structurales séparent cette classe en quatre familles.

On distingue: *les* chymotrypsines (His-Asp-Ser), les subtilisines (Asp-His-Ser), les protéases Clp (Ser-Asp-His) et les carbopeptidases Y (Ser-His-Asp) (Brackney, 2007; Hedstrom, 2002).

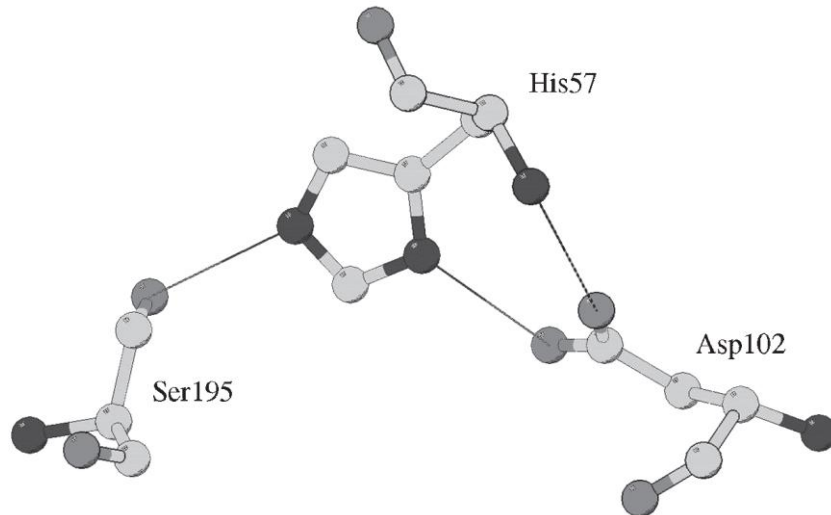


Figure 11: La triade catalytique de la chymotrypsine (Polgár, 2005)

Dans le cas de la chymotrypsine, la sérine 195 attaque de façon nucléophile l'atome de carbone du groupement carbonyle du substrat. Ainsi un premier intermédiaire tétraédrique est formé avec l'aide de l'histidine 57. Ce premier intermédiaire tétraédrique est stabilisé par les atomes de la poche catalytique qui est formée par les atomes d'azote de la glycine 193 et de la chaîne principale de la sérine 195. Ainsi un intermédiaire acyle-enzyme est généré par l'action de l'histidine 57 polarisé par l'acide aspartique 102. Une molécule d'eau vient déplacer le fragment amine libre, attaque l'acyle-enzyme et produit un second intermédiaire tétraédrique stabilisé aussi par la poche. Ainsi, la partie carboxylique du substrat est libérée et l'enzyme restaure son activité initiale (Blanchet, 2010).

Les sérines protéases sont inhibées généralement par des inhibiteurs de nature chimique qui agissent directement sur la sérine du triade catalytique par l'établissement d'une liaison covalente comme le PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), DFP (diisopropylfluorophosphate) et fluorure de benzylsulfonyl, ou des inhibiteurs de nature protéique tels que la leupeptine, la trypsine de soja, l'aprotinine (Supuran *et al.*, 2002).

1.4.2 Synthèse et régulation

Les protéases à sérine sont synthétisées sous forme de zymogènes inactives avec un peptide signal de 18 à 26 aa, un pro-dipeptide et une protéase mature. Directement après leur synthèse, le peptide signal est éliminé par un signal peptidase en laissant une pro-séquence N-terminale composée de deux résidus. Pour leur activation, les sérines protéases doivent éliminer la séquence pro-dipeptide qui nécessite la contribution d'une dipeptidyl peptidase I (DPPI) (Pham, 2006).

Concernant leurs mécanismes de régulation, il a été rapporté que chez *V. vulnificus* l'expression et la production d'une sérine protéase (VvsA) dépendent du QS pendant les premières heures de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. Il a été démontré que la perturbation du gène *luxS* (responsable de la production des autoinducteurs du type 2 (AI-2)) cause la diminution de l'expression de VvsA et la production de VvsA (Elgaml *et al.*, 2013)

1.4.3 Les protéases à sérine dans le genre *Vibrio*

Plusieurs protéases à sérine ont été décrites comme des facteurs de virulence chez le genre *Vibrio*. Pour *V. alginolyticus*, pathogène de crevette impériale (*Penaeus japonicus*), une sérine protéase purifiée a été identifiée comme une toxine létale avec une DL₅₀ de 0,29 µg de protéines/ g. Des propriétés anticoagulantes de l'hémolymphe ont été aussi observées suite à l'injection de cette toxine aux crevettes (Chen *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997). En 2002, Lee et collaborateurs ont caractérisé une protéase à sérine chez *V. parahaemolyticus*. Suite à une injection par voie intrapéritonéale et par voie intraveineuse, la protéine purifiée provoque une hémorragie tissulaire et la mort des souris. Également, chez *V. cholerae*, une sérine protéase a été identifiée comme responsable des hémorragies au niveau de l'intestin grêle distal du lapin (Syngkon *et al.*, 2010) et nouvellement une autre sérine protéase extracellulaire (VesB) appartenant à la superfamille des chymotrypsines a été caractérisée (Gadwal *et al.*, 2014). Enfin, une nouvelle protéase à sérine a été identifiée dans le sécrétome de *V. metschnikovii*. Cette sérine protéase a montré sa capacité de cliver plusieurs protéines de la coagulation sanguine, dont le fibrinogène, la prothrombine et la thrombine (Park *et al.*, 2012).

1.5 Les protéases à cystéine

1.5.1 Généralités et mode d'action

Les protéases à cystéine sont des peptidases qui ont en commun un mécanisme catalytique qui implique une cystéine présente dans la triade catalytique avec un poids moléculaire estimé entre 21-30 kDa.

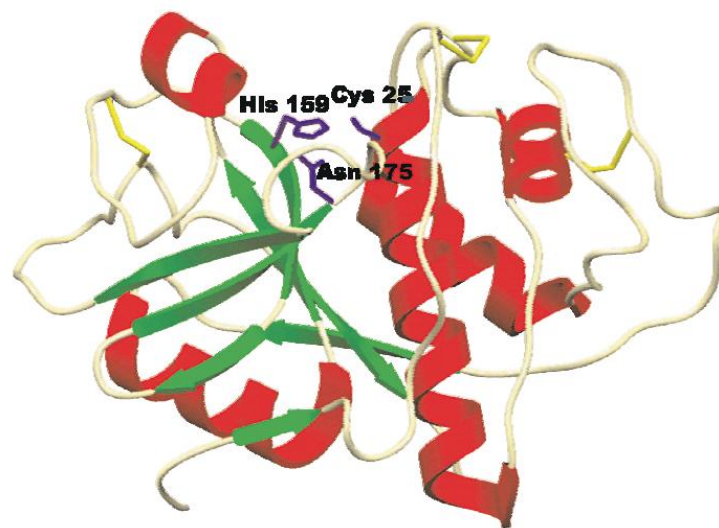


Figure 12: La triade catalytique de la protéase à cystéine (papaine) (Grzonka *et al.*, 2001)

Pour son activité, la protéase à cystéine dispose d'une cystéine et d'une histidine habituellement dans leur site actif. La première étape de la réaction catalytique est la déprotonation du thiol de la cystéine du site actif par l'histidine. La deuxième étape est une attaque nucléophile d'un carbone du substrat par le soufre de la cystéine déprotonée (Cys-S⁻). Un fragment du substrat est alors libéré, alors que le résidu histidine de l'enzyme est restauré dans sa forme déprotonée. Un thioester intermédiaire est formé liant la cystéine du site actif au reste du substrat. La liaison thioester est ensuite hydrolysée libérant le reste du substrat et restaurant la cystéine sous sa forme initiale. Le substrat est donc hydrolysé en deux fragments (Rzychon *et al.*, 2004).

Les protéases à cystéine sont généralement inactivées sélectivement par le E-64, un inhibiteur de source microbienne (isolé de cultures de *Aspergillus japonicus*), l'iodoacétate, idoacétamide, N-ethylmaléimide, p-chloromercuribenzoate et les ions métalliques (Cu^{2+} , Ag^{2+} et Hg^{2+}) (Supuran *et al.*, 2002).

1.5.2 Synthèse et régulation

Les protéases à cystéine, comme toutes les protéases, sont synthétisées comme des proenzymes. Certaines comme les caspases sont synthétisées sous forme inactive et doivent être clivées après un résidu aspartate et dimérisées (association de deux grandes et de deux petites sous unités) pour être actives (Alberts *et al.*, 2002; Coulis, 2007). D'autres types de protéase à cystéines comme les calpaïnes nécessitent une autoprotéolyse et surtout la présence du calcium pour être actives (Baud *et al.*, 2003). Il a été décrit que chez *V. harveyi*, la sécrétion des protéases y compris les protéases à cystéine est régulée également par le système de quorum sensing (Rajamani & Sayre, 2011). Il existe également des inhibiteurs naturels de protéase à cystéine comme la cystatine pour assurer un équilibre intra et extracellulaire (Grzonka *et al.*, 2001).

1.5.3 Les protéases à cystéines dans le genre *Vibrio*

Plusieurs rôles ont été attribués aux protéases à cystéine surtout dans le développement et la progression de nombreuses maladies qui impliquent des réactions d'hydrolyse protéolytique (Grzonka *et al.*, 2001). Quelques protéases de type cystéine ont été caractérisées chez les bactéries du genre *Vibrio* et impliquées dans la virulence. Par exemple, le rôle de la protéase à cystéine produite par *V. harveyi* a été étudié. Par infection expérimentale, cette protéase a montré une forte activité toxique chez les crevettes *P. monodon* avec une DL_{50} de 0,3 μg de protéines/g. La toxicité de cette protéase à cystéine a été neutralisée avec des anticorps anti-cystéine. La pré-incubation du surnageant de culture de *V. harveyi* avec le CuCl_2 a également réduit toute toxicité indiquant ainsi l'importance de cette protéase dans la virulence du surnageant bactérien (Liu *et al.*, 1997; Liu & Lee, 1999).

En plus, Lee et collaborateurs (1999) ont montré que cette protéase interfère avec les propriétés de coagulation de l'hémolymphe de crevette et réduit la quantité du coagulogène dans le plasma. Aguirre-Guzman et collaborateurs (2005) ont démontré aussi qu'une protéase purifiée, à partir du surnageant de culture de *V. penaeicida*, présente des caractéristiques biochimiques des protéases de type cystéine (comme l'inhibition par le CuCl_2 ou l'E-64) et est associée à des activités toxiques chez la crevette blanche *L. vannamei*.

2. Les sidérophores

2.1 Généralités

Le mot sidérophore, du grec *pherein* et *sidero*, signifie porter le fer. Les sidérophores sont des peptides de bas poids moléculaire compris entre 200 et 2000 Da. Ces métabolites secondaires sont synthétisés et sécrétés particulièrement par les bactéries et les champignons en réponse à des conditions de carence en fer (Butler & Theisen, 2010). Leur rôle est de chélater et d'extraire le fer ferrique (Fe^{3+}) de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux cellules microbiennes (Neilands, 1995).

Les sidérophores forment généralement des hexadentates (molécules à six ligands pour fixer l'ion fer) octaèdre complexés avec le fer ferrique et emploient spécifiquement les catécholates, les hydroxamates, les carboxylates et les phénolates comme des ligands efficaces du Fe^{3+} (Andrews *et al.*, 2003). Il existe plus de 500 sidérophores différents chez les bactéries Gram négatives comme les Gram positives.

Le fer est un élément essentiel dans la vie des microorganismes *aérobies* qui participe à de nombreuses voies métaboliques y compris la réduction de l'oxygène pour la synthèse de l'ATP, la réduction des ribonucleotides et la formation de l'hème (Neilands, 1995). Les bactéries ont besoin d'une concentration minimale de fer de l'ordre de 10^{-5} M pour leur croissance. Une carence en cet élément engendre un effet bactériostatique et l'extrême carence génère un effet bactéricide.

En conséquence, plusieurs genres de bactéries produisent des sidérophores afin de pomper le fer essentiel à leur croissance et leur développement dans les environnements pauvres comme le sol et les milieux aquatiques.

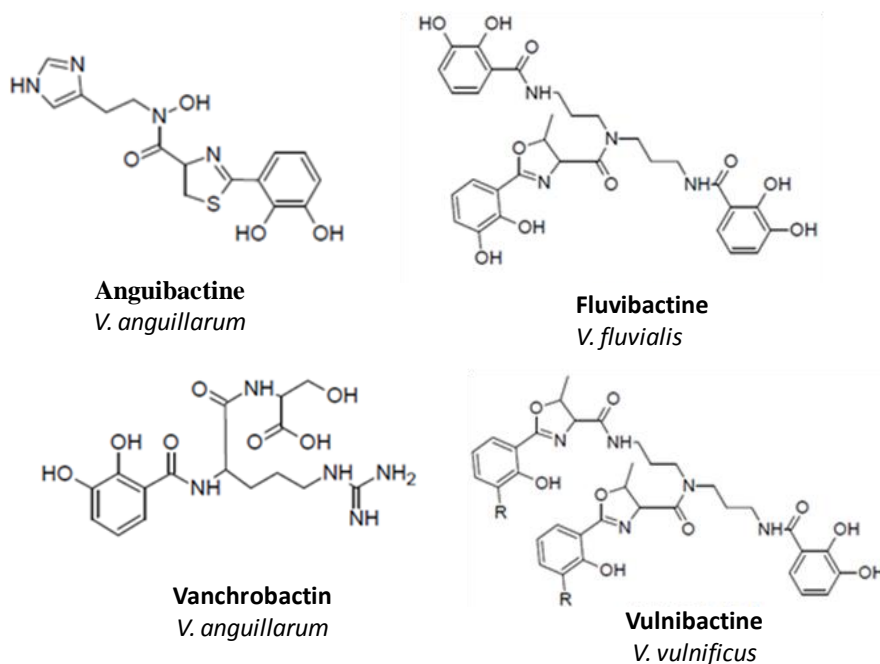


Figure 13: Exemple de sidérophores chez le genre *Vibrio*

2.2 Mode d'action

Après la reconnaissance de l'ion Fe^{3+} par les sidérophores, le complexe est transporté à travers la membrane externe par un récepteur spécifique. Ce passage nécessite un transporteur hautement spécifique à chaque sidérophore et un transducteur d'énergie. Dans le cas des bactéries à Gram négatifs, l'énergie requise est procurée et transmise par le complexe TonB-ExbBExbD localisé dans la membrane interne (Figure 13). Des protéines de liaison permettent ensuite le transport du complexe ferri-sidérophore du récepteur à la membrane interne et par suite à travers les perméases via les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette) qui utilise l'ATP comme énergie, où il se dissocie soit par digestion partielle, soit par un processus réductif et libère l'ion Fe^{2+} .

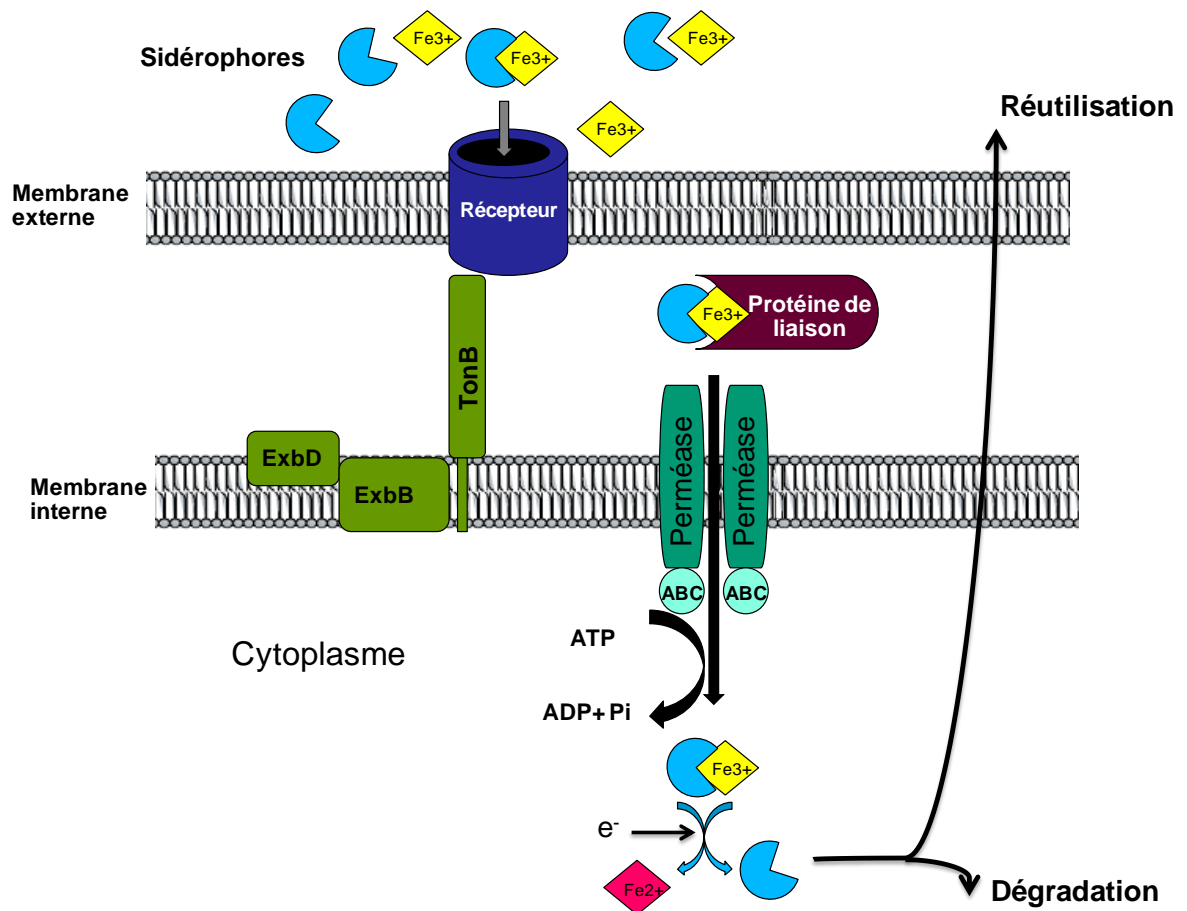


Figure 14: Représentation schématique de l'acquisition du fer par les sidérophores chez les bactéries à Gram négatifs (Andrews *et al.*, 2003).

2.3 Biosynthèse et régulation

La compréhension des mécanismes de la biosynthèse des sidérophores et leur système d'acquisition ainsi que leur régulation ont été facilités par l'utilisation de la bactérie modèle *E. coli*. Il existe deux voies pour la biosynthèse des sidérophores (Kadi & Challis, 2009). La première voie dépend des enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (NRPS pour Nonribosomal Peptide Synthetase). Ces peptides synthétases sont des enzymes multimodulaires présentant plusieurs activités enzymatiques et qui ne nécessitent pas de brin d'ARNm pour produire des peptides. Une deuxième voie indépendante des NRPS est destinée à la production de sidérophores de type hydroxamates et carboxylates chez la plupart des bactéries. Cette voie

repose sur plusieurs activités enzymatiques telles que la mono-oxygénase, la décarboxylase, l'aminotransférase, la ligase, et l'aldolase (Miethke & Marahiel, 2007).

Pour éviter la privation ou la surabondance de fer, les bactéries possèdent des systèmes de régulation pour maintenir un taux suffisant en fer. Chez les bactéries Gram négatif, il existe un facteur de régulation Fur (pour Ferric Uptake Regulator) conservé dans les espèces *E. coli*, *Vibrio* et *Yersinia*. Ce facteur joue un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des sidérophores (Massé & Arguin, 2005; Neilands, 1995). D'autres facteurs sont aussi impliqués dans la régulation de la biosynthèse de certains sidérophores et ses protéines d'acquisition comme les facteurs -ECF (σ -ExtraCytoplasmic Function). Ces derniers sont des facteurs alternatifs qui se fixent sur l'ARN polymérase pour réguler la transcription d'un nombre de gènes en réponse à des changements extracellulaires (Potvin *et al.*, 2008). En cas de carence en fer, une cascade de signalisation via les facteurs σ -ECF va activer la transcription des gènes de production et d'acquisition du sidérophore et dans le cas d'un excès, un rétrocontrôle génique par les facteurs de répression Fur bloque la production des sidérophores ainsi que ses systèmes d'acquisition (Yeterian, 2010).

2.4 Sidérophores chez *Vibrio*

Beaucoup de vibrions produisent des sidérophores comme une stratégie pour séquestrer le fer dans le milieu marin. Le rôle des sidérophores dans la virulence des bactéries a été souvent démontré. Chez *V. vulnificus*, en utilisant des mutants incapables de produire des sidérophores et d'acquérir de fer à partir de la transferrine, Litwin et collaborateurs (1996) ont prouvé la diminution de la virulence de *V. vulnificus* envers des souris. Également, une autre étude a montré l'importance des sidérophores dans la virulence de *Staphylococcus aureus* (Dale *et al.*, 2004). Chez *V. anguillarum*, il a été confirmé le rôle des transporteurs d'anguibactine dans la virulence de la souche (Stork *et al.*, 2004). Cependant, Sigel et collaborateurs (1985) ont montré que les sidérophores et leurs transporteurs ne sont pas nécessaires pour la virulence *V. cholerae* et qu'elle peut utiliser le citrate ou l'asparagine pour sa croissance dans les milieux pauvres en fer.

Une grande diversité de structures a été observée chez les sidérophores produits par les *Vibrio*. Le tableau 9 illustre les différents sidérophores secrétés par le genre *Vibrio*.

Tableau 9: Différents sidérophores décrits au sein du genre *Vibrio*

Espèces	Types de sidérophore	Références
<i>V. anguillarum</i>	Anguibactine	(Actis <i>et al.</i> , 1986)
	Vanchrobactine	(Lemos <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. cholerae</i>	Vibriobactine	(Griffiths <i>et al.</i> , 1984)
<i>V. vulnificus</i>	Vulnibactine	(Okujo <i>et al.</i> , 1994)
<i>V. fluvialis</i>	Fluvibactine	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Vibrioferrine, Ferrichrome, Aerobactine	(Broberg <i>et al.</i> , 2011)
<i>V. hollisae</i> et <i>V. mimicus</i>	Aerobactine	(Okujo & Yamamoto, 1994)
<i>V. harveyi</i>	Sidérophore	(Soto-Rodriguez <i>et al.</i> , 2012)

3. Les hémolysines

3.1 Généralités

Les hémolysines sont des toxines extracellulaires produites par les bactéries Gram négatif et positif. Ces toxines sont qualifiées de membranolytiques car elles ont la capacité de causer des dommages et de désorganiser les membranes cytoplasmiques, provoquant ainsi une altération de l'activité physiologique cellulaire, voire la mort de la cellule, d'où leur autre nom générique de cytolysines (Goebel *et al.*, 1988). Chez certaines espèces, leur rôle principal est de fournir aux microorganismes le fer nécessaire au développement de la bactérie dans un milieu déficient (Opal *et al.*, 1990), mais certaines sont devenues des facteurs de virulence redoutables. Par conséquent, on distingue les toxines formant des pores (PFTs), les toxines à activité détersive par solubilisation de la membrane cytoplasmique par une action détergente et les toxines à activité enzymatique essentiellement les phospholipases (Figure 14) (Rossignol, 2007; Bai *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action des PFTs sera détaillé dans le paragraphe suivant.

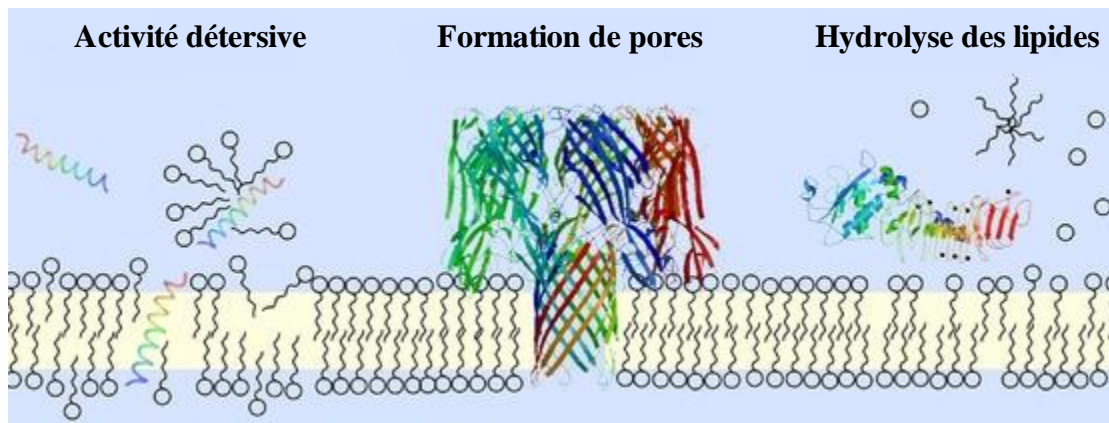


Figure 15: Les différents mécanismes pour endommager la membrane cytoplasmique de l'hôte (Sonnen & Henneke, 2013). Par l'action de toxines de caractère amphiphiles qui peuvent s'intégrer dans la membrane et solubiliser la membrane lipidique. Par l'action d'enzymes hydrolytiques par hydrolyse de phospholipides. Par les toxines formeuses de pores qui intègrent des canaux la bicouche lipidique, créant ainsi une connexion entre le cytosol et l'espace extracellulaire de la cellule cible.

3.2 Mode d'action

Les hémolysines du type PFTs sont classées selon la structure qu'elles utilisent lors de l'étape de la perforation de la bicouche lipidique. On distingue les α -PFTs qui traversent la membrane en conformation en hélice alpha et bêta-PFTs en feuillet bêta (Gonzalez *et al.*, 2008; Parker & Feil, 2005).

Les PFTs sont sécrétées par la bactérie dans le milieu extracellulaire sous une forme soluble et habituellement sous forme de monomère. Après leur reconnaissance par des récepteurs membranaires de nature protéique ou lipidique, les PFTs adoptent une organisation oligomérique par conséquent un pore préliminaire se forme sur la surface de la membrane, qui reste intacte. L'oligomère subit alors des réarrangements conformationnels radicaux pour être inséré comme un pore stable dans la membrane (Tilley *et al.*, 2005; Sonnen & Henneke, 2013). Ainsi, le pore formé est constitué par l'assemblage des toxines dans une structure amphiphile avec une face hydrophobe exposée vers la membrane et une face hydrophile dans la partie extracellulaire (Figure 15).

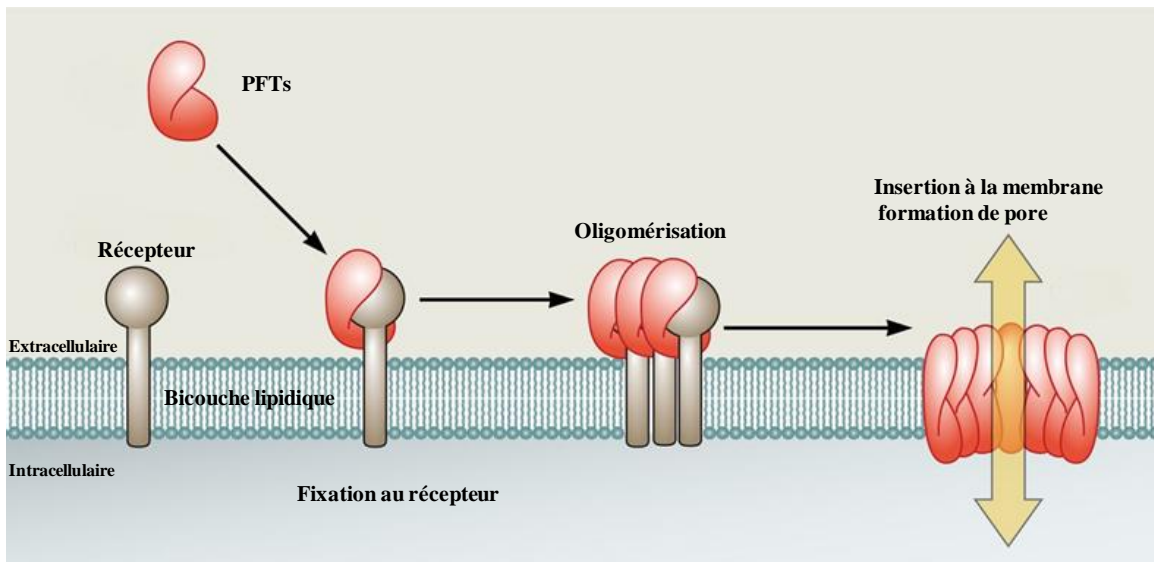


Figure 16: Le processus de formation de pores par les PFTs (Sonnen & Henneke, 2013)

Cependant, tous les pores membranaires ne sont pas égaux. Par exemple, le diamètre des pores de l'aérolysine (chez *Aeromonas hydrophila*) est nettement plus faible que celui de la streptolysine O (chez *Streptococcus pyogenes*).

3.3 Sécrétion et régulation

La sécrétion des hémolysines est souvent médiée par le système de sécrétion du type I (Gentshev *et al.*, 2002). Pour *V. cholerae*, l'hémolysine HlyA est synthétisée sous une forme d'un précurseur prepro-HlyA de 82 kDa composé d'un peptide signal de 25 aa, un pro-peptide de 125 aa jouant le rôle d'un chaperon intramoléculaire et une région mature de 584 aa. La forme active de l'hémolysine est produite en deux étapes : lors du passage de la HlyA à travers la membrane interne, le peptide signal est clivé suivi par une perte immédiate de la partie pro-peptidique au moment de sa sécrétion (Zhang & Austin, 2005). *In vitro*, la maturation de cette toxine peut être effectuée par différentes protéases types hémagglutinine/protéase, trypsine, subtilisine et thermolysine (Nagamune *et al.*, 1996).

La régulation de l'expression de l'hémolysine a été souvent associée à la disponibilité du fer dans le microenvironnement. Chez *V. cholerae*, Stoebner et Payne (1988) ont montré que l'ajout d'un chélateur de fer dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la synthèse de l'hémolysine. De même, la production de l'hémolysine dans un milieu pauvre en fer est

réprimée par l'addition de fer. Récemment, chez *V. vulnificus*, Lee et collaborateurs (2013) ont démontré qu'au niveau transcriptionnel, la production d'hémolysine VvhA est contrôlée par le facteur Fur (un facteur de transcription majeur contrôlant l'homéostasie du fer). Au niveau post-traductionnel, ils ont prouvé que la régulation de VvhA dépend de l'expression des protéases qui la dégradent comme la VvpE (*V. vulnificus* elastase) et la VvpM (*V. vulnificus* metalloprotease).

3.4 Implication des hémolysines dans la virulence des *Vibrio*

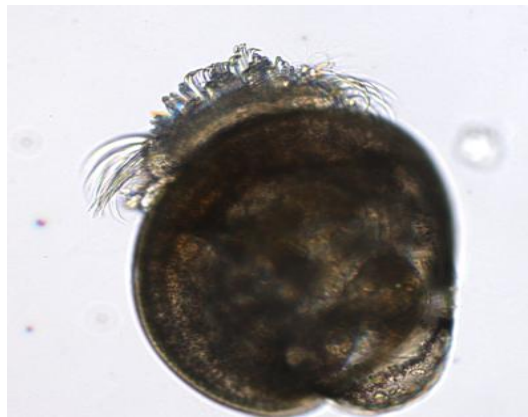
Chez les *Vibrionaceae*, plusieurs hémolysines ainsi que leurs rôles dans la virulence ont été décrits. Chez *V. cholerae*, la plupart des souches non-O1, produisent une toxine cytolytique sécrétée dans le milieu extérieur : la toxine El Tor cytolysine/hémolysine ou HlyA (Ichinose et al., 1987). Cette toxine présente une activité entérotoxique et apparaît comme la cause principale de la gastroentérite causée par les souches *V. cholerae* non-O1. Chez *V. vulnificus*, une exotoxine de type hémolysine (VvhA) a été identifiée (Gray & Kreger, 1985). En plus de son rôle dans la libération du fer de l'hémoglobine et la formation de pores dans la membrane cellulaire. Cette toxine provoque des effets cytotoxiques. L'injection intradermique de la VvhA purifiée à des souris a entraîné des dommages au niveau des cellules graisseuses, des cellules endothéliales et des cellules musculaires et des infiltrations inflammatoires modérées. D'autres études ont démontré que la VvhA stimule l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'apoptose des cellules endothéliales et l'hyperproduction de l'oxyde nitrique (Horseman & Surani, 2011). De même, chez *V. parahaemolyticus*, une hémolysine thermostable directe (TDH) et une hémolysine apparentée à la TDH (TRH) ont été décrites (T. Honda, 1993). Ces deux toxines possèdent une activité de type entérotoxique, cardiotoxique et cytotoxique (Nair et al., 2007). Chez *V. harveyi*, l'hémolysine (VHH) de type phospholipase a montré une cytotoxicité contre des cellules de poisson et une forte pathogénicité envers le poisson flet par injection qui s'est manifestée par des hémorragies au niveau de la cavité péritonéale et la formation des zones nécrotiques à l'endroit de l'injection (Zhong et al., 2006). En plus, la VHH a provoqué des changements structuraux et une induction de l'apoptose chez les cellules de flet (Bai et al., 2010). Chez *V. anguillarum*, quatre hémolysines ont été identifiées VAH 2, VAH 3, VAH 4 et VAH 5 (Rodkhum et al., 2005b). Les hémolysines purifiées ont montré des activités hémolytiques contre les érythrocytes de poissons, de moutons et de lapins. Les souches mutées à un seul gène des quatre ont été trouvées moins virulentes que la souche sauvage envers les truites

(*Oncorhynchus mykiss*), indiquant ainsi que chaque gène d'hémolysine contribue à la virulence de *V. anguillarum*. Une hémolysine Vh-rTDH produite par *V. hollisae*, similaire à l'hémolysine TDH de *V. parahaemolyticus*, a été identifiée. Cette toxine a montré des activités cytolytiques envers plusieurs types d'érythrocytes animales (Yoh *et al.*, 1986). Enfin, chez *V. tubiashii*, une cytolytine similaire à celle de *Vibrio vulnificus* capable de lyser plusieurs types de cellules et des érythrocytes a été décrite (Kothary *et al.*, 2001).

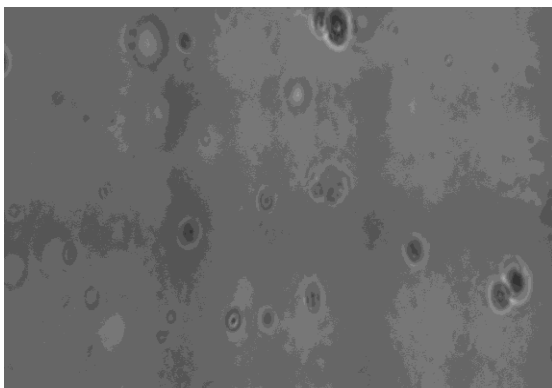
Partie C: Les différents modèles d'études de la virulence du genre *Vibrio*



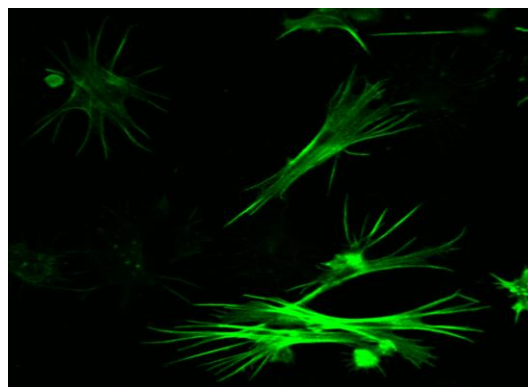
Huîtres creuses *C. gigas* de 24 mois (Mersni)



Larves de *C. gigas* (13j) (Mersni)



Hémocytes de *C. gigas* (Mersni)



Marquage d'actine des hémocytes de *C. gigas* à la phalloïdine-FITC (Mersni)

Afin d'évaluer le potentiel de virulence d'un agent pathogène et dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques plusieurs modèles d'interactions ont été adoptés. L'approche la plus classique constitue à étudier *in vivo* l'impact du microorganisme pathogène sur des organismes vivants en vue de détecter des manifestations cliniques et une réponse immunitaire. Des approches *in vitro* assez simples optant pour des modèles cellulaires et moléculaires ont été également développées et leurs études ont été facilitées par le progrès au niveau des techniques d'analyse comme la cytométrie en flux et la microscopie.

En ce qui concerne la compréhension des mortalités observés chez l'huître, il est évident que l'hôte lui même constitue le meilleur modèle d'interaction afin de mieux interpréter les stratégies et les mécanismes d'action adoptés par le pathogène. Dans ce chapitre, nous aborderons les différents modèles d'études utilisés dans la littérature pour expliquer les types d'interactions entre les vibrions aussi bien que leurs produits de sécrétion et l'huître par des approches *in vivo* et *in vitro*.

1. Approche *in vivo*

Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur l'huître creuse *C. gigas* car elle représentera le modèle d'étude utilisé dans ce projet de thèse.

1.1 Modèle d'étude: généralités sur l'huître creuse *C. gigas*

1.1.1 Systématique et répartition

L'huître creuse *C. gigas*, aussi appelée huître japonaise, est un mollusque bivalve appartenant à l'embranchement des Mollusques, classe des *Lamellibranches* (*Bivalvia*), ordre des *Filibranchia*, sous-ordre des *Anisomyaria*, super-famille des *Ostreoidea*, famille des *Ostreidae*, genre *Crassostrea* et espèce *gigas*.

Historiquement, son foyer évolutif est centré sur l'Asie et plus précisément sur le Japon. Elle a été introduite dans de plusieurs régions du monde pour des raisons commerciales. Il s'agit aujourd'hui de l'espèce d'huître la plus cultivée au monde, en Europe (Grizel & Héral, 1991), sur la côte ouest des États-Unis, au Canada, en Afrique du Sud, en Tasmanie, en Nouvelle-Zélande ainsi qu'en Russie et en Australie (Orlenko, 1994; Thomson, 1952, 1959) en raison de sa croissance rapide et sa grande tolérance aux conditions

environnementales. En France, l'huître creuse, *C. gigas* a été introduite en 1966. Sur la côte Atlantique, le bassin de Marennes-Oléron (150 km²) est le premier bassin ostréicole européen avec un stock d'huîtres creuses de 110 000 tonnes pour une production annuelle de 30 000 à 40 000 tonnes (Soletchnik *et al.*, 1999).

1.1.2 Ecologie et biologie

L'huître creuse est une espèce d'estuaire, préférant les zones inférieures des supports solides où elle mène une existence sédentaire attachée aux rochers. Cependant, ces huîtres peuvent également être trouvées sur les fonds vaseux et sablo-vaseux. La densité d'huître sur les gisements naturels peut dépasser 250 individus au m². Ces bivalves apprécient les eaux tempérées, mais sont également capables de résister à des fortes variations de température, et une salinité moyenne de l'eau. Une fois submergées par la marée, les huîtres se nourrissent en filtrant les phytoplanctons de la colonne d'eau (Samain *et al.*, 2007).

1.1.3 Rappels anatomiques et physiologiques

C. gigas est un mollusque bivalve qui mesure jusqu'à 15 cm de longueur. Son corps est mou, non segmenté. La coquille est allongée de forme ovale d'aspect rugueux et comporte de nombreuses arêtes concentriques crénelées qui donnent aux bords un aspect dentelé. La valve inférieure est très creuse, la valve supérieure est légèrement bombée.

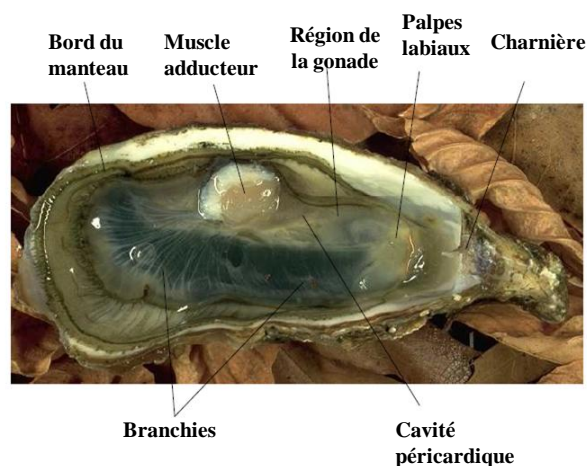


Figure 17: Anatomie de l'huître creuse *C. gigas* (Bacca, 2007)

La coquille calcaire, sécrétée par le manteau, est formée de deux valves asymétriques.. Les deux lobes sont reliés entre eux par une charnière et par le ligament interne qui prolonge la charnière. Le manteau est un fin voile de chair constitué de deux lobes. Son rôle principal est d'assurer la croissance et le développement de la coquille et d'intervenir dans la nutrition. Le muscle adducteur est un organe massif, situé dans la partie postéro-dorsale du corps, attaché à chaque valve par une couche de cellules spécialisées. Son rôle, avec la charnière, est de garantir le mécanisme de fermeture et d'ouverture de la coquille afin de protéger l'huître des prédateurs et d'assurer l'expulsion des gamètes et des excréments. L'huître possède d'autres fibres musculaires; au sein du manteau pour sa contraction, au niveau des branchies et du cœur pour assurer la circulation de l'hémolymphe (le fluide circulatoire) et encore autour de l'estomac pour assurer la digestion. Le cœur est situé contre le muscle adducteur dans la cavité péricardique (Figure 16). L'huître, comme tous les bivalves, est un coquillage filtreur. Elle se nourrit exclusivement des petits éléments contenus dans l'eau de mer (phytoplanctons, bactéries...).

1.1.4 Reproduction

La sexualité des huîtres repose sur un hermaphrodisme du type alternatif irrégulier (Gerard *et al.*, 1995). Elle se reproduit une ou plusieurs fois durant l'été entre juin et septembre et c'est à cette période que l'huître est laiteuse. Lors de la ponte, les femelles expulsent les ovules et les mâles laissent échapper les spermatozoïdes comme un mince filet continu. 24 heures après la fécondation, une petite larve d'huître sous forme de D est formée. Elle présente une coquille avec deux valves et une charnière ainsi qu'un velum et une sorte de voile cilié. La vie pélagique de la larve dure une vingtaine de jours pendant lesquels elle grandit et subit des transformations. Une terminologie particulière, basée sur la taille des larves, est employée à l'usage des ostréiculteurs (Figure 17).

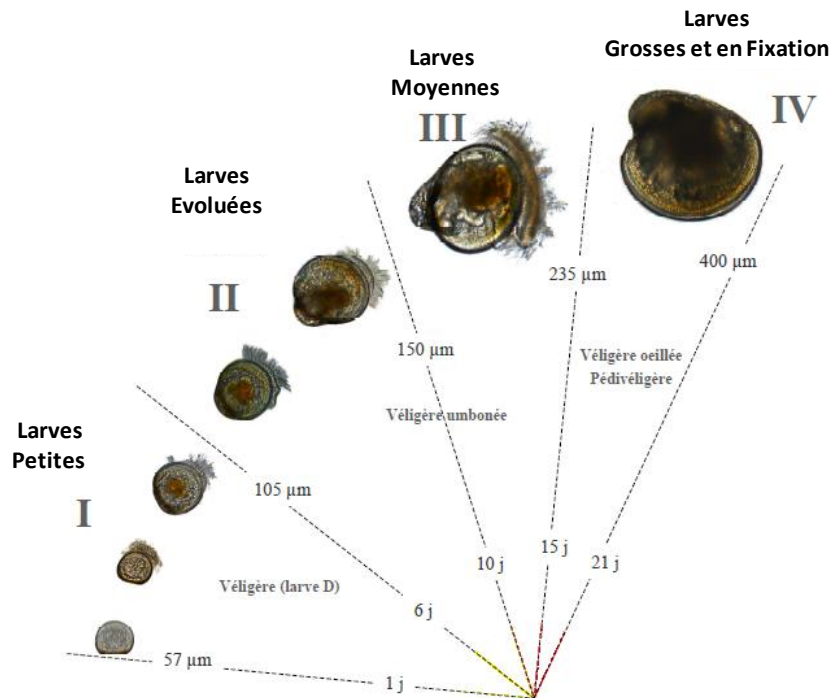


Figure 18: Développement larvaire chez l'huître creuse, *C. gigas* (Ifremer)

1.2 Les différentes techniques utilisées en infections expérimentales

Chez les bivalves marins, les bactéries du genre *Vibrio* affectent tous les stades de vie, y compris les larves, les juvéniles ou les adultes dans leurs milieux naturels ou dans les installations expérimentales d'élevages (Paillard *et al.*, 2004a; Romalde & Barja, 2010; Romalde *et al.*, 2014). Plusieurs techniques d'infections expérimentales ont été adoptées afin de reproduire les observations faites pendant les épisodes de mortalités. Les techniques de pathologie expérimentale les plus utilisées sont : (i) l'infection par balnéation qui consiste à immerger des huîtres saines dans l'eau de mer contaminée avec le pathogène, (ii) la cohabitation qui correspond à une infection des huîtres saines par simple contact avec des huîtres infectées et enfin (iii) l'injection, qui est la plus répandue, soit au niveau du muscle adducteur soit au niveau de la cavité palléale. Le tableau 10 présente un résumé des différentes techniques utilisées en pathologie expérimentale chez l'huître creuse *C. gigas*.

Tableau 10: Un récapitulatif des différentes techniques utilisées en infections expérimentales chez *C. gigas* par *V. aestuarianus*, *V. splendidus*, et *V. tubiashii*. ufc: unités formant colonies, j: jour, h: heure, n.d: non déterminé, cf: concentration finale.

Techniques d'infections expérimentales	Espèces de <i>Vibrio</i>	Stade de vie de l'huître	Dose infectieuse testée et % de mortalité	Toxicité des ECPs Dose (cf) et % de mortalité	Références
Par injection	<i>V. aestuarianus</i> 01/32	Adultes	510 ⁷ ufc 70% au bout de 7 j	3,3 µg/g 50% au bout de 7j	(Labreuche <i>et al.</i> , 2006a, 2006b)
	<i>V. splendidus</i>	Juvéniles et adultes	Juvénile 10 ⁶ ufc/huître ≈ 50% au bout de 5 j Adultes 10 ⁶ ufc/huître ≈ 10% au bout de 10 j	n.d	(Lacoste <i>et al.</i> , 2001)
	<i>V. splendidus</i> LGP 32	Juvéniles Adultes	410 ⁷ ufc 19,2% au bout de 21j 5 10 ⁸ cfu/huître 50% au bout de 4j	5 µg/g 93,3% au bout de 24h n.d	(Gay <i>et al.</i> , 2004; Binesse <i>et al.</i> , 2008) (Duperthuy <i>et al.</i> , 2010)
Par balnéation /cohabitation	<i>V. splendidus</i> biovar I	Larves	10 ⁵ ufc/ml 100% au bout de 24h	////////////////////	(Sugumar <i>et al.</i> , 1998)
	<i>V. splendidus</i> LGP 32	Juvénile	10 ⁵ ufc/ml pas de mortalité	////////////////////	(Gay <i>et al.</i> , 2004)
	<i>V. tubiashii</i>	Larves	1,6 à 3,6 × 10 ⁴ ufc/ml 50% au bout de 24%	5µg/ml 80% au bout de 24h	(Estes <i>et al.</i> , 2004; Hasegawa <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Vibrio splendidus</i> et LGP32 <i>V. aestuarianus</i> 02/041	Adultes	27% au bout de 16 j	////////////////////	(De Decker & Saulnier, 2011)

En effet, il n'est pas évident de retrouver le bon modèle d'infection expérimentale et d'imiter le phénomène observé dans la nature. Même si les infections comme la balnéation ou la cohabitation sont les plus proches des phénomènes naturels, le manque de la reproductibilité potentiellement lié à la simplicité des microcosmes utilisés a mené de nombreux auteurs à privilégier l'injection.

2. Approche *in vitro*

2.1 Les modèles cellulaires

2.1.1 Généralités sur les hémocytes

Durant ces dernières décennies, l'implication des hémocytes dans la défense des bivalves est de plus en plus étudiée afin de comprendre le comportement des bivalves lors d'une infection et de pouvoir mettre la main sur les facteurs qui peuvent nuire au bon déroulement de la réaction immunitaire.

Le système immunitaire chez les invertébrés repose exclusivement sur les défenses innées (ou non-spécifiques). En plus des barrières physico-chimiques telles que la coquille, la cuticule, les couches de mucus et le manteau qui représentent une première ligne de défense contre les agresseurs, l'immunité non spécifique des mollusques s'articule autour d'une réponse humorale et d'une réponse cellulaire qui interagissent étroitement (Leclerc, 1996). Néanmoins, l'immunité cellulaire semble jouer le rôle principal dans les processus immunitaires des mollusques bivalves (Roch, 1999).

Contrairement à ce qu'il a été rapporté que les mollusques bivalves sont incapables de développer des acteurs de la mémoire immunitaire adaptative et ne se défendent vis à vis des pathogènes que par des réponses rapides, mettant en jeu la phagocytose et les réactions inflammatoires (Tiscar & Mosca, 2004). Zhang et al. (2014), ont montré que le phénomène de « priming » (la stimulation des cellules T naives pour devenir des cellules T effectrices) existe chez les huîtres creuses (*C.gigas*).

Le système humoral et plus spécifiquement l'hémolymphe (le plasma), est constitué majoritairement par des molécules solubles à fonctions cytotoxiques comme les enzymes

lysosomales, les agglutinines, les lectines et le système cellulaire est composé par les cellules sanguines circulantes appelées hémocytes (Figure 18)

(Leclerc, 1996; Canesi *et al.*, 2002).

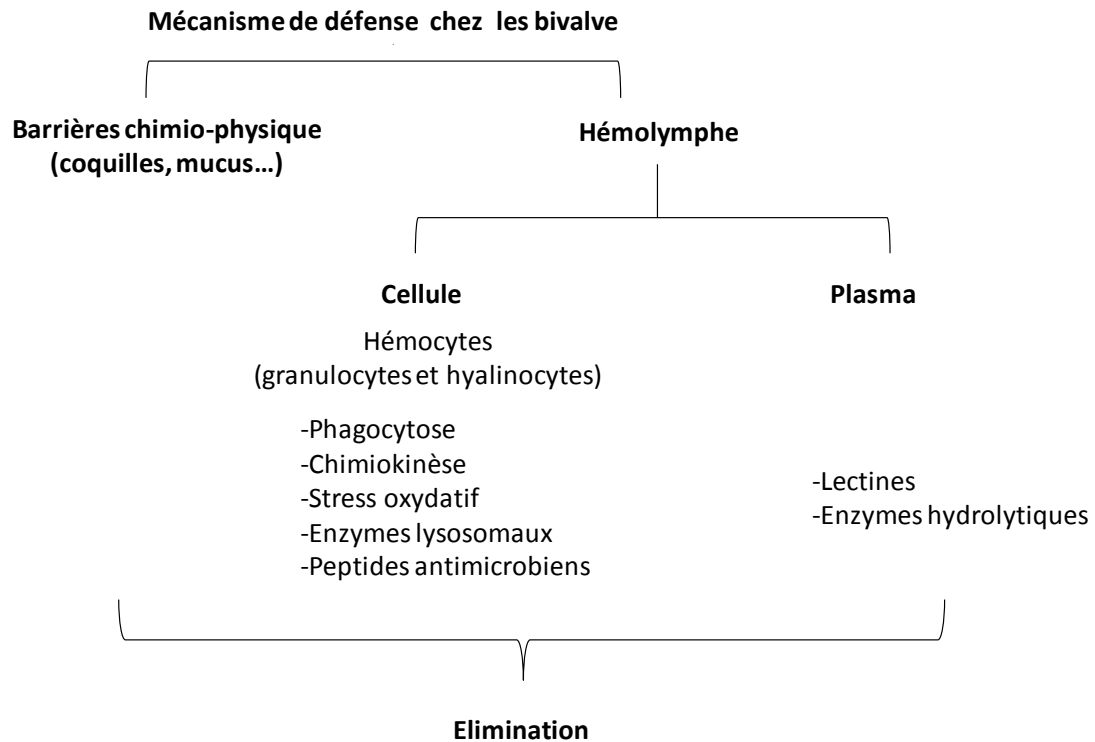


Figure 19: Mécanisme de défense chez les bivalves contre l'invasion bactérienne (Canesi *et al.*, 2002 ; Schmitt *et al.*, 2012).

Selon des critères morphologiques et fonctionnels, les études sur les hémocytes s'accordent sur l'existence de deux grandes groupes ; les hémocytes granulaires (qui contiennent des granules cytoplasmiques de diverses tailles et un rapport noyau/cytoplasme faible) et les non granulaires ou hyalinocytes (qui contiennent peu de granules et ont généralement un rapport noyau/cytoplasme important) (Cheng, 1984; Fisher, 1986; Hine, 1999). Pour les huîtres, un troisième groupe supplémentaire distinct des deux autres appelé «petits granulocytes» a été identifié grâce à la cytométrie en flux (Allam *et al.*, 2002; Ashton-Alcox & Ford, 1998).

Les hémocytes accomplissent différentes fonctions ; ils participent à la réparation des divers tissus mous et de la coquille, à la digestion, au transport des particules nutritive, à l'excrétion en éliminant des déchets par exophagocytose, à la phagocytose des particules étrangères et des agents pathogènes ou leur encapsulation en formant des kystes, à l'accumulation des métaux (Grizel, 2003).

Au sein d'une même espèce, il peut y avoir des variations considérables dans la composition des hémocytes et dans leurs fonctions.

L'activité des hémocytes nécessite un contact avec la cellule cible : ce premier niveau de reconnaissance du non-soi ainsi que l'élimination du corps étranger est un phénomène commun dans tous les invertébrés à travers le processus de la phagocytose.

L'adhésion des bactéries à la membrane des cellules phagocytaires ne dépend pas seulement des forces physiques (hydrophobicité et charges d'interactions) mais peut également être médiée par des «molécules scouts». Chez les bivalves, la reconnaissance entre cellule phagocytaire et pathogène semble être facilitée par des lectines. Ces protéines dépourvues d'activités enzymatiques, sont trouvées sous forme libre dans l'hémolymphe de plusieurs invertébrés (Leclerc, 1996). Plusieurs rôles sont accordés aux lectines notamment l'agglutination pour immobiliser les corps étrangers favorisant ainsi leur lyse par des enzymes et/ou la phagocytose, l'opsonisation par liaison entre des récepteurs présents à la surface des particules et des hémocytes, et la fixation sur les hémocytes pour constituer des facteurs de reconnaissance pour les microorganismes (Chu, 2000; Gagnaire, 2005). Plusieurs types de lectines ont été trouvés dans l'hémolymphe de *C. gigas* (gigalins) (Olafsen *et al.*, 1992), et en plus de l'agglutination, les lectines agissent comme des opsonines (Olafsen, 1995).

Suite à la reconnaissance et à l'adhésion des particules étrangères, les hémocytes peuvent ainsi les internaliser par phagocytose grâce au phénomène de remaniement du cytosquelette (Cheng 1981; Cheng, 1996; Cheng, 2000). Soit par l'intermédiaire de pseudopodes, de filopodes ou de vacuoles d'endocytoses, les particules étrangères se retrouvent piégées dans un phagosome. Après internalisation des particules étrangères au sein du phagosome, celui-ci fusionne avec les lysosomes pour donner naissance à un phagolysosome. La dégradation des particules étrangères ingérées s'y effectue par la formation d'intermédiaires oxygénés connu sous le terme de «bouffée respiratoire» et/ou par l'activité des enzymes lysosomales (Bachère *et al.*, 1995; Roch, 1999).

2.1.2 Les hémocytes un bon modèle d'étude

Le système d'interaction entre hémocytes-bactéries reste le modèle le plus étudié. À l'aide de cette interaction et les techniques de microscopies et de *la* cytométrie *en flux*, plusieurs travaux de recherche ont mis en évidence quelques stratégies employées par les

bactéries du genre *Vibrio* et leurs ECPs afin de nuire et même altérer la défense immunitaire de l'hôte.

Des modifications morphologiques des hémocytes caractérisées généralement par un arrondissement des cellules et une perte des pseudopodes (Figure 19) ont été observées sur les hémocytes de palourdes *V. philippinarum* en contact avec *V. tapetis* (Choquet *et al.*, 2003; Allam & Ford, 2006). Les mêmes changements ont été détectés chez la moule *M. edulis* en présence de *V. alginolyticus*, de *V. anguillarum* ou de son surnageant de culture (Lane & Birkbeck, 1999, 2000). Des modifications similaires ont été observées chez les hémocytes de *Mya arenaria* en présence de la souche *V. splendidus* et qui ont été associées à une inhibition de leur capacité d'adhésion (Mateo *et al.*, 2009). Labreuche et collaborateurs (2006b) ont montré que la souche *V. aestuarianus* affecte quelques fonctions immunitaires des hémocytes d'huître *C. gigas* comme la capacité d'adhésion et le pouvoir phagocytaire des hémocytes. Le même effet a été observé avec les ECPs de *V. aestuarianus* envers les hémocytes d'huîtres (Labreuche *et al.*, 2006a). De plus, le même sort a été observé avec la souche *V. splendidus* envers les hémocytes de la moule *M. edulis* : une diminution de la capacité d'adhésion, de la phagocytose et la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Tanguy *et al.*, 2013).

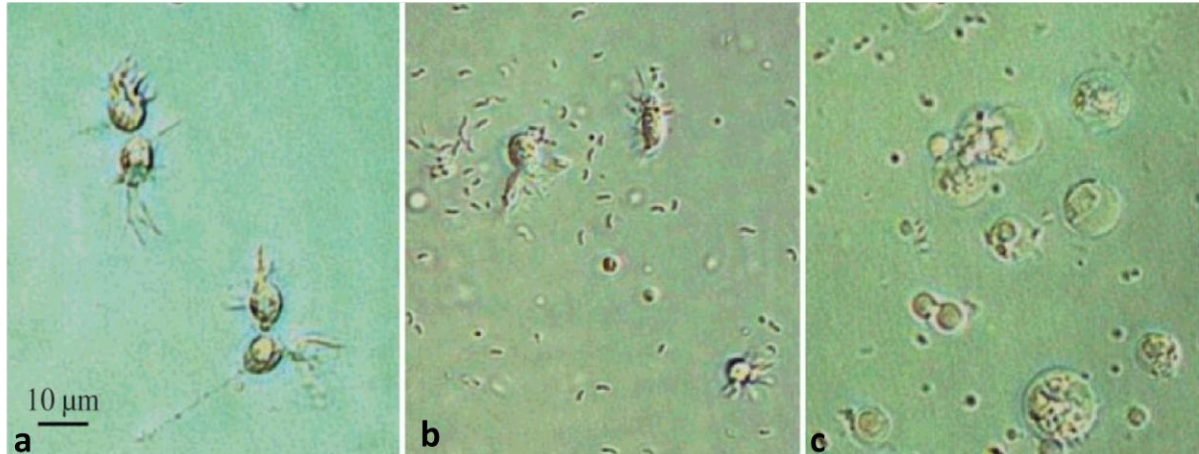


Figure 20: Observation microscopique des hémocytes de la palourde japonaise (*V. philippinarum*) après 3 h d'incubation à 18°C avec: (a) Contrôle négatif (EMSF) (hémocytes saines avec des extensions cytoplasmiques); (b) Hémolymphes avec *V. splendidus* (hémocytes normales); (c) Hémolymphes avec *V. tapetis* (hémocytes gonflées et arrondies) (Choquet *et al.*, 2003).

2.1.3 Autres modèles cellulaires

Vue l'absence des lignées cellulaires de mollusques marins, d'autres lignées d'origine humaine ou animale ont été utilisées pour mettre en évidence la cytotoxicité des produits de sécrétion des vibrions.

Une protéase à sérine purifiée de *V. parahaemolyticus* a inhibé la croissance de lignées de cellules de mammifères (HeLa, Vero, CHO et Caco-2) en causant des arrondissements cellulaires. En contact des globules rouges, cette toxine a montré une activité hémolytique et la capacité de dégrader l'hémoglobine (Lee *et al.*, 2002). Binesse et collaborateurs (2008) ont montré que les ECPs de la souche *V. splendidus* causent des rétractions des prolongements cytoplasmiques et l'arrondissement des cellules d'escargots (cellules Bge) et de fibroplastiques (cellules NIH). Les ECPs de la souche *V. harveyi* exercent un effet cytotoxique intense sur les lignées cellulaires du type HeLa en moins d'une heure de contact (Soto-Rodriguez *et al.*, 2012).

2.2 Les modèles moléculaires

Comme évoqué précédemment, au cours d'une infection, les *Vibrio* pathogènes ont la capacité de produire plusieurs facteurs de virulence. Les protéases sont classées parmi les facteurs les plus toxiques, ils agissent directement sur des protéines de l'hôte en provoquant des dommages tissulaires et cellulaires ou indirectement *via* la stimulation de l'expression des autres facteurs de virulence. Afin de mettre en évidence ce type d'activité, des substrats protéiques qui sont présents dans tous les organismes vivants et qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement cellulaire et tissulaire ont été utilisés *in vitro* en tant que modèles d'interactions. Teo et collaborateurs (2003b) ont démontré que la métalloprotéase de *V. harveyi* (Pap6) est capable d'hydrolyser plusieurs protéines comme la gélatine, la fibronectine et le collagène du type IV. Aussi, la métalloprotéase de *V. mimicus* a montré une spécificité envers plusieurs types de collagènes et la gélatine. Cependant elle n'a pas montré une activité hydrolytique envers d'autres protéines biologiques comme le lysozyme, la lactoferrine et l'albumine de sérum bovin (Lee *et al.*, 2003). Chez la souche *V. fluvialis*, une activité protéolytique envers la caséine et l'élastine a été provoquée par la métalloprotéase VFP (*V. fluvialis* protease) (Miyoshi *et al.*, 2002). Enfin, une protéase à sérine sécrétée par la souche

V. metschnikovii a été capable de cliver plusieurs protéines intervenant dans la coagulation sanguine dont le fibrinogène, la prothrombine et de la thrombine (Park *et al.*, 2012).

RESULTATS

A/ Première description d'une nouvelle souche française, pathogène de mollusques et phylogénétiquement proche de la souche type américaine *V. tubiashii*

A1: Caractérisation et détection des isolats français lors d'épisodes de mortalité

Les épisodes récurrents de mortalité affectent depuis plusieurs années les mollusques bivalves et plus spécifiquement l'huître creuse du Pacifique *C. gigas*. Ce phénomène souvent désigné sous le terme de mortalité anormale inquiète les professionnels, qui craignent la disparition de *C. gigas* à l'instar de l'huître portugaise, *C. angulata* (Comps *et al.*, 1976). Ces mortalités anormales ont une étiologie complexe et sont fonction à la fois de facteurs environnementaux, de l'état physiologique de l'hôte ainsi que de facteurs biotiques comme les parasites, les virus et les bactéries (Samain *et al.*, 2007). En France, en milieu naturel aussi bien que dans les écloséries et les nurseries, à côté des virus de type herpès (Renault *et al.*, 1994; Segarra *et al.*, 2010), des bactéries appartenant au genre *Vibrio* (Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux, 2002; Garnier *et al.*, 2008) ont souvent été détectées.

Dans le cadre d'une large étude épidémiologique menée par Saulnier et collaborateurs (Saulnier *et al.*, 2010) entre 2003 et 2007 et sous les auspices du réseau REPAMO, des bactéries dominantes ont été isolées principalement à partir d'huîtres creuses et identifiées comme appartenant au genre *Vibrio*. En plus de *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, des isolats appartenant au groupe *Harveyi* (33 isolats) ont été identifiés, infectant plusieurs lots de naissains de *C. gigas* présents dans les installations d'une éclosérie/nurserie.

La diversité des souches appartenant à ce groupe et leur seule classification par le biais du séquençage de l'ARNr 16S, nous a amené à vouloir affiner leur classification au rang de l'espèce. Bien que le séquençage de l'ARNr 16S soit largement utilisé pour la classification taxonomique de plusieurs bactéries, il apparaît pas suffisant pour la classification des espèces au sein du groupe *Harveyi* (Thompson *et al.*, 2004b; Thompson *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010).

Dans l'optique d'affiner l'affiliation de ces isolats, nous avons donc effectué des analyses complémentaires, basées sur des critères génétiques et biochimiques. Les résultats sont regroupés dans le premier article de la thèse.

Les résultats de l'analyse phylogénétique ont montré que les 9 isolats choisis du groupe *Harveyi* formaient un groupe phylogénétique homogène, éloigné de la souche type de *V. harveyi* et distinct mais proche de la souche Américaine *V. tubiashii*. La parenté avec l'espèce *V. tubiashii* a également été confirmée par les différents tests phénotypiques. Une souche représentative du groupe, initialement codifiée par 07/118 T2 a fait l'objet d'une étude génétique plus poussée. Les résultats d'hybridation ADN/ADN obtenus ont montré que la souche 07/118 T2 était génétiquement proche de la souche type américaine *V. tubiashii* (hybridation ADN/ADN < 70% ± 13).

En dehors des installations d'élevage, cette nouvelle espèce a été détectée, par PCR quantitative ciblant le gène *gyrB* (séquencé sur une des souches isolées en 2007) dans un lot de mortalité d'ormeaux issus d'écloseries françaises en 2004 et dans deux lots de mortalités d'huîtres issus d'écloseries en 2008. Cependant, cette souche n'a été détectée dans aucun des lots d'animaux moribonds issus de cultures en milieu naturel.

Dans un premier temps, l'analyse de la virulence des différents isolats a été effectuée sur des huîtres de 10 à 12 mois par des injections expérimentales induisant 70 % de mortalité au bout de 24 h mais à des densités cellulaires élevées uniquement (DO₆₀₀ de 1 et de 0,5). Dans un deuxième temps, l'injection des produits extracellulaires (ECPs) de la souche 07/118 T2 à des huîtres juvéniles et à des concentrations de 5 µg/g de chair humide, a provoqué une mortalité rapide estimée à 41 % dans les 24 h post-injection. La présence de métalloprotéase (confirmée par dosage de l'activité protéasique en présence d'un inhibiteur de métalloprotéase, la phénanthroline) ainsi que la stabilité de cette activité protéolytique a pu être observée sur la durée de l'infection. Ces premiers résultats suggèreraient que la virulence de la bactérie observée *in vivo* pourrait être en partie liée à sa capacité à produire des exoenzymes hydrolytiques de type métalloprotéase.

Les résultats obtenus font l'objet d'un premier article publié dans «Journal of Invertebrate pathology», 2014.

**ArticleI: FIRST DESCRIPTION OF FRENCH *V. TUBIASHII* STRAINS
PATHOGENIC TO MOLLUSK**

**I.CHARACTERIZATION OF ISOLATES AND DETECTION DURING
MORTALITY EVENTS**

Published in “Journal of invertebrate pathology”

Travers Marie-Agès^{1#}, Mersni-Achour Rachida^{1,2,3#}, Haffner Philippe¹, Tourbiez, Delphine¹, Cassone, Anne-Laure¹, Morga, Benjamin¹, Doghri Ibtissem², Garcia Céline¹, Renault, Tristan¹, Fruitier-Arnaudin Ingrid^{2,3×}, Saulnier Denis^{1,4×}

¹ Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins
Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

² UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé,
Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

³ Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable, FR CNRS 3097,
Université de La Rochelle, France

⁴ Present address : Ifremer, Centre Ifremer du Pacifique, UMR EIO 241 Ecosystèmes
Insulaires Océaniens, Tahiti, 98719 Taravao, French Polynesia

Marie-Agnès Travers and Rachida Mersni Achour participated equally to this work and
should be considered as primary co-authors

× Ingrid Fruitier-Arnaudin and Denis Saulnier participated equally to this work and should be
considered as last co-authors

Abstract

Nine dominant bacterial isolates were obtained from different batches of *Crassostrea gigas* spat experiencing high mortality rates in a French experimental hatchery/nursery in 2007. Using phenotypic analysis combined with multilocus sequence analysis, the isolates were shown to be genetically close to the *V. tubiashii* type strain. Based on 1) analyses of the *recA* gene sequences; 2) the results of DNA-DNA hybridization assays between 07/118 T2 (LMG 27884 = CECT 8426), which is a representative strain, and the *V. tubiashii* type strain (69%); and 3) phenotypic traits, the bacteria were classified in a group close to American *V. tubiashii* strain. Its virulence (70% of mortalities) and the toxicity of the extracellular products of 07/118 T2 was demonstrated (41% of mortalities).

Moreover, a QPCR diagnostic tool targeting the *gyrB* gene was developed to investigate the epidemiological significance of *V. tubiashii* in French oyster mortality outbreaks recorded by the national surveillance network. Of the 21 batches originating from hatcheries, only two were positive, whereas *V. tubiashii* DNA could not be detected in any of the batches of moribund animals collected in field/outdoor facilities.

These results demonstrate the existence of a group of virulent *V. tubiashii* in France that episodically infect *Crassostrea gigas*.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Pathogenicity; Extracellular Products; Polyphasic approach, Real time PCR

1. Introduction

The causes of abnormal mortalities during summer in *Crassostrea gigas* (*C. gigas*) remains unclear although several studies suggest that this phenomenon has a complex etiology involving environmental stressors (oxygen depletion, lack of food, salinity, temperature, industrial pollution, pesticides, aquaculture practices) and biological factors that include pathogens and an altered physiology of the host (Samain et al., 2007). These mortalities can affect both diploid and triploid oysters, their different life stages (Romalde and Barja, 2010; De Decker et al., 2011) both in the field (for juveniles and adults) and in hatcheries (for larval and post-larval stages). Among the biological factors, microorganisms are often associated with oyster diseases. Three infectious microorganisms are frequently described as major pathogens of oysters : herpes-like viruses (Renault et al., 1994; Segarra et al., 2010), parasites (Meyers et al., 1991; Bower et al., 1997; Tun et al., 2008) and bacteria of the genus *Vibrio* which have been described as important causal agents affecting all life stages of bivalve mollusks (Le Roux et al., 2002; Garnier et al., 2008; Saulnier et al., 2010; Beaz-Hidalgo et al., 2010). *V. splendidus* and *V. aestuarianus* are presented as the two main *Vibrio* species associated with summer mortalities of *C. gigas* in France (Lacoste et al., 2001; Le Roux et al., 2002; Garnier et al., 2008). Besides these two major bacterial, another *Vibrio* species was reported by Saulnier et al. (2010) in a large-scale epidemiological study including nine virulent strains that belong to the *V. harveyi* group. The virulence of these strains was investigated by experimental infection on *C. gigas* spat. The results showed a strong correlation between the virulence of *Vibrio* and their capacity to produce metalloprotease-like activity in the culture supernatant, particularly for the strains 07/108 T1 and 07/118 T2. These two strains can secrete a high level of proteases and can induce extremely high levels of mortality just 20 hours post injection. Partial sequence analysis based on 16S rDNA revealed that 07/108 T1 and 07/118 T2 were clustered within the *V. harveyi* group.

Nevertheless, phenotypic analysis and the use of standard molecular techniques are insufficient to classify *Vibrio*, and indeed cannot even be used to identify related species. The identification of vibrios at the family and genus level are habitually based on 16S rDNA gene sequencing, but this method is unable to separate certain closely related species (Gomez-Gil et al., 2004). The association of other analyses, including DNA-DNA hybridization and molecular fingerprinting methods, is useful for *Vibrio* identification. However, these tools are restricted to some reference laboratories and inter-laboratory comparisons of fingerprint patterns are difficult (Thompson et al., 2005).

Multilocus sequence analysis (MLSA) has been adopted to fine-tune the approach and clarify certain doubts concerning *Vibrio* classification. Using this methodology, Thompson et al. have shown that *V. harveyi* and *V. campbellii* form two separate clusters (Thompson et al., 2007) and *V. communis* and *V. owensii*, which were assigned to the *Harveyi* clade, were recently discovered to be the same species after identification using the MLSA approach (Hoffmann et al., 2012).

The aim of the present study was to refine the taxonomic affiliation of these virulent strains, previously clustered with *V. harveyi*, using a polyphasic approach (phenotypic and genotypic characterization). Secondly, quantitative challenges with live bacteria and *in vitro* culture supernatants were performed with *C. gigas* in order to evaluate their virulence and the toxicity of the extracellular products, respectively. Finally, a quantitative real-time PCR diagnostic tool was developed to screen isolates/DNA collected during the episodes of mortality that have occurred in France since 2004 and evaluate their epidemiological significance.

2. Materials and methods

2.1 Taxonomic affiliation

2.1.1 Bacteria genotyping and phylogenetic analyses (10 isolates)

The strains used in this study are described in Table 1. The predominant bacteria, which were not been yet described, were isolated, as previously described (Saulnier et al., 2010), during the mortalities recorded in oyster hatchery stocks in 2007. Briefly, after 10^{-2} and 10^{-3} dilutions in Sterile Artificial Sea Water (SASW : 2.3 % (w/v) NaCl, 20 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂), moribund oyster samples (hemolymph for adults and crushed tissues for juveniles) were plated on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS, Difco™), Zobell agar (0.4 % peptone, 0.1 % yeast extract, 0.01% ferric citrate and 1.5 % agar in SASW, pH 7.6) or marine agar (Conda) and the predominant bacteria were isolated after 48h at 20°C. Pure cultures of bacterial strains were conserved frozen at -80°C in Zobell broth with glycerol 15%.

For genotyping, DNA was extracted following the FTA[®] procedure (Whatman). Bacterial isolates were cultured during 24 hours at 20 °C in Zobell broth and 65 µl of bacterial suspension at the stationary phase of *in vitro* culture was deposited on FTA[®] paper matrix cards according to the manufacturer's instructions. Briefly, a punch from the FTA[®] Card was washed three times with FTA[®] Purification Reagent and rinsed with 200 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8). This punch was either directly transferred into a PCR tube, or conserved at -20°C before use.

The 16S rRNA (ribosomal RNA), *ftsZ* (cell division protein, cell division), *pyrH* (uridylylate kinase, nucleotide biosynthesis), *recA* (*recA* protein, DNA repair) and *topA* (topoisomerase I, DNA replication and repair) genes were amplified using the universal bacterial primer pairs listed in supplementary Table 1 and the methods previously described (Thompson et al., 2005). Amplicons with the expected size were purified using a Microcon PCR filter kit (Millipore). Purified PCR products were mixed (final volume 10 µl) with 0.4 µl ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix (Applied Biosystems[®]) and 0.75 µM of primer. Cycle sequencing reactions were performed using a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems[®]) and following the manufacturer's instructions. Separation of the DNA fragments was carried out in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Sequences were aligned using ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> and BioEdit software <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>. Pairwise similarity was calculated with BioEdit.

Phylogenetic trees were built using Mega4 <http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>. The trees were drawn using the Neighbor-Joining method with the Kimura two-parameter model (Saitou and Nei, 1987) and the maximum parsimony method (Eck and Dayhoff, 1966). Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates. The Genbank accession numbers for the 16S rDNA, *gyrB*, *recA*, *topA*, *pyrH*, *ftsZ* gene sequences obtained in this study or already published in GenBank are presented in Supplementary Table 3.

2.1.2. DNA-DNA hybridization assays (2 isolates)

DNA-DNA hybridization (DDH) was performed by the BCCMTM/LMG laboratory at Gent University. After a genomic DNA extraction according to a modified Wilson protocol (Wilson, 1987), hybridizations were performed in microplates at 40°C (Ezaki et al., 1989) and DNA relatedness values (%) reported were the means of a minimum of 6 hybridizations.

2.1.3. Bacteria phenotypic characterization (10 isolates)

The phenotypes of the selected isolates were characterized in different ways. Bacteria growth on TCBS medium (AES Chemunex), chromIDTM Vibrio medium (Biomérieux) and CHROMagarTM Vibrio medium (CHROMagar) was observed. The capacity of bacteria to grow in Zobell broth with 8 and 10% NaCl at 22°C was determined and the ability of bacteria to grow on Zobell agar at 40°C was established.

Antibiograms were carried out using disc diffusion assays on Mueller-Hinton agar (Oxoid) with commercial impregnated discs (Oxoid): Flumequine 30 µg (UB30), Kanamycin 30 µg (K30), Tetracycline 30 µg (TE30), Sulphamethoxazole/trimethoprim 19:1 25 µg (SXT25), Streptomycin 25 µg (S25), Sulphonamides 300 µg (S3), Erythromycin 30 µg (E30), Penicillin 10 UI (6 µg) (P10), Trimethoprim 5 µg (W5), Chloramphenicol 30 µg (C30), Ampicillin 10 µg (AMP10), Gentamicin 30 µg (CN30) or the Vibriostatic agent, Pteridine 150 µg and 10 µg (O129/150 and O129/10). Inhibition was observed after 24 to 48h at 22°C on Zobell agar. API 20E, API 20NE and API 50CH (Biomérieux) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Fresh colonies, obtained from culture bacteria on TSA (DifcoTM) adjusted to 2% NaCl, were suspended in SASW to obtain about OD₆₀₀ = 0.1.

After inoculation, the strips were incubated for 48 h at 22 °C and the results were determined according to the manufacturer's instructions.

2.2. Pathogenicity assays

2.2.1. Bacterial virulence tests (7 isolates)

Bacteria (07/038 2T2, 07/110 T1, 07/112 T1, 07/120 T1, 07/119 T1, 07/118 T2 and 04/002 1T2) were grown at 22 °C for 20 h in marine broth with constant shaking at 40 rpm (Rotator SB3; Stuart). The bacterial concentrations in the cultures were evaluated spectrophotometrically at an optical density (OD) of 600 nm and checked by plating. The cells were centrifuged at $3,200 \times g$ for 10 min, the supernatant discarded and the resulting pellet resuspended in SASW to obtain an OD_{600 nm} of 1. Ten to twelve-month-old oyster spat were anesthetized for 1 to 2 hours at 22 °C in a magnesium chloride solution (MgCl₂, Fluka) at a final concentration of 50 g l^{-1} (1/4: v/v seawater/freshwater) and under aeration. Subsequently, 100 µl of bacterial suspension (10^7 cfu per oyster) was injected into the adductor muscle. A group of oysters were injected with SASW to serve as negative controls. After injection, the oysters were transferred to tanks (triplicates of 10 oysters in 2 liters) filled with UV-treated and 1 µm-filtered seawater at 3.1‰ salinity and maintained under static conditions at 22 °C with aeration. Mortality was monitored twice a day and any newly dead oysters were removed from the tanks over a four day period. Animals were considered to be dead when the valves did not close following stimulation.

2.2.2. Toxicity and characterization of ECPs from the *V. tubiashii* 07/118 T2

Bacterial extracellular products (ECPs) from 07/118 T2 were produced in two types of culture medium, plate agar and liquid medium. For culture in liquid medium: bacteria were grown on Luria-Bertani (Difco™) medium supplemented with 1% sodium chloride (LBS-1% NaCl). Briefly 100 µl of a pre-culture of bacteria (OD₆₀₀ of 1) was cultured in 100 ml of LBS medium in a 500 ml Erlenmeyer flask at 22°C with constant shaking at 100 rpm (Aquatron, INFORS HT). After 24 h of incubation, ECPs were obtained by centrifugation at $3,000 \times g$ for 40 min at 4°C. The supernatant containing the ECPs was filtered at 0.22 µm and then concentrated by lyophilisation. The concentrated sample was resuspended in Tris-HCl buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) and dialyzed against distilled water in the first step for 12h and against Tris-HCl buffer for 12h in the second step. Finally, the samples were stored at -80°C until use. For culture on solid medium: ECPs were produced using the cellophane plate

technique described by Liu (1957). A volume of 1 ml of exponential phase culture in LBS (OD_{600} of 1, 22°C for 18 h) was spread on a sterile cellophane film overlying LBS agar (LBSA) plates. After 48 h of culture at 22°C, the cells were washed off the cellophane using 10 ml of cold SASW and removed by centrifugation at $3,000 \times g$ (45 min at 4°C). The supernatant containing the ECPs was then treated in the same way as the ECPs from liquid media.

The toxicity of both ECPs was tested as follows: a volume of 100 μ l of ECP solution, adjusted in Tris-HCl buffer to a concentration of 5 μ g g^{-1} of soft body weight, was injected into the adductor muscle of ten to twelve month-old oyster spat after anesthetizing them (see above). A group of oysters used as controls were injected with SASW and Tris-HCl buffer. Mortality was monitored twice a day and any newly dead oysters were removed from the tanks. ECPs proteins concentration was determined using the method described by Bradford (using Bradford Reagent, from Sigma -Aldrich) with bovine albumin serum as a standard (Sigma-Aldrich).

The proteolytic activity was determined using azocasein (Sigma-Aldrich) as a substrate according to the method of Teo et al (2003) with some modifications. Briefly, 100 μ l of a suitable dilution of ECP solution (1/10 v/v) was added to 100 μ l of azocasein (5 mg ml^{-1} in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). The mixture was incubated at 22°C for 2 h in darkness and stirred constantly. The reaction was stopped by adding 200 μ l of 10% trichloroacetic acid. The mixture was centrifuged at $12,000 \times g$ for 10 min and 50 μ l of the supernatant was added to 50 μ l of 1M NaOH in 96 well plates (Nunc/Thermo Scientific). The absorbance was measured at 440 nm in a microplate reader (Molecular Devices). One unit of azocaseinase activity was defined as the amount of crude ECPs that caused an increase of 0.01 absorbance unit after a 2 h incubation at 22°C.

The stability of the proteolytic activity was determined by incubating ECPs from LBSA for 24 h and 48 h at 22°C without substrate. After the preincubation, the azocaseinase activity was measured according to the protocol described previously.

The effect of 1,10-phenantroline on proteolytic activity was examined. Stock solutions of 1,10-phenantroline (Sigma-Aldrich) were dissolved in a small volume of absolute ethanol (until total solubilization) and adjusted to the appropriate concentration with Tris-HCl buffer. Briefly, 25 μ l of inhibitor, diluted to the appropriate concentrations, was pre-incubated with 25 μ l of ECPs for 30 min at 22°C and the proteolytic activity was then measured (see above). Residual azocaseinase activity was calculated on the basis of assays run in the absence of inhibitor.

2.3. Quantitative real-time PCR diagnostic tool (07/118 T2 and 07/112 T2)

2.3.1. Diagnostic tool development (2 isolates)

Oligonucleotide sequences were derived from the sequence alignment of the *gyrB* (DNA gyrase B subunit, basic replication machinery) gene in different *Vibrio* species, including the *V. tubiashii* type strain and the sequence obtained from the 07/118 T2 and 07/112 T2 strains with the primers listed in supplementary Table 1. Primer 3 software <http://frodo.wi.mit.edu/> was used to design a real-time PCR probe (Table S1) and forward and reverse PCR primers. The probe consists of an oligonucleotide dually labeled with a 5'-reporter dye and the downstream 3'-quencher dye indicated Table S1 (Eurogentec). The probe and primers were assessed for species specificity using a BLAST search to determine homology to known sequences.

A Real-time PCR assay was conducted on MX3000 and MX3005 Thermocyclers (Agilent) using Brilliant III Ultrafast kit (Stratagene). Each reaction was run in duplicate in a final volume of 20 μ l containing various concentrations of a DNA sample (5 μ l), 200 nM of each primer and 200 nM of oligonucleotidic probe. The thermal cycle was performed with a two-step PCR protocol: 1 cycle at 95 °C for 3 min followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60°C for 20 s. Fluorescence intensity was expressed in delta reporters (dR) after background subtraction. The threshold was set using an amplification based algorithm from the MX3000-3005 software (Stratagene) for the initial plate. Amplicons were sequenced to check primers specificity. Serial dilutions were performed on genomic DNA extracts quantified by spectrophotometry (Nanodrop/Thermo Scientific) and adjusted to 10^8 bacteria/ml = 1.05 ng/ μ l (for the 5,353 kbp *V. tubiashii* genome).

2.3.2. Screening on DNA isolated from mollusks

Zoosanitary monitoring was performed by the REPAMO network (REseau de PATHologie des MOllusques) between 2003 and 2012. During this period 254 batches of animal samples were collected from abnormal mortality episodes affecting *Crassostrea gigas* oysters, *Haliotis tuberculata* abalone, *Venerupis philippinarum* clams and *Pecten maximus* scallops. Samples from 49 of these batches were analyzed in this work. They were selected to provide a range of origin (hatchery/field), year of sampling, age and ploidy of the animals. The isolation of dominant bacteria was carried out between 2003 and 2012 on animals that were moribund on their arrival in the laboratory. Total DNA from infected animals was

systematically extracted between 2003 and 2012. Depending on mollusk species and the age of the animals, different tissues were sampled in sterile conditions for bacteriological analysis: haemolymph was taken for each oyster or abalone; a piece of adductor muscle, gill and mantle mixed together for each scallop; and a mixture of five mantles from individual clams. All these tissues were prepared using five individuals or five pools of animals from each batch, and in each case this corresponded either to an all-adult or all-juvenile age class. Haemolymph was drawn into a syringe from the adductor muscle or pericardial cavity of oysters and from the pericardial cavity of abalone using a 23-gauge needle. Tissues from scallop and clams were homogenized in 100 µl of SASW with a sterile pellet-pestle (Sigma) for 1 minute on average. For larvae and early spat stages (shell size smaller than 3 cm in length), several whole animals were taken and disrupted in SASW as a single pool of individuals for each batch sample.

Bacterial DNA from a log-phase culture was extracted from cultured *Vibrio* either by boiling in 200 µl of ultra pure water (Saulnier et al., 2009) or using the standard QIAmp DNA mini kit (Qiagen) procedure. After extracting DNA according to the manufacturer's instructions, the pelleted DNAs were resuspended in 100 µl of AE buffer and stored at -20°C. DNA yield and purity were determined by spectrophotometry (Nanodrop/Thermo Scientific). DNA from the crushed tissues of mollusk was extracted using a similar QIAmp DNA mini kit (Qiagen) method.

3. Results

3.1 Genetic and biochemical characterization of bacterial strains isolated in 2004 and 2007

Bacterial strains were isolated during the period in which the REPAMO surveillance network reported high levels of mollusk mortalities in hatcheries. In 2007, in an experimental hatchery/nursery in France, nine batches of spat oyster (either diploids or triploids) experienced heavy mortalities. Nine predominant bacterial strains were isolated from these batches on TCBS plates (Table 1). After isolation, the bacteria appeared small (1-2 mm), opaque, regular, white to cream-colored on marine agar and yellow on TCBS after 48 h at 20°C.

Table 1: Bacterial strains used and their sources, as well as QPCR *gyrB* assays for the different *Vibrio* species. QPCR were performed twice on 5 µl of boiled bacteria or on 25 ng of genomic DNA.

Strains	Source and date of isolation	QPCR results (+/-)
<i>Vibrio</i> sp. = <i>V. tubiashii</i>		
04/002 1T2	Diseased spat abalone (<i>Haliotis tuberculata</i>), Cotentin, France, January 2004	+
07/038 2T2	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, June 2007	+
07/108 T1	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/110 T1	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/112 T1	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/116 T1	Diseased triploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/117 T1	Diseased triploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/118 T2	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/119 T1	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
07/120 T1	Diseased diploid spat oysters, (<i>Crassostrea gigas</i>), Ronce les Bains, France, August 2007	+
<i>V. tubiashii</i>		
LMG 10936T	Hardclam (<i>Mercenaria mercenaria</i>), moribund larvae, Milford, USA	+
LMG 11229	Moribund juvenile oyster (<i>Crassostrea virginica</i>), Milford, USA	+
LMG 16851	Sea bream, Greece	+
<i>V. brasiliensis</i>		
LMG 20546T	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>), Brazil	-
<i>V. coralliilyticus</i>		
DSMZ 19607T	Diseased coral (<i>Pocillopora damicornis</i>), Indian Ocean near Zanzibar	-
<i>V. hepatarius</i>		
LMG 20362T	<i>Litopenaeus vannamei</i> , Manglaralto, Ecuador	-

<i>V. neptunius</i>		
LMG 20536T	Bivalve larvae (<i>Nodipecten nodosus</i>), Brazil	-
<i>V. nereis</i>		
LMG 3895T	Seawater enriched with propanol, Hawaii, United States	-
<i>V. orientalis</i>		
LMG 7897T	Seawater, Yello sea, China	-
<i>V. tasmaniensis</i>		
LMG 20012T	Atlantic salmon (<i>Salmosalar</i>), Tasmania Australia	ND
<i>V. xuii</i>		
DSMZ 17185T	Shrimp culture water, China	-

ND: not done

Initial phylogenetic analyses based on the 16S rRNA gene sequence of these strains led to their classification in the *V. harveyi* group (Saulnier *et al.*, 2010). One other strain from the French REPAMO bacterial collection (04/002 1T2 = LMG 27885 = CECT 8427) had a similar 16S rRNA gene sequence (more than 99.8% mutual 16S rRNA gene sequence similarity) and was added to the other analyses.

A multilocus sequence analysis based on the conserved genes 16S rRNA, *ftsZ*, *topA*, *pyrH* and *recA* confirmed the tight grouping of these isolates. They were most closely related to the *V. tubiashii* LMG10936 type strain but appeared in a distinct cluster as revealed by the high bootstrap value of 100 (Fig. 1). Phylogenetic analysis with the maximum parsimony or the neighbor joining algorithms produced congruent results revealing the reliability of the obtained phylogenetic tree (Not shown). Similarities between the *V. tubiashii* type strain LMG10936 and the novel isolates were 97-97.5% for 16S rDNA, 98-99% for *ftsZ*, 92-96% for *topA*, and 91-97% for *pyrH* and for *recA* (sequences alignment is presented in Supplementary Table 4).

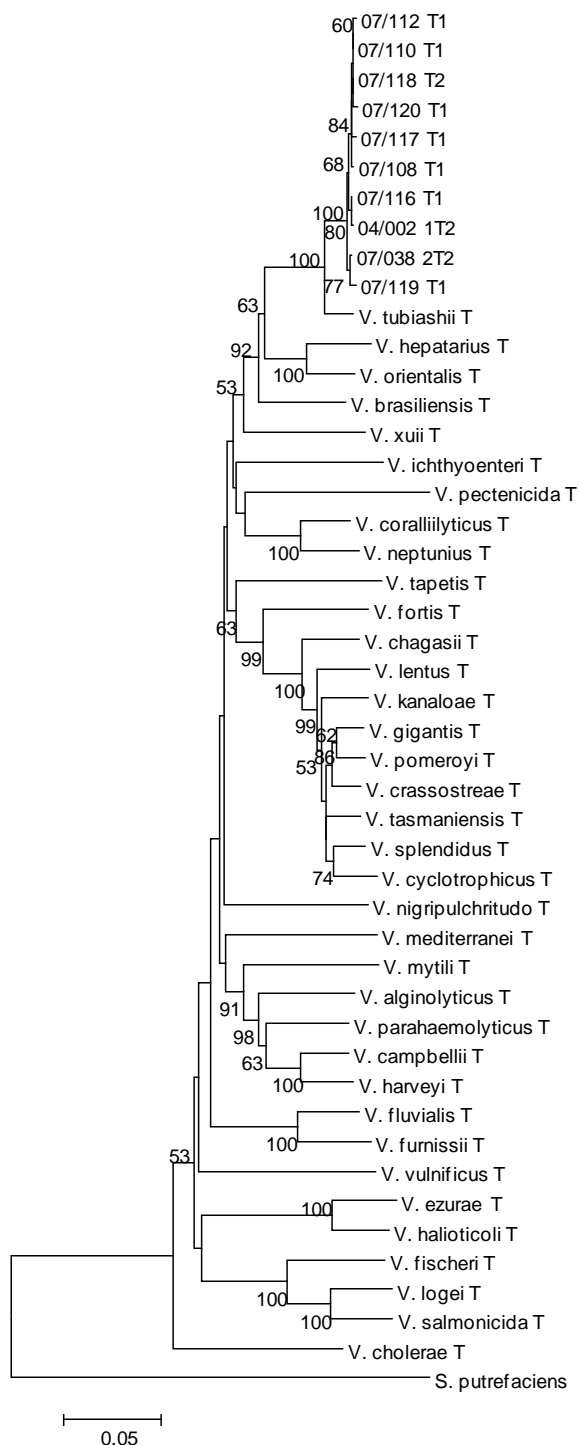


Figure 1: Neighbor-joining phylogenetic tree showing the phylogenetic position of *V. tubiashii* strains, based on concatenated *16S rRNA*, *ftsZ*, *pyrH*, *recA* and *topA* gene sequences (2307 bp). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4. The optimal tree with the sum of branch length = 2.23671430 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. Nodes without a number are of low significance (<50%).

The *recA* gene showed the highest resolution for differentiating *V. tubiashii* related strains. Phylogenetic analysis of this gene provides strong evidence that the French isolates form a distinct group from the North American ones (Fig. 2), presenting nucleotidic sequence similarities around 94-95% (sequences alignment is presented in Supplementary Table 5).

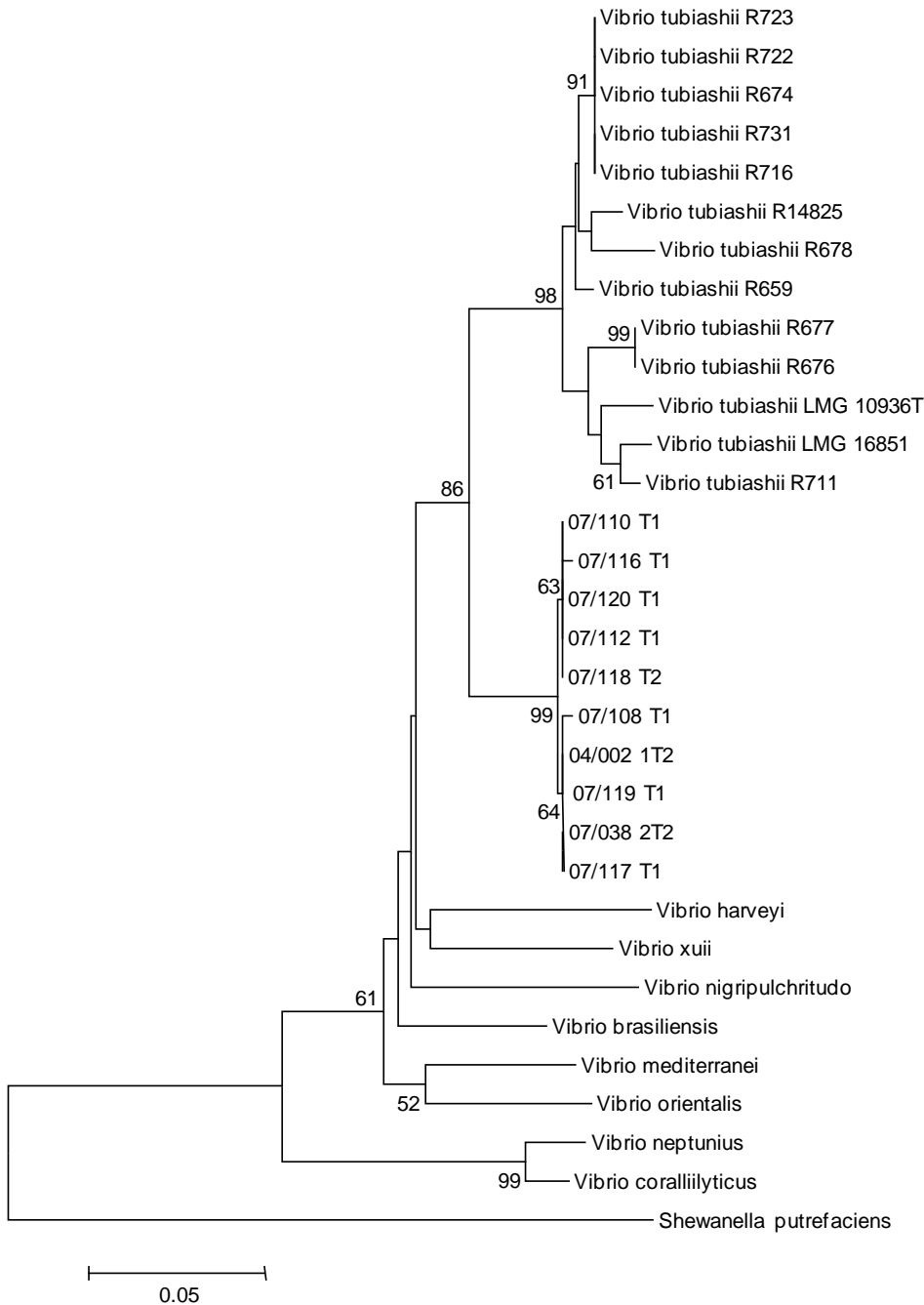


Figure 2: Neighbor-joining phylogenetic tree showing the phylogenetic position of *V. tubiashii* strains, based on *recA* sequences (357 bp). Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4. The optimal tree with the sum of branch length = 1.103893013 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. Nodes without a number are of low significance (<50%).

This classification was confirmed by DNA-DNA hybridization (DDH) of two of the strains that were isolated from diseased oysters in 2007 or diseased abalone in 2004 (Table 2). DDH between the novel isolates 07/118 T2 (= LMG 27884= CECT 8426) and 04/002 1T2 (= LMG 27885 = CECT 8427) indicated 86% genomic similarity, confirming that they belong to the same species. The isolates 07/118 T2 and 04/002 1T2 had 69% DNA-DNA relatedness with the *V. tubiashii* type strain LMG 10936T, which is just under the border value accepted for the delineation of prokaryotic species (Wayne et al., 1987).

Table 2: DNA-DNA hybridizations

The DNA-DNA relatedness percentages are the mean of minimum 6 hybridization assays. The values given between brackets are the differences between the reciprocal values.

	<i>Vibrio sp.</i> 04/002 1T2 LMG 27885	<i>Vibrio sp.</i> 07/118 T2 LMG 27884	<i>V. tubiashii</i> LMG 10936T	<i>V. hepatarius</i> LMG 20362T
<i>Vibrio sp.</i> 04/002 1T2 LMG 27885	100			
<i>Vibrio sp.</i> 07/118 T2 LMG 27884	86 (11)	100		
<i>V. tubiashii</i> LMG 10936T	69 (12)	69 (13)	100	
<i>V. hepatarius</i> LMG 20362T	21 (4)	22 (3)	24 (10)	100

Additional tests such as biochemical characterization, temperature, salinity tolerance and antibiotic sensitivity were performed to decide whether to allocate the strains to the *V. tubiashii* species or to a new species.

Of the 31 parameters measured, only two majoritary traits differed (but inconsistently according to the used strains) between the other *V. tubiashii* related strains and our strains (acid production from citrate and cellobiose), clearly demonstrating the relatedness with the *V. tubiashii* species (Table 3). All our isolates were positive for cellobiose utilization while this character appeared variable for *V. tubiashii* strains (Hada et al., 1984). Conversely, citrate utilization is a variable characteristic of our isolates (7 positive / 10 tested strains). Moreover, our strains were able to produce acid from melibiose, which is one of the specific characteristics of *V. tubiashii*.

Table 3: Phenotypic characteristics of *Vibrio* sp. isolated from *C. gigas* Traits were determined using API20E, API20NE and API50CH, and standard growth assays under various culture conditions (NaCl, temperature, and presence of an antibiotic). Symbols are: +: positive; -: negative. For the ten French isolates of *V. tubiashii* tested (column 1) and for the three *V. tubiashii* (column 2: LMG 10936T, LMG 11229 and LMG 16851), dominant traits are indicated and traits which differ among isolates are given in parentheses. UB30: Flumequine 30 µg, E30: Erythromycin 30 µg, C30: Chloramphenicol 30 µg, CN30: Gentamicin 30 µg, K30: Kanamycin 30 µg, TE30: Tetracycline 30 µg, SXT25: Sulphamethoxazole/trimethoprim 19:1 25 µg, S25: Streptomycin 25 µg, S3: Sulphonamides 300 µg, W5: Trimethoprim 5 µg, O129/150 and O129/10: *vibrio* static agent, pteridine 150 µg and 10 µg, respectively, P10: Penicillin 10 UI (6 µg), AMP10: Ampicillin 10 µg.

	<i>Vibrio</i> sp. = <i>V. tubiashii</i>	<i>V. tubiashii</i>	<i>V. hepatarius</i> LMG 20362T	<i>V. xuii</i> DSMZ 17185T	<i>V. neptunius</i> LMG 20536T	<i>V. orientalis</i> LMG 7897T	<i>V. brasiliensis</i> DSMZ 17184T	<i>V. nereis</i> LMG 3895T	<i>V. coralliilyticus</i> DSMZ 19607T
Growth in NaCl at									
8% (w/v)	- (+)	-	+	+	+	-	+	+	+
10% (w/v)	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Growth at									
40°C	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Antibiotic sensitivity									
UB30	+(-)	+	+	+	+	+	+	+	+
E30, C30, CN30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K30, TE30, SXT25, S25, S3, W5, O129/150, O129/10	+	+	+	-	+	+	+	+	+
P10, AMP10	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Acid production from									
L-arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Salicin	- (+)	-	-	-	-	-	+	-	-
Cellobiose	+	- (+)	+	+	-	+	+	-	-
Melibiose	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+(-)	-	+	+	+	-	+	-	+
Presence of									
β--galactosidase (ONPG)	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Arginine Dihydrolase	+	+(-)	+	+	-	-	+	+	-
Lysine Decarboxylase	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Gelatinase	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Galactosidase	+	+	+	-	-	+	+	-	+
Production of									
Indole	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Nitrate	+	+	+	+	-	+	+	+	+

In conclusion, with 69% DNA-DNA relatedness with *V. tubiashii* type strains, two phenotypic variables differences revealed by majoritary trait analysis and distinct grouping by MLST analysis, our isolates should be considered as *V. tubiashii* and not as a new species.

3.2 Pathogenicity assays

The pathogenicity of seven French isolates (07/038 2T2, 07/110 T1, 07/112 T1, 07/120 T1, 07/119 T1, 07/118 T2 and 04/002 1T2) was investigated by experimental infections that also included a non virulent strain, LMG20012T (Fig. 3). One year-old oysters were intramuscularly injected with these bacterial suspensions used at the same concentration. After 24 h, cumulative mortalities were comprised between 36.7% and 83.3% indicating that these seven isolates had different degrees of virulence. 07/110 T1, 07/038 2T2, 07/120 T1 and 07/118 T2 were the most virulent and caused more than 60% mortality after 24h. 07/112 T1, 07/119 T1 and 04/002 1T2 caused less than 60% mortality at 24 h but all the isolates induced more than 60% mortality after 3 days. In some moribund oysters, several predominant bacterial isolates were obtained in muscle and haemolymph tissues. All bacterial isolates were found to belong to *V. tubiashii* species using our *gyrB*-QPCR diagnosis assay.

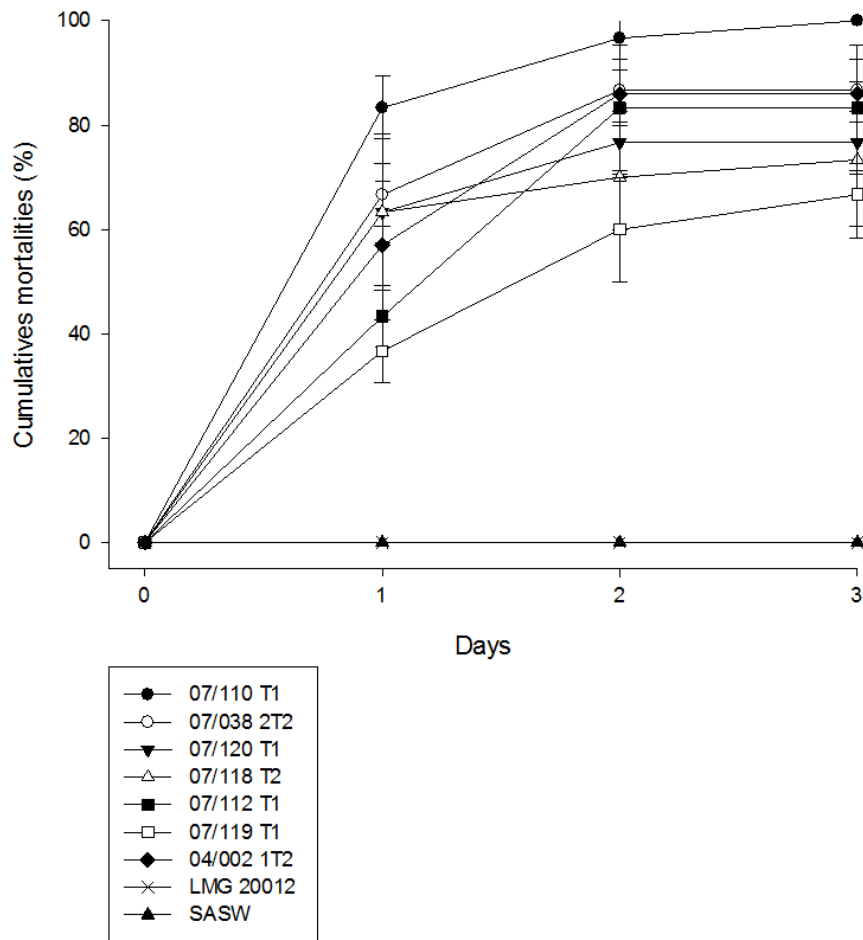


Figure 3: Cumulative mortalities recorded during experimental infections performed on ten to twelve-month-old oyster spat.

Bacterial strains were grown for 24 h in Zobell broth before resuspension into artificial and sterile seawater (SASW) and DO₆₀₀ adjustment to 1. 100µl of bacterial suspension were injected into anesthetized oysters. The control corresponds to the injection in similar conditions of sterile SASW (▲) or injection of non virulent *V. tasmaniensis* LMG20012 (×) adjusted to DO₆₀₀=1. Seven strains of *V. tubiashii* were tested (07/038 2T2, 07/110 T1, 07/112 T1, 07/118 T2, 07/119 T1, 07/120 T1 and 04/002 1T2). Standard deviations are represented by bars (n=3 biological replicates).

In parallel, the toxicity of ECPs from 07/118 T2 produced on agar plates (LBSA) and in liquid medium (LBS) was tested by experimental infections. A mortality of 41% was observed two days after injecting oysters with ECPs produced on LBSA (Fig. 4A). However, no mortality was detected with ECPs produced in LBS. Similarly, no mortality of control oysters was observed during the experiments with Tris-HCl buffer or SASW.

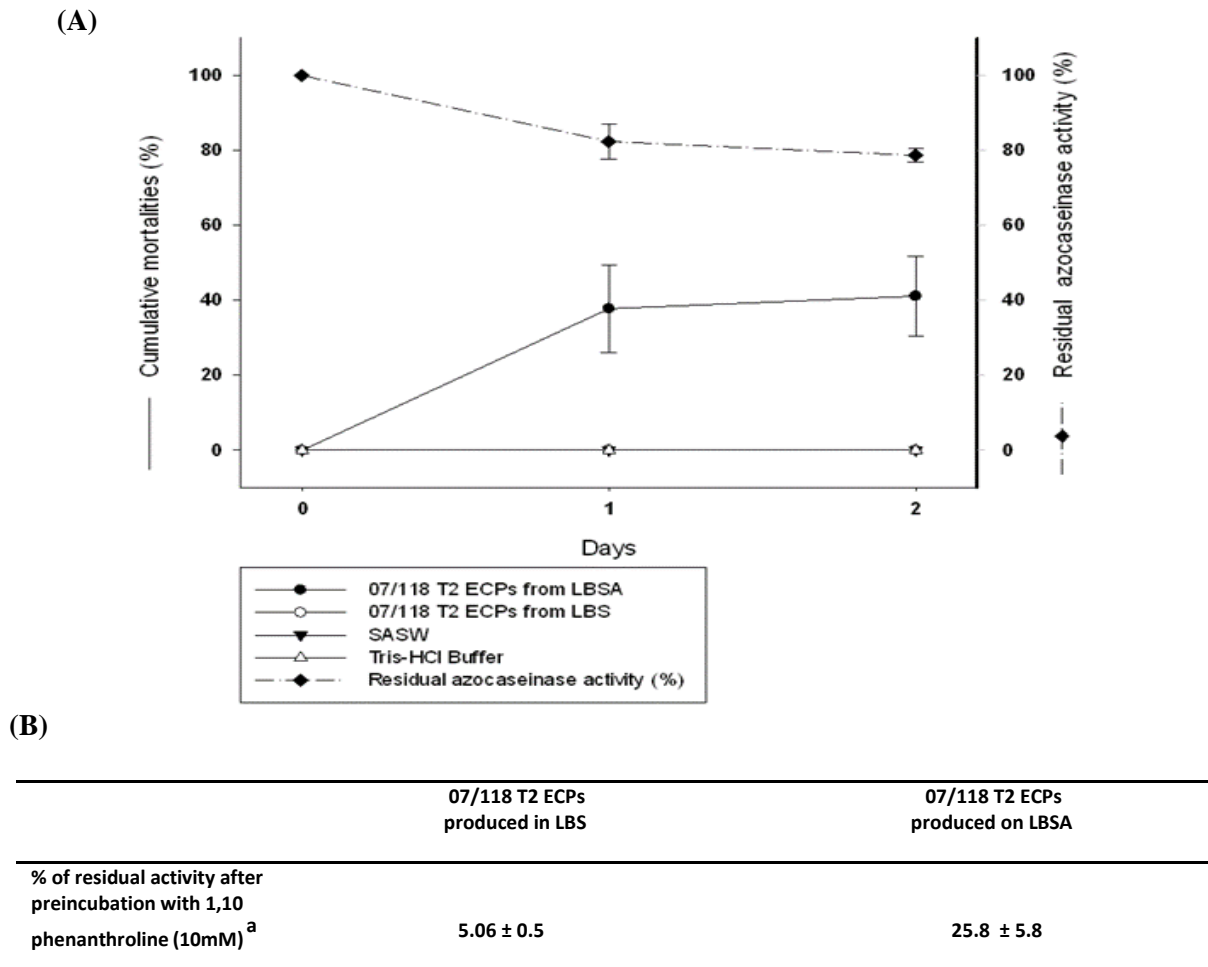


Figure 4: (A) Cumulative mortalities of juvenile oysters following intramuscular injection of *V. tubiashii* (07/118 T2= LMG 27884= CECT 8426) ECPs produced on LBSA and LBS medium and *in vitro* stability of protease activity (azocaseinase activity). The primary axis corresponds to cumulative mortalities recorded during experimental infections performed on juvenile oysters after injection of 07/118 T2 ECPs produced in LBS and on LBSA medium (solid curves). 100 µl of ECPs (5µg g⁻¹ of proteins) were injected into anesthetized oysters. The control corresponds to the injection in similar condition of artificial and sterile seawater (SASW) and Tris- HCl buffer (50 mM pH 8).The secondary axis corresponds to the stability of protease activity measured *in vitro* (dashed line curve). 100 µl of 07/118T2 ECPs produced on LBSA were incubated at 22°C for two days. The azocaseinase activity (after 24 h and 48 h) was measured using an azocasein assay. Standard deviations are represented by bars (n=2 biological replicates).

(B) Effect of one metalloprotease inhibitor on azocaseinase activity of 07/118 T2 ECPs produced on LBSA and LBS medium.^a Final concentration of the inhibitor in the assay mixture.

3.3 Characterization of proteolytic activity of 07/118 T2 ECPs

The proteolytic activity of ECPs from 07/118 T2 (in liquid and solid medium) was severely reduced by metalloprotease inhibitor (1, 10-phenanthroline), with residual activities of 5% and 25% for ECPs produced on LBS and LBSA, respectively (Fig. 4B). For the

stability of ECPs produced on LBSA, 80% of the protease activities was maintained 48 hours post- incubation at 22°C (Fig. 4A).

3.4 Development of a QPCR assay and hatchery- and field-samples screening

The gene encoding gyrase B (*gyrB*) in the 07/112 T2 and 07/118 T2 strains was sequenced (KF270490 and KF270491 respectively). After sequence alignments with the *V. tubiashii* type strain and closely related strains (*V. hepatarius*, *V. orientalis*, *V. brasiliensis*, *V. coralliilyticus*, *V. neptunius*, *V harveyi* and *V. xuii*), species-specific (*gyrB*) primers and probes were designed. The *gyrB* primers and probes were designed to amplify all *V. tubiashii* isolates.

The concentration of the primers and probes was optimized at 200 nM. Using these conditions, excellent real time PCR efficiencies were obtained by 10-fold dilutions of 07/118 T2 and *V. tubiashii* type strain DNAs, 99.2 % and 96.3 % respectively (Fig. S1). Finally, the specificity was investigated on different bacterial DNA extracts (Table 1). Among 20 tested strains including 7 type strains belonging to different *Vibrio* species, only all tested *V. tubiashii* strains (n=13, including the type strain) were found positive. By considering Ct above cycle 38, our QPCR assay appeared to be specific and able to detect more than 10³ bacteria/ml (Fig. S1).

Using this new diagnostic tool, the French LNR hatchery and field DNA collection were screened. These DNA were extracted from oysters tissues sampled in a context of declared mortalities analyzed by the REPAMO network. Of the 49 batches of animals (379 samples), only DNA from two batches were positive with the *V. tubiashii* diagnostic tool. These batches came from two different French hatcheries (2 positive batches from the 21 analysed) (Table S2). On the 28 batches of moribund animals from the field collection, all were negative for the presence of *V. tubiashii* DNA.

4. Discussion

The aims of the present study were (1) to fine-tune the taxonomic affiliation of virulent strains collected during an episode of high level *Crassostrea gigas* mortality in France using a polyphasic approach (phenotypic and genotypic characterization); (2) to evaluate both their virulence and the toxicity of their extracellular products; and (3) to investigate the geographical distribution of these bacteria.

The strains used in this study were isolated from an experimental hatchery/nursery in France in 2007, during a period of heavy oyster mortalities, under the auspices of the French institutional surveillance network, REPAMO.

Hatchery systems provide ideal conditions for the growth of larvae and bacteria multiplication (density, temperature, organic matter load, etc.) (Prado et al., 2005). Furthermore, farmed animals are monitored daily, allowing precise observations of mortality and investigations into pathogens. Hatcheries are therefore ideal places for the isolation of bacteria and the description of new bacterial species (Sugumar et al., 1998; Estes et al., 2004; Gay et al., 2004; Labreuche et al., 2006b; Elston et al., 2008).

For mollusks pathogens, the investigation of the pathogenic potential of a particular strain is still in its infancy due to the absence of animal models, cloned or knock-out animals for *in vivo* studies, or the availability of culture cell lines for *in vitro* assays. Furthermore, the virulence of *Vibrio* species is known to involve many virulence factors and different pathways (Shinoda & Miyoshi, 2011) and there is a lack of standardized *in vitro* protocols for virulence phenotype characterization.

In an *in vivo* assay, bacteria can be injected into animal muscle (injection (Gay et al., 2004), put into seawater surrounding the animals after a culture phase (immersion or bath challenge (Travers et al., 2008; De Decker et al., 2011)), or transmitted by cohabitation challenges (De Decker & Saulnier, 2011). Even if they rely on the injection of large quantities of cultured bacteria, bypass the penetration step and consequently the first lines of defense, injection protocols are still the most reproducible and widely-used methodology for initial *Vibrio* challenges (Labreuche et al., 2006a; Gagnaire et al., 2007; Garnier et al., 2007; Williams et al., 2009). In this study, this protocol was applied to our isolated strains and allows the demonstration of the high degree of virulence of the strains into oyster tissues (between 36.7 and 83.3% of mortality as soon as 24 hours post-injection) of mortality as soon as 24 hours post-injection. This mortality rate is comparable to the one induced by other *Vibrio* species when used at same dose that the present study: *V. aestuarianus* (02/041)

induced 62.5% of mortality eight days post-infection (Labreuche et al., 2006b) and the co-infection of a mix of two *Vibrio* (*V. splendidus* LGP 32 and *V. aestuarianus* 02/041) gave a mean mortality rate of 88.9% five days post-infection (De Decker and Saulnier, 2011).

After isolating the bacteria and demonstrating their high level of virulence, a precise classification was needed. Initial identification of strains isolated in 2007, based on partial 16S rRNA analysis, led to the affiliation of these strains to the *V. harveyi* species (Saulnier et al., 2010). It is difficult to classify them as part of the *Vibrio* clades, and particularly the *V. harveyi* clade, based on 16S rRNA analysis. A reliable classification needs to be supported by sequence analyses of multiple housekeeping genes (Thompson et al., 2005). Here, this analysis with 16S rRNA, *ftsZ*, *topA*, *pyrH* and *recA* showed a tight grouping of 07/118 T2 with other French isolates and close to the *V. tubiashii* type strain, but clearly distinct from *V. tubiashii* group. This was confirmed by the DNA-DNA hybridization of two selected strains (04/002 1T2 and 07/118 T2) and phenotypic characterization based on 31 different parameters (salt, temperature and antibiotic sensitivity, sugar utilization, enzymatic activities). Although DNA-DNA hybridization with the *V. tubiashii* type strain was below 70% (69%), as biochemical assays do not allow a clear distinction between our isolates and the *V. tubiashii* strains, we propose to affiliate the 07/118 T2 (LMG 27884 = CECT 8426T) strain and other proximate isolates to a group belonging to the *V. tubiashii* species.

V. tubiashii, misclassified until 1984, was first implicated in bivalve mortalities on the east coast of the United States (Tubiash et al., 1965; Tubiash et al., 1970; Hada et al., 1984). In the eighties, in England, three virulent isolates of *V. tubiashii* were described that were pathogenic for *C. gigas* and *Ostrea edulis* larvae (Jeffries, 1982). More recently, in 2006 and 2007, some *V. tubiashii* strains were detected on the north American Pacific coast that caused a serious loss of hatchery production (Estes et al., 2004; Elston et al., 2008). The associated disease was characterized by a rapid appearance of symptoms resulting in reduced larval motility and necrosis in extensive soft tissue.

It is important to note that our isolates are close but clearly separated to those from the USA. Interestingly, a strain isolated during a mortality episode of *Haliotis tuberculata* abalone (Normandy, 2004; 04/002 1T2 = LMG 27885 = CECT 8427) clusters with other french *V. tubiashii*. *V. tubiashii* has therefore been present in France since at least 2004. This strain can also induce high mortality in *C. gigas* oysters after intramuscular injection. In contrast to work on other *Vibrio* demonstrating a specific virulence for their natural hosts (Saulnier et al., 2000; Travers et al., 2009), one *V. tubiashii* virulent strain seems to affect

both oysters and abalone, even if virulence has not yet experimentally demonstrated on abalone.

Vibrio tubiashii is a pathogen that is known to affect hatchery and nursery production and cause serious financial losses. Specific and sensitive detection tools are therefore necessary. A previously described, real time PCR assay targeting the *V. tubiashii* *vtpA* gene (Gharaibeh et al., 2009) was tested but we encountered specificity issues (data not shown). Taqman real time PCR based on the *dnaJ* sequence has also been used to detect and quantify *V. aestuarianus* (Saulnier et al., 2009). This technique is sensitive, rapid and reproducible, irrespective of the nature of the sample (seawater or oyster homogenate samples). In this paper, a taqman real time PCR diagnostic tool was developed to investigate the distribution of *V. tubiashii* in France and its potential implication in mollusk mortalities. Based on the hypothesis that a pathogen implicated in a mortality event is present in high amounts, a cut-off was fixed in our QPCR assay to ensure specificity rather than sensitivity. In spite of this, using these protocols we could detect as little as 10^3 bacteria/ ml, allowing a reliable detection of this pathogen.

The production of extracellular enzymes such as proteases by pathogenic *Vibrio* has been widely observed (Shinoda and Miyoshi, 2011). These proteases, which are often from the family of zinc metalloproteases, are known to be one of the most toxic factors to the host (Delston et al., 2003; Teo et al., 2003; Binesse et al., 2008; Hasegawa et al., 2008; Labreuche et al., 2010), particularly for *V. tubiashii*. Hasegawa et al. (2008) showed that *V. tubiashii* ECPs were toxic to *C. gigas* larvae, and identified virulence factors in these ECPs: the metalloprotease *VtpA* and the hemolysin *VthA*.

Besides the infection of oysters by french *V. tubiashii*, ECPs from the 07/118 T2 strain produced either from plate agar or from liquid medium were tested for toxicity on oysters by experimental injection.

The stability test showed that 80% of protease activity is maintained after 48 h pointing out its potential role in the infection process and the colonization step in particular since metalloproteases are known to degrade the extracellular matrix of a variety of host and tissues even if we cannot exclude the existence of other virulence factors also acting. Interestingly, only ECPs from culture on agar plates (LBSA) showed toxicity. However, differences in protease composition and quantity produced could be suggested, supported by the differential effect of a specific inhibitor such as 1,10-phenanthroline on residual protease activity. This type of difference in bacterial protein composition after culture in liquid or solid medium has been reported previously (Cheung & Fischetti, 1988; McCarter & Silverman,

1990). Culture on solid medium favors biofilm formation and microenvironments that can influence bacterial metabolite production (Cheung and Fischetti, 1988). Bacterial adherence is an important step in local multiplication and infection. Lorian proposed that *in vitro* systems providing a solid support surface for the growth of bacteria reflect more accurately *in vivo* conditions (Lorian, 1989). The toxicity of *V. tubiashii* ECPs produced only on agar plates may indicate the importance of adherence in *V. tubiashii* virulence factor production and in consequence in the infection cycle.

It should be noticed that protease activity was only characterized by testing azocasein as a non-specific substrate, as already reported in other studies, and this was completed using inhibitor assays. A more specific cocktail of inhibitors and substrates should be developed to obtain a more precise composition of the ECPs protease.

The French survey network allows the isolation of dominant strains from haemolymph or tissue samples, but also the conservation of bacteria in cryoprotectant as well as bacterial DNA. With the support of the LNR (National Reference Laboratory for mollusk disease), we were able to screen the different bacterial isolates and also the DNA library, thus avoiding the isolation biases (only the predominant strains isolated on TCBS at 20°C are conserved).

A *gyrB* gene was the target of the screening and primers were designed to amplify DNA from all strains belonging to *V. tubiashii* species. Using this approach, we detected *V. tubiashii* DNA in a strain isolated during 2 episodes of hatchery mortality in 2008. This strain was also isolated in 10 hatchery batches affected by mortalities, 9 from 2007 and 1 from 2004. In conclusion, we have evidence of the presence of high amounts of *V. tubiashii* during 12 episodes of mortality in French hatcheries since 2004. None of the field samples tested revealed for instance the presence of such high amounts of *V. tubiashii*.

5. Conclusions

Based on their biochemical and genetic characterization, nine predominant bacterial strains, isolated from a French experimental hatchery/nursery during mortalities events, were classified as a novel group belonging to *V. tubiashii* species. Two reference strains, isolated from diseased abalone and diseased oysters in 2004 and 2007, respectively, were described for this group. The significant pathogenicity of different isolates and the toxicity of the extracellular products of 07/118 T2 were confirmed by experimental challenge. Further studies will be required to complete our knowledge on the pathogenic factors secreted by these strains of *V. tubiashii* and their mechanisms of action.

Acknowledgements

This study was supported by a Ph.D grant from the CNRS and IFREMER for R. Mersni-Achour (2010-2013). The PRES (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur) of Limousin Poitou-Charentes and the FR CNRS 3097 «Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable» are acknowledged for financial support through the research project «Caractérisation *in vitro* des effets de métalloprotéases sur différents types cellulaires de l'huître creuse *C. gigas*».

References

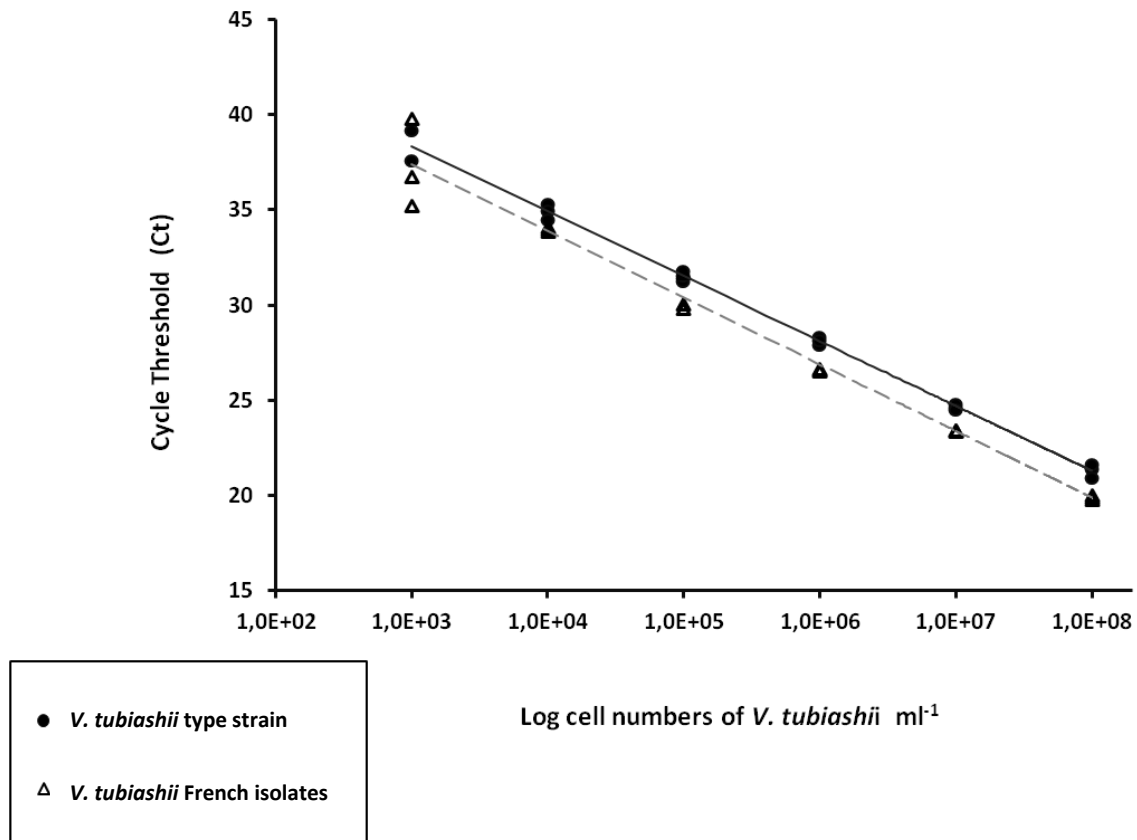
- Aguirre-Guzman, G., Ascencio, F., Saulnier, D., 2005. Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* or white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Diseases of Aquatic Organisms*. 67, 201-207.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L., Figueras, M. J., 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*. 2, 34-43.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Verges, M. C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, I., et al., 2008. Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 7108-7117.
- Bower, S. M., Hervio, D., Meyer, G. R., 1997. Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Diseases of Aquatic Organism*. 29, 111-116.
- Cheung, A. L., Fischetti, V. A., 1988. Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. *Infect Immun*. 56, 1061-5.
- De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S., Boudry, P., 2011. Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106, 179-191.
- De Decker, S., Saulnier, D., 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 691-699.
- Delston, R. B., Kothary, M. H., Shangraw, K. A., Tall, B. D., 2003. Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Canadian Journal of Microbiology*. 49, 525-529.
- Eck, R. V., Dayhoff, M. O., 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation.
- Elston, R. A., Hasegawa, H., Humphrey, K. L., Polyak, I. K., Hase, C. C., 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*. 82, 119-134.
- Estes, R. M., Friedman, C. S., Elston, R. A., Herwig, R. P., 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 58, 223-30.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E., 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, 224-229.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J. Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic toxicology*. 84, 92-102.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M., Nicolas, J. L., 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology*. 53, 173-186.

- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J. L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*. 31, 358-65.
- Gay, M., Berthe, F. C., Le Roux, F., 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 59, 49-56.
- Gharaibeh, D. N., Hasegawa, H., Hase, C. C., 2009. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Vibrio tubiashii* targeting the metalloprotease gene. *Journal of Microbiological Methods*. 76, 262-268.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L., et al., 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 150, 1769-77.
- Hada, H. S., West, P. A., Lee, J. V., Stemmler, J., Colwell, R. R., 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov. a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34, 1-4.
- Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A., Hase, C. C., 2008. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 4101-4110.
- Hoffmann, M., Monday, S. r., Fischer, M., Brown, E. w., 2012. Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the *Harveyi* clade. *Letters in applied Microbiology*. 54, 160-165.
- Jeffries, V. E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 29, 201-226.
- Kothary, M. H., Delston, R. B., Curtis, S. K., McCardell, B. A., Tall, B. D., 2001. Purification and Characterization of a Vulnificolysin-Like Cytolysin Produced by *Vibrio tubiashii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 3707-3711.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006a. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes and Infection*. 8, 2715-2724.
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., et al., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish & Shellfish Immunology*. 29, 753-758.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J., 2006b. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*. 30, 367-379.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., et al., 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46, 139-145.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., et al., 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. 15, 251-258.
- Liu, P. V., 1957. Survey of hemolysin production among species of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infection and Immunity*. 74, 718-727.
- Lorian, V., 1989. *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the culture medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 27, 2403-6.

- McCarter, L., Silverman, M., 1990. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*. 4, 1057-62.
- Meyers, J. A., Bureson, E. M., Barber, B. J., Mann, R., 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*. 10, 433-437.
- Prado, S., Romalde, J., Montes, J., Barja, J. L., 2005. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen *Diseases of Aquatic Organisms*. 67, 209-215.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N., Maffart, P., 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue Médicale Vétérinaire*. 145, 735-742.
- Romalde, J. L., Barja, J. L., 2010. Bacteria in molluscs: good and bad guys. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 1, 136-147.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406-25.
- Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., et al., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268, 227-243.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods*. 77, 191-197.
- Saulnier, D., De Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M., Garcia, C., 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial Ecology*. 59, 787-798.
- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*. 191, 133-144.
- Segarra, A., Pepin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*. 153, 92-9.
- Shinoda, S., Miyoshi, S., 2011. Proteases produced by vibrios. *Biocontrol Sci*. 16, 1-11.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D., Muroga, K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae *Diseases of Aquatic Organisms*. 33, 111-118.
- Teo, J. W. P., Zhang, L.-H., Poh, C. L., 2003. Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene*. 303, 147-156.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, N., Hoste, B., et al., 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 5107-5115.
- Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T., Sawabe, T., 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Appl Environmental Microbiology*. 73, 4279-85.
- Travers, M. A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C., 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., Le Bouffant, R., Friedman, C. S., Buzin, F., Cougard, B., Huchette, S., et al., 2009. Pathogenic *Vibrio harveyi*, in contrast to non-pathogenic strains, intervenes with the p38 MAPK pathway to avoid an abalone haemocyte immune response. *Journal of Cellular Biochemistry*. 106, 152-160.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E., Leifson, E., 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology*. 90, 1036-1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R., Sakazaki, R., 1970. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of Bacteriology*. 103, 272-273.
- Tun, K. L., Itoh, N., Shimizu, Y., Yamanoi, H., Yoshinaga, T., Ogawa, K., 2008. Pathogenicity of the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *International Journal for Parasitology*. 38, 211-217.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., et al., 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 463-464.
- Williams, H. R., Macey, B. M., Burnett, L. E., Burnett, K. G., 2009. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrio campbellii* among tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Developmental and Comparative Immunology*. 33, 592-600.
- Wilson, K., Preparation of genomic DNA from bacteria. In: F. M. Ausubel, et al., (Eds.), *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987, pp. 2.4.1-2.4.5.

Supplementary data



Supplementary Fig. S1. QPCR *gyrB* diagnostic tool

Standard curves for *V. tubiashii* type strain and French isolates using QPCR in 10 fold dilutions of genomic DNA. Standard curves were generated by plotting the threshold cycle (Ct) versus the log cell number of bacteria value. Each plot corresponds to the individual values of Ct obtained from a representative experiment of all experiments performed independently. The linear regression represented by the solid line, was obtained by collectively treating all the data of *V. tubiashii* with an r^2 of 0.996 and a PCR reaction efficacy of 96.3%. The linear regression represented by the dotted line was obtained by collectively treating all the data of *V. tubiashii* with an r^2 of 0.988 and a PCR reaction efficacy of 99.2%.

Supplementary Table 1: Primers used for DNA sequencing and QPCR development

Gene	Primers	Sequence	Annealing temperature	Amplicon size (bp)	Application
16s rRNA	SAdir S17rev	AGAGTTTGATCATGGCTCAGA GTTACCTTGTTACGACTT	50 °C	1 500	
<i>ftsZ</i>	VftsZ75F VftsZ800R	GCTGTTGAACACATGGTACG GCACCAGCAAGATCGATATC	50 °C	750	
<i>pyrH</i>	VpyrH80F VpyrH530R	GATCGTATGGCTCAAGAAG TAGGCATTTTGTGGTCACG	50°C	450	PCR amplification and sequencing (Thompson et al., 2007)
<i>topA</i>	VtopA400F VtopA1200R	GAGATCATCGGTGGTGATG GAAGGACGAATCGCTTCGTG	50°C	800	
<i>recA</i>	VrecA130F VrecA720R	GTCTACCAATGGGTCGTATC GCCATTGTAGCTGTACCAAG	50°C	600	
<i>gyrB</i>	VgyrB274F VgyrB1171R	GAAGTTATCATGACGGTACTTC CCTTACGACGAGTCATTTTC	55°C	900	
<i>gyrB</i>	gyrB94F gyrB296R gyrBprobe203	TTGGTGAATCTGAGCAAACG CGCTTGGATACCACCTTCAT TCTGGCCAAGTGAAGAGACA (5'Rox - 3'BHQ-2)	60°C	202	

Supplementary Table 2: QPCR diagnostics (detection of *V. tubiashii* with *gyrB* taqman assay) performed on DNA extracts from oyster tissues sampled during mortality events (REPAMO network). QPCR were performed on 25 ng of total DNA and considered as positive when Ct values were greater than 36. Batch names (sampling year / sampling number) and origin are indicated in the first columns.

Batch	Origin	Number of positive samples (<i>V. tubiashii</i>)
2008/011	Hatchery/nursery	0/2
2008/062	Hatchery/nursery	0/20
2008/082	Hatchery/nursery	0/4
2008/104	Hatchery/nursery	1/1
2008/105	Hatchery/nursery	0/5
2008/110	Hatchery/nursery	0/5
2008/132	Hatchery/nursery	1/6
2008/139	Hatchery/nursery	0/6
2008/165	Hatchery/nursery	0/3
2008/166	Hatchery/nursery	0/3
2009/051	Hatchery/nursery	0/3
2009/052	Hatchery/nursery	0/3
2009/066	Hatchery/nursery	0/6
2009/067	Hatchery/nursery	0/2
2009/109	Hatchery/nursery	0/11
2009/143	Hatchery/nursery	0/2
2010/080	Hatchery/nursery	0/1
2010/125	Hatchery/nursery	0/2
2011/009	Hatchery/nursery	0/4
2011/010	Hatchery/nursery	0/4
2011/176	Hatchery/nursery	0/6
2008/076	Field – juveniles 3n	0/10
2008/077	Field – juveniles 3n	0/10
2008/075	Field – juveniles 3n	0/10
2008/102	Field – adults 2n	0/10
2008/080	Field – spat 3n	0/10
2008/081	Field – juveniles 2n	0/10
2008/090	Field – juveniles 3n	0/10
2008/092	Field – spat 2n	0/10

2008/093	Field – spat 3n	0/10
2008/098	Field – juveniles 2n	0/10
2008/097	Field – juveniles 2n	0/10
2008/085	Field – spat 3n	0/10
2008/086	Field – juveniles 2n	0/10
2008/087	Field – spat 3n	0/10
2008/088	Field – spat 2n	0/10
2008/096	Field – juveniles 3n	0/10
2008/089	Field – spat 2n	0/10
2008/091	Field – juveniles 3n	0/10
2008/074	Field – juveniles 3n	0/10
2008/079	Field – spat 2n	0/10
2008/083	Field – juveniles 2n	0/10
2008/084	Field – spat 2n	0/10
2008/108	Field – spat 2n	0/10
2012/080	Field - adults	0/10
2012/112	Field - adults	0/10
2012/067	Field - adults	0/10
2012/099	Field - adults	0/10
2012/114	Field - adults	0/10

Supplementary Table 3: Genbank accession numbers

	16s rDNA	ftsZ	pyrH	topA	recA	gyrB
<i>V. alginolyticus</i> LMG 4409T	X74690	EF027344	JN408273	DQ907472	AJ842373	
<i>V. brasiliensis</i> LMG20546T	AJ316172	DQ907335	HQ452398	DQ907473	HM771379	HM771364
<i>V. campbelli</i> LMG11216T	X56575	DQ907337	EF596641	DQ907475	EF596670	
<i>V. chagasii</i> LMG21353T	AJ316199	DQ996590	EU118252	DQ481649	AJ580874	
<i>V. cholerae</i> CECT 514T	X74695	HE805627	FM202582	HE805631	FM204835	
<i>V. coralliilyticus</i> LMG20984T	AJ440005	DQ907341	GU266292	EF114213	JN039156	AB298210
<i>V. crassostreae</i> LMG22240T	AJ582808	DQ481624	EU871948	DQ481650	EU541594	
<i>V. cyclitrophicus</i> LMG21359T	U57919	DQ481625	EU871958	DQ481651	AJ842405	
<i>V. ezurae</i> LMG19970T	AY426980	DQ907343	EU871949	DQ907481	AJ842413	
<i>V. fisheri</i> LMG4414T	X70640	DQ907344	EU185914	DQ907482	AJ842417	
<i>V. fluvialis</i> LMG7894T	X74703	DQ907345	JN426808	DQ907483	AJ580892	
<i>V. fortis</i> LMG 21557T	AJ514916	DQ907346	EU251629	DQ907484	AJ842422	
<i>V. furnisii</i> LMG 7910T	X74704	EF027345	JF316672	DQ907485	AJ842427	
<i>V. gigantis</i> LMG22741T	AJ582810	DQ481629	EU871951	DQ481655	EU541593	
<i>V. haliotocoli</i> LMG18542T	AB000390	DQ907349	EU871952	DQ907487	AJ842430	
<i>V. harveyi</i> LMG4044T	X74706	DQ907350	EU118238	DQ907488	EF596430	EF596215
<i>V. hepatarius</i> LMG20362T	AJ345063	DQ907352	JF316674	DQ907491	AJ842444	AB298222
<i>V. ichthyoenteri</i> LMG19664T	AJ437192	DQ907354	HM771375	DQ907493	AJ842446	
<i>V. kanaloae</i> LMG20539T	AJ316193	DQ481631	FN908851	DQ481657	AJ842450	
<i>V. lentus</i> LMG21034T	AM162659	DQ914234	EU871959	DQ914237	AJ842452	
<i>V. logei</i> LMG21012T	AJ437616	DQ907355	EF380234	DQ907494	AJ842457	
<i>V. mediterranei</i> LMG11258T	HM771351	DQ907356	GU266288	DQ907495	AJ842459	
<i>V. mytili</i> LMG19157T	X99761	DQ907358	GU266287	DQ907499	AJ842472	
<i>V. neptunius</i> LMG20536T	AJ316171	DQ907361	GU266291	DQ907503	AJ842478	AB298234
<i>V. nigripulchritudo</i> LMG3896T	X74717	EF027347	GU266290	DQ907505	AJ842480	
<i>V. orientalis</i> LMG7897T	X74719	DQ907365	EU118243	DQ907507	AJ842485	EF380260
<i>V. parahaemolyticus</i> LMG2850T	X74720	DQ907367	GU266286	DQ907509	AJ842490	
<i>V. pectenecida</i> LMG19642T	Y13830	DQ907368	JN039143	DQ907510	AJ842491	
<i>V. pomeroyi</i> LMG20357T	AJ491290	DQ481634	EU871960	DQ481660	AJ842497	
<i>V. salmonicida</i> NCIMB2262T	X70643	DQ907375	EU118245	DQ907517	EF380243	
<i>V. splendidus</i> LMG19031T	X74724	DQ481635	EU118241	DQ481661	AJ842511	
<i>V. tapetis</i> LMG19706T	Y08430	DQ907379	HE795189	DQ907520	AJ842514	
<i>V. tasmaniensis</i> LMG20012T	AJ514912	DQ481636	EU871961	DQ481662	AJ842515	
<i>V. tubiashii</i> LMG10936T	X74725	DQ907381	JF316670	DQ907521	AJ842518	
<i>V. vulnificus</i> LMG13545T	X76333	DQ907382	GQ382226	DQ907522	AJ580890	
<i>V. xiii</i> LMG21346T	AJ316181	DQ907384	GU266284	DQ907524	AJ842529	AB298254

	AF136269	NC_00943	NC_00943	NC_00943	NC_00943	
		8	8	8	8	
3. <i>S. putrefaciens</i> CN-32		(493799- 494392)	(1531099- 1531836)	(2590448- 2593090)	(3182123- 3183196)	
<i>V. tubiashii</i>						
04/002 1T2 (=LMG 27884T = CECT 8426)	KF270470	KF270480	KF270492	KF270460	KF270502	
07/038 T1	KF270471	KF270481	KF270493	KF270461	KF270503	
07/108 T1	KF270472	KF270482	KF270494	KF270462	KF270504	
07/110 T1	KF270473	KF270483	KF270495	KF270463	KF270505	
07/112 T1	KF270474	KF270484	KF270496	KF270464	KF270506	KF270490
07/116 T1	KF270475	KF270485	KF270497	KF270465	KF270507	
07/117 T1	KF270476	KF270486	KF270498	KF270466	KF270508	
07/118 T2 (=LMG 27884T = CECT 8426)	KF270477	KF270487	KF270499	KF270467	KF270509	KF270491
07/119 T1	KF270478	KF270488	KF270500	KF270468	KF270510	
07/120 T1	KF270479	KF270489	KF270501	KF270469	KF270511	
<i>V. tubiashii</i>						
LMG16851						AJ842520
R659						EU717015
R674						EU717030
R676						EU717031
R677						EU717032
R678						EU717033
R711						EU717060
R716						EU717064
R722						EU717068
R723						EU717069
R731						EU717073
R14825						AJ842522

A2: Caractérisation des protéases secrétées par la souche française *V. tubiashii* affectant les fonctions immunitaires de l'huître creuse *C. gigas*

Les bactéries du genre *Vibrio* ont la capacité de produire divers facteurs de virulence impliqués dans leur pathogénicité spécifique. Ces facteurs incluent les protéases, les entérotoxines, les cytolysines, les sidérophores, les facteurs d'adhésion, et les hémagglutinines (Shinoda, 2005). Les protéases sont considérées parmi les acteurs principaux de la virulence avec une majorité appartenant à la famille des métalloprotéases (Shinoda *et al.*, 1996; Shinoda & Miyoshi, 2011). Concernant la souche américaine *V. tubiashii*, diverses études ont montré que cette bactérie sécrète des toxines extracellulaires avec des activités de type protéolytiques et hémolytiques (Kothary *et al.*, 2001; Delston *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2008).

Dans l'objectif de caractériser et d'évaluer la toxicité du surnageant bactérien de la souche française *V. tubiashii* (07/118 T2), des analyses *in vitro* ont été réalisées sur quelques fonctions immunitaires de l'huître. En parallèle, une identification moléculaire des ECPs de la souche 07/118 T2 a été effectuée par spectrométrie de masse et complétée par une caractérisation fonctionnelle des activités hydrolytiques. L'ensemble de ces résultats est regroupé dans l'article 2.

Les analyses des fonctions immunitaires de l'huître nous ont permis de démontrer que la capacité d'adhérence (28 % d'inhibition) et le pouvoir phagocytaire (56 % d'inhibition) étaient les deux fonctions hémocytaires les plus affectées par les ECPs de la souche 07/118 T2. Également, les ECPs ont montré une capacité de dégrader différents substrats impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire tels que l'actine, la fibronectine et le collagène. Ainsi, les anomalies hémocytaires observées pourraient s'expliquer par le pouvoir hydrolytique des ECPs induisant de probables altérations morphologiques de leur cytosquelette. L'analyse globale du surnageant bactérien par SDS-PAGE et zymographie a montré un profil électrophorétique assez complexe et une large gamme d'activités protéolytiques.

L'analyse plus fine des ECPs par nanoLC-Orbitrap a révélé la présence d'une «extracellular zinc metalloprotease» de GI: 343500312. Afin de caractériser cette métalloprotéase sécrétée par la souche française *V. tubiashii*, une approche de biologie moléculaire a été développée. L'amplification et le séquençage du gène codant pour la métalloprotéase, en utilisant des amorces élaborées à partir du génome complet du *V. tubiashii* ATCC 19109_25 (GI=343500308) ont confirmé la présence du gène codant pour cette protéine avec un cadre de lecture ouvert de 1821 pb codant un polypeptide de 606 aa. Des motifs spécifiques caractérisant la famille des thermolysines ainsi que des sites de glycosylations et de phosphorylations ont été prédites. La prédominance d'une activité métalloprotéasique dans les ECPs de la souche 07/118 T2, a été confirmée par des essais enzymatiques avec un ensemble d'inhibiteurs et d'ions métalliques tout en utilisant un substrat spécifique (ADAM substrat) et un substrat général de toute activité protéolytique (azocaséine).

Les résultats obtenus font l'objet d'un deuxième article actuellement sous révision dans «Journal of Invertebrate pathology», 2014.

**Article II: FIRST DESCRIPTION OF FRENCH *V. TUBIASHII* STRAINS
PATHOGENIC TO MOLLUSK**

**II. CHARACTERIZATION OF PROPERTIES OF THE PROTEOLYTIC
FRACTION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS**

Under revision in “Journal of invertebrate pathology”

Mersni-Achour Rachida^{1,2,6}, Imbert Nathalie³, Huet Valérie³, Ben Cheikh Yosra¹, Faury Nicole², Doghri Ibtissem¹, Rouatbi Sonia³, Bordenave Stéphanie¹, Travers Marie-Agnès², Saulnier Denis^{2,5}, Fruitier-Arnaudin Ingrid^{1,6}

¹UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

²Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

³UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs, Equipe Animaux MARins à la variabilité Environnementale, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

⁴LIENSs, UMR 6250, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

⁵Ifremer, Centre Ifremer du Pacifique, UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniens, Tahiti, 98719 Taravao, French Polynesia.

⁶Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable, FR CNRS 3097, Université de La Rochelle, France.

Abstract

Extracellular products (ECPs) of the French *V. tubiashii* strain 07/118 T2 were previously reported to be toxic for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In this study we now assessed host cellular immune responses and bacterial potential effectors by which these ECPs can be associated with host damages.

The adhesion capacity (28% inhibition) and phagocytosis ability (56% inhibition) of oyster hemocytes were the main functions affected following *in vitro* contact between hemocytes and *V. tubiashii* ECPs. This may be linked to the demonstration of the capability of ECPs to cleave various cellular substrates as oyster collagen.

Moreover, a strong metalloproteolytic activity was recorded with general (azocasein) and specific (ADAM) substrates and characterized by the use of standard inhibitors and metal ions. The addition of 1, 10-phenanthroline and Zn^{2+} decreased proteolytic activity by about 80% and 50% respectively, confirming the presence of zinc metalloproteolytic activity in the ECPs. Mass spectrometry analyses of crude ECPs identified an extracellular zinc metalloprotease encoded by a gene with an open reading frame of 1821 bp (606 aa). Consensus zinc-binding motifs specific to thermolysin family and some glycosylation and phosphorylation sites were located on the deduced protein sequence.

Even if taken together, our results let us wonder if this (these) zinc metalloprotease(s) could be involved in the impairment of hemocyte immunological functions, the direct implication of this (these) protein(s) in ECPs toxicity still has to be demonstrated.

Keywords: ECPs; Oyster immune responses; Thermolysin- metalloprotease; Mass spectroscopy; ADAM substrate; *Vibrio*

1. Introduction

Vibriosis is economically the most important bacterial disease affecting several species of marine organisms, at all its life stages, in their natural habitat and especially in aquaculture systems. Among these species, *V. tubiashii* is one of the main causative agents of larval and juvenile bivalve mollusc mortalities in hatcheries. *Vibrio tubiashii*, originally found in American seas (Elston et al., 2008; Hada et al., 1984; Tubiash et al., 1970, 1965), after in England (Jeffries, 1982), later in Spain (Lodeiros et al., 1987) and recently in France (Travers et al., 2014) is considered as the causative agent of bacillary necrosis affecting early life stages of molluscan bivalves of the hard clam and the oyster. This disease is characterized by a reduction in larval motility and necrosis in extensive soft tissue (Elston et al., 2008; Estes et al., 2004; Tubiash et al., 1965).

Usually, during infection steps, various bacterial adhesion factors are expressed to allow the contact with the host cell that is necessary for the secretion of effectors and toxin proteins (Broberg et al., 2011). Some secreted factors are also involved in bacterial penetration, i.e. host tissue lysis. These secreted toxins factors are often designated as extracellular products (ECPs) and are typically composed of various proteins that possess cytotoxic, cytolytic and immunosuppressive activities such as enterotoxins, hemolysins, cytotoxins, lipases, adhesive agents, exopolysaccharide, siderophores and proteases (Shinoda and Miyoshi, 2011; Travis et al., 1995). Various studies on virulent *V. tubiashii* strains have shown that these bacteria secrete extracellular toxins with proteolytic and hemolytic activities (Delston et al., 2003; Kothary et al., 2001).

Bacterial proteases are generally described as one of the most toxic factors to the host, constantly implicated in virulence and pathogenicity (Shinoda et al., 1996). Many toxic proteases are zinc-dependent metalloproteases (Miyoshi and Shinoda, 2000a)

In a recent study, different bacterial isolates from diseased abalone (*Haliotis tuberculata*) and oysters (*C. gigas*) spat in a French experimental hatchery/nursery during mortalities events between 2004 and 2008, was identified as belonging to *V. tubiashii* species. As we had previously demonstrated the virulence of *V. tubiashii* 07/118 T2 and the toxicity of their ECPs on juvenile oysters (Travers et al., 2014), in this study we now assessed host cellular immune responses and bacterial potential effectors by which these ECPs can be associated with host damages. The main objective of this work was to achieve a biochemical and molecular identification of these toxic ECPs coupled with the evaluation of their

biological activities by (1) the identification of exoproteolytic fraction using electrophoretic, enzymatic, molecular and mass spectrometry analyses, (2) the determination of the effect of ECPs on the cellular immune response of the oyster.

2. Materials and methods

2.1 Materials

All reagents, unless otherwise specified, were purchased from Sigma Aldrich[®] (St Quentin Falavier, France). The ADAM substrate Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophe-Arg-Ser-Lys (5-FAM)-NH₂ was purchased from Enzo life Sciences[®] (USA) and was more than 95% pure. Sypro Ruby protein gel stain and molecular weight markers (Precision Plus Protein[™] Unstained Standards) were provided by BIO-RAD. Page Blue Protein Staining Solution and molecular weight markers (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder) were purchased from Thermo Scientific. The cellular probes (Propidium iodide, FluoSpheres red, Fluorescein Diacetate, Fluo-4, AM and LysoTracker Green DND-26) were provided by Life Technologies[™], and Molecular Probes[®]. For PCR, Taq polymerase mixes (Diamond Taq[®] DNA polymerase) were purchased from Eurogentec and dNTPs (dNTP Master Mix) from Euromedex.

2.2 Bacterial isolates and culture conditions

Vi

brío tubiashii 07/118 T2, isolated from moribund oysters during mollusk mortalities reported in hatcheries in France in 2007, was used in this study (Travers et al., 2014). Culture of 07/118 T2 was routinely performed in Luria-Bertani medium (Difco) supplemented with 1% sodium chloride (LBS-1% NaCl). Stock culture was stored at -80°C in LBS with glycerol 15% (v/v).

2.3 Preparation of extracellular products and estimation of protein concentration and profile

Extracellular products were produced using the cellophane overlay method as described previously by Travers et al. (2014). Briefly, bacteria were grown in 5 ml of LBS-1% NaCl at 22°C for 18h. A volume of 1 ml of exponential phase culture (OD₆₀₀ = 1) was spread on a sterile cellophane film overlying LBSA (LBS Agar) plates. After 48h of culture at 22°C, the cells were washed off the cellophane using 10 ml of cold sterile artificial sea water (SASW) and removed by centrifugation at 3,000 × g (45 min at 4°C). The supernatant was filtered at 0.22 μm, concentrated by lyophilisation, and then resuspended in Tris-HCl buffer

(50 mM Tris-HCl, pH 8) and dialyzed against distilled water for 12 h and Tris-HCl buffer for 12 h. Finally, the samples were stored at -80°C until use.

Proteins were quantified using the method described by Bradford (Bradford, 1976) with bovine serum as a standard albumin. Twenty micrograms of crude ECPs was analyzed on a 10% SDS-PAGE gel according to the method of Laemmli (Laemmli, 1970) and visualized by SYPRO Ruby staining (GelDocTM XR⁺ and ImageLabTM software, Biorad).

2.4 Biochemical characterization of proteolytic activity of ECPs

2.4.1 Electrophoretic analyses

Azocasein-gel zymography analysis was used to characterize proteolytic activity in the ECPs. One milliliter of a 5 mg/ml solution of azocasein, which had first been boiled for 20 min, was co-polymerized in 10% polyacrylamide gels for SDS-PAGE. Twenty micrograms of ECPs proteins were run under denaturing (SDS) and non-reducing conditions. After electrophoresis, the gel was washed with 2.5% Triton X-100 for 1 h. This step allows the exchange of the SDS with Triton, after which the proteases recover their activity. Subsequently, the gel was incubated for 2 h at 22°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8). Protein bands with azocaseinase activity were visualized after Coomassie blue staining of the gel.

SDS-PAGE was also used to demonstrate the digestive effect of crude ECPs on various types of protein substrates. Actin from bovine muscle, fibronectin from bovine plasma and collagen from oyster muscle were obtained from twenty *C. gigas* oysters using the method described by Mizuta et al. (Mizuta et al., 2005). Based on the method of Lee et al. (Lee et al., 2003), about 20 µg of each substrate dissolved in 20 µl of 50 mM Tris-HCl pH 8 was added to 5 µg of ECPs (10 µl). After a 48 h of incubation at 22°C, the reactions were stopped by adding cold 10% trichloroacetic acid (v/v) and the samples centrifuged at 12,000×g for 10 min. The supernatants were analyzed by SDS-PAGE using the Laemmli method (Laemmli, 1970) with 4% stacking gel and 10% resolving gel. All migrations were carried out at 170 V on a Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell unit (Bio-Rad) and the gel visualized by Coomassie blue staining (GelDocTM XR⁺ and ImageLabTM software, Biorad).

2.4.2 Effect of inhibitors and metal ions on azocaseinase activity

The proteolytic activity of ECPs from *V. tubiashii* 07/118 T2 was determined using azocasein as a substrate with a slightly modified version of the method developed by Teo et al. (Teo et al., 2003). Twenty five microliters of ECPs (initial protein concentration $C_i = 2.4$

µg/ml) and 25 µl of Tris-HCl buffer was added to 50 µl of azocasein (5 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 8). The mixture was incubated at 22°C for 13 min in darkness and stirred constantly. The reaction was stopped by adding 100 µl of 10% trichloroacetic acid (v/v). The mixture was centrifuged at 12,000 × g for 10 min and 50 µl of the supernatant was added to 50 µl of 1 M NaOH in 96 well plates (Nunc/Thermo Scientific). The optical density was measured at 440 nm in a microplate reader (Versamax, Molecular Devices).

The effect on protease activity of the following inhibitors was examined: 1,10-phenantroline (Zn⁺² specific chelator); ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (metal ion chelator); phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (serine protease inhibitor); and metal ions (MgSO₄, CaCl₂ and ZnCl₂). 1,10-phenantroline and PMSF were dissolved in a small volume of absolute ethanol (until total solubilization) and adjusted to the appropriate concentration with 50 mM Tris-HCl pH 8, whereas EDTA and the different metal ions were directly dissolved in Tris-HCl Buffer. Briefly, after the preincubation of 25 µl of each inhibitor at the appropriate concentration with 25 µl of ECPs at 22°C, a 50 µl of azocasein were added. All the mixtures were incubated at 22°C for 13 min and the reactions were terminated as described before. For two independent experiments, the residual protease activity was calculated as follows:

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{\Delta Do(+\text{inhibitors or ions})}{\Delta Do(\text{without inhibitors or ions})} \times 100$$

2.4.3 Effect of temperature and pH on azocaseinase activity

The effect of temperature on the azocaseinase activity of 07/118 T2 ECPs was examined using azocasein as a substrate and the same protocol as described previously. Briefly, in this case, azocasein-ECPs mixtures were incubated at 4°C, 15°C, 22°C, 30°C, 37°C, 57°C and 100°C. The samples were assayed in duplicate for each temperature.

The effect of pH on the protease activity of the ECPs was tested by an azocasein assay with the following modifications. Azocasein substrate (5 mg/ml) was dissolved in the appropriate pH buffer: Sodium acetate buffer (50 mM) for pH 3.7 and 4.6; Sodium MES buffer (50 mM) for pH 5.6 and 6; MOPS sodium buffer (50 mM) for pH 6.8 and 7.5; Tris-HCl buffer (50 mM) for pH 8, 8.5 and 9; and Tris Base (50 mM) for pH 11. Azocaseinase

activity was measured in duplicate for each pH as previously described. The activities were calculated relative to the reaction at which the maximal activity was taken as 100%.

$$\text{Relative activity (\%)} = \frac{\Delta Do (X)}{\Delta Do (\text{maximum activity})} \times 100$$

2.4.4 Metalloprotease activity assays with ADAM substrate

Metalloprotease activity was tested using the ADAM substrate (Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophe-Arg-Ser-Lys(5-FAM)-NH₂), supplied by Enzo[®] Life Sciences (Dabcyl=4-(4-dimethylaminophenylazo) benzoyl; FAM=carboxyfluorescein). The fluorescence intensity of the liberated FAM was measured in white 96 half well plates (Corning[®] #3693) using a BMG Labtech Fluostar Omega spectrofluorometer. The fluorescence was measured at $\lambda_{em}=485$ nm and $\lambda_{ex}=520$ nm. A stock solution of ADAM substrate at 6.5 mM was first prepared in pure DMSO and then adjusted to the appropriate concentration with Tris-HCl buffer.

The same inhibitors and metal ions were tested for their effect on metalloprotease activity as described previously. In a final volume of 100 μ l, 25 μ l of crude ECPs (2.4 μ g/ml) and 25 μ l of each inhibitor or metal ions at the appropriate concentration were incubated with 50 μ l of ADAM substrate at 10 μ M, close to the apparent Km ($K_{m,app}$) value determined in preliminary experiments (data not shown). The reaction was conducted at 22°C for 13 min (fluorescence was measured every 8 seconds). For each inhibitor or metal ion, two independent experiments were performed and the residual ECPs metalloprotease activity was calculated according to the initial slope (V_i) of the assays run without inhibitors or ions.

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{V_i(+\text{inhibitors or ions})}{V_i(\text{without inhibitors or ions})} \times 100$$

2.5 Effect of extracellular products on hemocytes responses

2.5.1 Hemolymph sampling

All experiments were performed using Pacific oysters (8-12 cm) from the same batch of oysters grown in Marennes Oléron (Establishments ROGER, Etaules). After reception, the oysters were stored at 4°C for a maximum of two days. Before the experiment, the oysters were well washed and immersed 30 s in ethanol (70°) to sanitize oyster and prevent hemolymph contamination during its extraction.

For each experiment, hemolymph from ten Pacific oysters was pooled for the flow cytometry analyses. For the extraction of hemolymph, a small notch was made in the dorsal side of the shell, adjacent to the adductor muscle. Using a 1 ml plastic syringe fitted with a 23 gauge needle, approximately 1.5 ml of whole hemolymph was withdrawn from the adductor muscle of individual oysters, filtered through 40 μm mesh and immediately placed in ice to minimize cell clumping. After collecting the hemolymph, the integrity and number of hemocytes was checked by light-microscopic observations on a Malassez hemocytometer.

2.5.2. Assays measuring hemocyte cellular parameters

The effect of ECPs on cell viability, phagocytosis, intra-cytoplasmic calcium, esterase activity, the presence of lysosomes and adhesion capacity was assessed by referring to the study described by Gagnaire et al. (Gagnaire et al., 2003).

Hemocytes were analysed with a BD Biosciences FACSCanto™ II flow cytometer and FACSDiva Software Version 6.1.3. For each test, 10 000 events were counted and the results were expressed as cell cytograms indicating cell size (FSC value: Forward Scatter Height), cell complexity (SSC value: Size Scatter Height) and the fluorescence channel(s) corresponding to the marker used.

For all tests, the osmolarity of the samples was set at 1,000 mosm/l to approximate seawater osmolality by the adding of an equivalent quantity of NaCl and after the osmolarity was checked using a cryoscopic osmometer (Roebbling).

For adhesion capacity, 150 μl of ECPs at a final protein concentration of 6 $\mu\text{g/ml}$ were added to 150 μl of hemolymph (approximately 80, 000 cell/well). After a 3h of incubation at 22°C, the cells were fixed by addition of 150 μl of formalin (6% v/v) (Labreuche et al., 2006a). The percentage of non adherent hemocytes was calculated relative to the initial total hemocytes count at t=0 min. SASW and Tris-HCl Buffer were used as a control.

For cell mortality, phagocytosis activity, esterase activity, the presence of lysosomes and intra-cytoplasmic calcium activity were tested at different times of incubation (1 h, 2 h, 4 h and 6 h). Briefly, for each activity, 100 μl of a hemocyte suspension were added to 100 μl of ECPs at a final concentration of 6 μg proteins per ml in flow cytometer tubes then incubated at 22°C under agitation in the dark, when specific probes were added. Cell mortality was quantified using 10 μl of propidium iodide (IP) at a concentration of 0.5 mg/ml. Phagocytosis was measured by ingestion of 10 μl of fluorescent beads (FluoSpheres® Carboxylate-

Modified Microspheres, 1.0 μm) diluted 1/10 with pure water. Esterase activity was evaluated by Fluorescein Diacetate substrate (FDA) and the presence of lysosomes was assayed with LysoTracker (LysoTracker[®] Green DND-26). For both analyses, the reaction was stopped after 5min by placing in ice. The detection of intracytoplasmic calcium was carried out with Fluo-4, AM (Fluo-4, AM, cell permeant, Molecular Probes[®]). For all tests, SASW and Tris-HCl Buffer were used as a control.

For esterase, lysosome and intracytoplasmic calcium, the percentage of cells with high enzymatic activities was defined on the basis of the most strongly fluorescent cells (percentage of cells showing the strongest fluorescence) among all cells.

2.6 Mass spectrometry analyses

Mass spectrometry analyses of ECPs from *V. tubiashii* 07/118 T2 were performed by the "Structural and Functional Mass Spectrometry Facility" in the JACQUES MONOD Institute (CNRS and Paris-Diderot University). ECPs were analyzed by a LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) coupled to an Easy nano-LC Proxeon system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Chromatographic separation of peptides was performed with the following parameters : column Easy Column Proxeon C18 (10 cm, 75 μm i.d., 120 \AA), 300 nl/min flow, gradient rising from 95% solvent A (water - 0,1% formic acid) to 25% solvent B (100 % acetonitrile, 0,1% formic acid) in 20 minutes, then to 45% with solvent B in 40 min and finally to 80% with solvent B in 10 min. Peptides were analyzed in the orbitrap in full ion scan mode at a resolution of 30, 000 and a mass range of 400-1800 m/z. Fragments were obtained with a collision-induced dissociation (CID) activation with a collisional energy of 40% and analyzed in the LTQ. MS/MS data were acquired in a data dependent mode in which 20 most intense precursor ions were isolated, with a dynamic exclusion of 15 s, an isolation width of 1 Dalton, an activation of 0.250 for 10 ms. Maximum injection time were set to 100 ms for MS and 50 ms for MS/MS analysis. Data were processed with Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fisher scientific, San Jose, CA) coupled to an in house Mascot search server (Matrix Science, Boston, MA; version 2.3.2). The mass tolerance of fragment ions was set to 10 ppm for precursor ions and 0.6 Dalton for fragments. The following modifications were used in variable modifications: oxidation (M), phosphorylations (STY). The maximum number of missed cleavages was limited to 2 for trypsin digestion. MS-MS data were searched against NCBI database and *V. tubiashii* ATCC 19109 genome NCBI database. Peptide validator node was used for False Discovery

Rate (FDR) determination and a 1 % threshold was used for the validation of peptide identification.

2.7 Sequencing of the metalloprotease gene, functional annotation and phylogenetic analysis

Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu>) was used to design PCR primers of the metalloprotease gene based on the *V. tubiashii* ATCC 19109_25 whole genome sequence (GI=343500308). After extraction of *V. tubiashii* 07/118 T2 DNA using the standard phenol/chloroform/isoamyl-alcohol method, genomic DNA was amplified using two couples of primers: metalloD F1 (CAACAACGTCATTTAAGCTGGA)/metalloD R2 (ACCGAAGTAGTGAGCGTCGT) and metalloD F2 (AGTGCAAGCTGGAAAATGCT)/metalloNc R1 (TACTCGTCGTTGGTTTGCTG). A PCR reaction was performed using Diamond Taq[®] DNA polymerase according to the manufacturer's instructions in a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). The PCR procedure was as follows: initial denaturation at 95°C for 3 min and 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 2 min at 72°C followed by an additional 10 min at 72°C.

The amplicons with the expected size were purified using an Amicon Ultra centrifugal filter from Millipore (30 kDa). The purified PCR products were mixed (final volume 10 µl) with 0.4 µl ABI Prism Big Dye Terminator ready reaction mix (Applied Biosystems) and 4 µM of primer. Cycle sequencing reactions were performed using a Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Separation of the DNA fragments was carried out in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequence data for the metalloprotease gene was submitted to the GenBank database under accession number AHG50771.

The metalloprotease sequence annotation was determined by ExPASy - PROSITE (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>), and NetPhosbac (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosBac/>). The signal peptide cleavage sites were predicted by the SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and the physical and chemical parameters by ExPASy ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>).

For *Vibrio* metalloprotease phylogenetic comparison, metalloprotease sequences were aligned using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and BioEdit software (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Afterwards, a phylogenetic tree was built using Mega6 software (Tamura et al., 2013) The tree was drawn using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). Reliability of topologies was assessed by the bootstrap method (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates. The Genbank accession numbers of *Vibrio* metalloproteases are presented in Supplementary Table 1.

Table S1: Genbank accession numbers *Vibrio* metalloprotease (NCBI)

Strain	Protein accession Number
<i>Vibrio aestuarianus</i>	AAU04777
<i>Vibrio anguillarum</i>	AAM15681
<i>Vibrio caribbenthicus</i> ATCC BAA-2122	EFP95808
<i>Vibrio cholerae</i> 623-39	ZP 01980763
<i>Vibrio coralliilyticus</i>	AFK08683
<i>Vibrio crassostreae</i>	WP 017063639
<i>Vibrio furnissii</i> CIP 102972	EEX39831
<i>Vibrio harveyi</i>	AAT68711
<i>Vibrio proteolyticus</i>	AAA27548
<i>Vibrio splendidus</i> LGP32	YP_ 002416881
<i>Vibrio tubiashii</i> [NCIMB 1337 = ATCC 19106]	EIF02000
<i>Vibrio tubiashii</i> [ATCC 19109 ^T]	EGU55378
<i>Vibrio tubiashii</i> 07/118 T2	AHG50771
<i>Vibrio tubiashii</i> RE22	ACD87449
<i>Vibrio tubiashii</i> RE22	ACS26168.
<i>Vibrio vulnificus</i>	AAC45343
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NP 626768.1

2.8 Statistical analysis

For each hemocyte activity assay, statistical analysis was performed using Xlstat software and <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. Technical replicates (n=3) were averaged and the values were tested for normality (Shapiro-Wilk). Data originating from three hemolymph pools from ten animals (N=3) were analyzed by a paired Friedman test.

3. Results

3.1 *V. tubiashii* secretes various proteins with digestive activities

Analysis of crude ECPs using SDS polyacrylamide gel electrophoresis revealed a rich protein profile (Fig. 1A). Several bands were detected with apparent molecular weights between 100 and 20 kDa, with three more intense bands estimated at 60 kDa, 41 kDa and 36 kDa.

Azocasein zymography showed a remarkable degradation profile. A trail of substrate digestion was observed from the top of the gel to nearly 55 kDa and another halo of digestion with apparent molecular weights of more than 40 kDa (Fig. 1A). Moreover, the digestion of protein substrates by crude ECPs from 07/118 T2 was observed. The results showed that ECPs were able to degrade collagen extracted from oysters (Fig. 1B) as actin, fibronectin from bovine source (data not shown). SDS-PAGE analyses showed the same pattern of digestion for the different substrates, i.e. the disappearance of parent proteins.

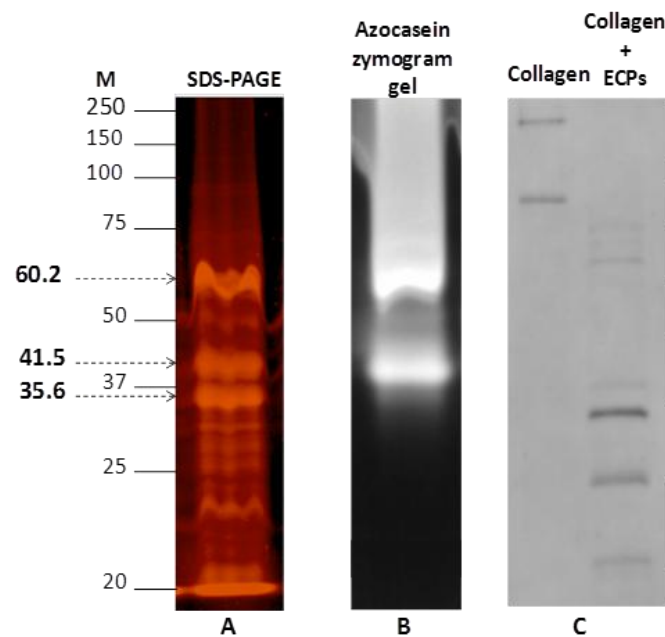


Figure 1: (A) SDS-PAGE and (B) azocasein-gel zymography analyses of the ECPs of *V. tubiashii* 07/118 T2. SDS-PAGE (20 µg of protein/well) was carried out on a 10% polyacrylamide gel. The gel was stained with Sypro Ruby. A zymography gel was carried out in 10% SDS-PAGE co-polymerized with 5 mg/ml of azocasein for the detection of protease activity (20 µg of proteins/well); the gel was stained with Coomassie brilliant blue. (C) Digestion profiles of ECPs (5 µg) incubated with oyster collagen (20 µg). The gel was visualized by Coomassie blue. M: Molecular weight markers. Arrows showed the molecular weight of the most detected proteins.

3.2 Evidences of hemocytes impairment by crude ECPs

The impact of ECPs secreted by *V. tubiashii* 07/118 T2 was evaluated following *in vitro* contact with *C. gigas* hemocytes. Different cellular immune functions were tested with flow cytometry: cellular mortality, phagocytosis activity, adhesion capacity, esterase and intra-cytoplasmic calcium activity, and finally the presence of lysosomes.

A significant inhibition of adhesion capacity ($p < 0.05$) was observed, as shown in Figure 2 A. Around 28 % of adhesion capacity was lost after 3 h incubation with ECPs at $6 \mu\text{g ml}^{-1}$ of proteins compared to the SASW and Tris- HCl buffer controls.

Similarly, a significant inhibition in phagocytic activity was detected as early as the first hour of incubation ($p < 0.05$). Around 56 % of hemocyte phagocytic activity was lost following contact with ECPs at $6 \mu\text{g/ ml}$ compared to controls (hemocytes incubated with SASW or Tris-HCl buffer) (Fig. 2B). This decrease was constant over time, even after 6 h of incubation.

For the other cellular functions like cell mortality, intra-cytoplasmic free calcium, esterase activity and the presence of lysosomes, no significant effect was observed ($p > 0.05$) (data not shown).

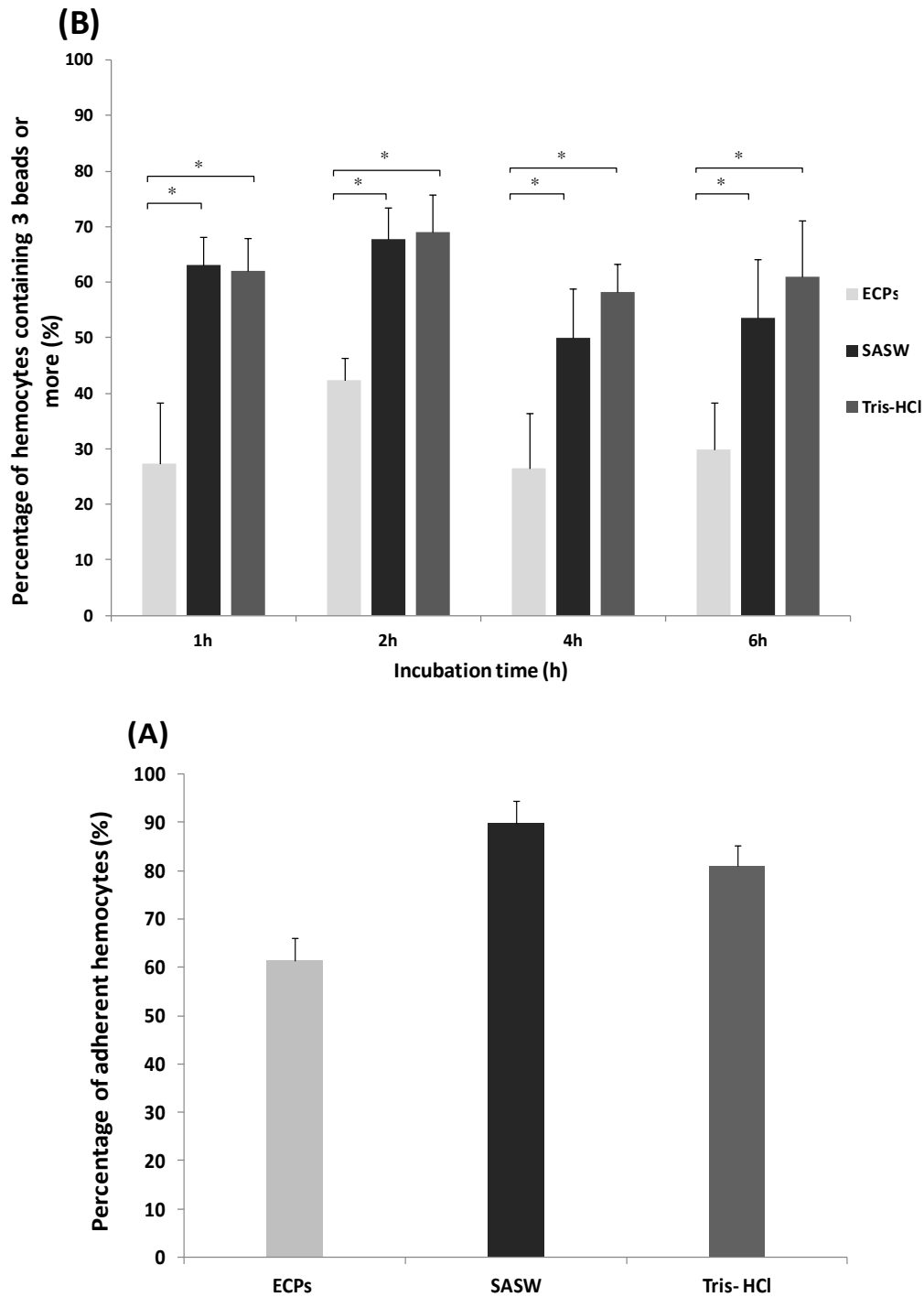


Figure 2: Immune responses of *C. gigas* hemocytes exposed to *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs (6 μ g/ml). **(A)** Effect of ECPs on the capacity of hemocytes to adhere to plastic after a 3 hour incubation. **(B)** Effect of incubation time on the phagocytic activity of hemocytes (percentage of hemocytes containing more than 3 beads) following contact with 6 μ g of protein/ml of ECPs. An asterisk indicates a significant effect of ECPs (Student's t, $p < 0.05$) (N=3 biological replicates).

3.3 Biochemical characterizations of the proteolytic fraction of ECPs

3.3.1 Evidences of the presence of zinc metalloprotease(s) in ECPs

ECPs had demonstrable proteolytic activity when azocasein was used as a substrate. The addition of metal chelating agents into the reaction mix, like EDTA and 1, 10-phenanthroline inhibited azocaseinase activity (Table 1A). This proteolytic activity was much more inhibited by 1, 10-phenanthroline (18.1% residual activity with 0.5 mM f.c.) than by EDTA (72.9% residual activity with 10mM f.c.) which is known to be less selective and affine zinc chelator than 1, 10-phenanthroline.

The effect of biologically relevant metal ions on the proteolytic activity of ECPs was also investigated (Table 1A). Azocaseinase activity was strongly affected by the addition of Zn^{2+} ions, with a loss of 50% of the proteolytic activity. However, the addition of Mg^{2+} and Ca^{2+} ions at the same concentration as Zn^{2+} had little effect on enzymatic activity.

To confirm that the proteolytic fraction contains metalloprotease(s), a more specific substrate was used (ADAM substrate). In this case, hydrolytic cleavage of this specific substrate by crude ECPS attested of the presence of metalloprotease(s) activity in ECPs, inhibited by more than 75% by 1, 10-phenanthroline and also reduced by 22% in the presence of EDTA (Table 1B). Moreover, in opposite to the results obtained with azocasein assays, the addition of PMSF into the reaction mix affected hydrolytic cleavage of the ADAM substrate (Table 1B).

For metal ions, the addition of Zn^{2+} decreased metalloprotease activity by 75% while the addition of Ca^{2+} and Mg^{2+} did not affect ADAM substrate hydrolysis (Table 1B).

Table 1: Effect of inhibitors and various metal ions on the proteolytic activity of extracellular products from *V. tubiashii* 07/118 T2 using azocasein (A) and ADAM substrate (B) as substrates.

Reagent	Final concentration mM	(A)	(B)
		Azocasein residual activity (%) ^a	ADAM substrate residual activity (%) ^b
None		100	100
Inhibitors			
1,10-phenanthroline	0.5	18.1 ± 0.9	24.2 ± 0.6
	5	19.2 ± 0.1	n.d.
	10	25.8 ± 5.7	n.d.
EDTA	0.5	109.1 ± 1.4	78.1 ± 1.7
	5	84.4 ± 3.5	n.d.
	10	72.9 ± 1.6	n.d.
PMSF	0.5	103.8 ± 0.7	53.8 ± 5.3
	5	98.2 ± 2.0	n.d.
	10	97.1 ± 0.6	n.d.
Metal ions			
ZnCl ₂	0.2	53.7 ± 1.9	24.8 ± 0.2
CaCl ₂	0.2	84.1 ± 3.7	92.5 ± 2.6
MgSO ₄	0.2	84.1 ± 0.9	103.0 ± 0.9

^a The azocaseinase activity of ECPs without the addition of metal ions or inhibitors was taken to be 100%. The effect of metal ions and inhibitors was based on an average of two independent experiments.

^b The metalloprotease activity of ECPs without the addition of metal ions or inhibitors was taken to be 100%. The effect of metal ions and inhibitors was based on an average of two independent experiments.

PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride

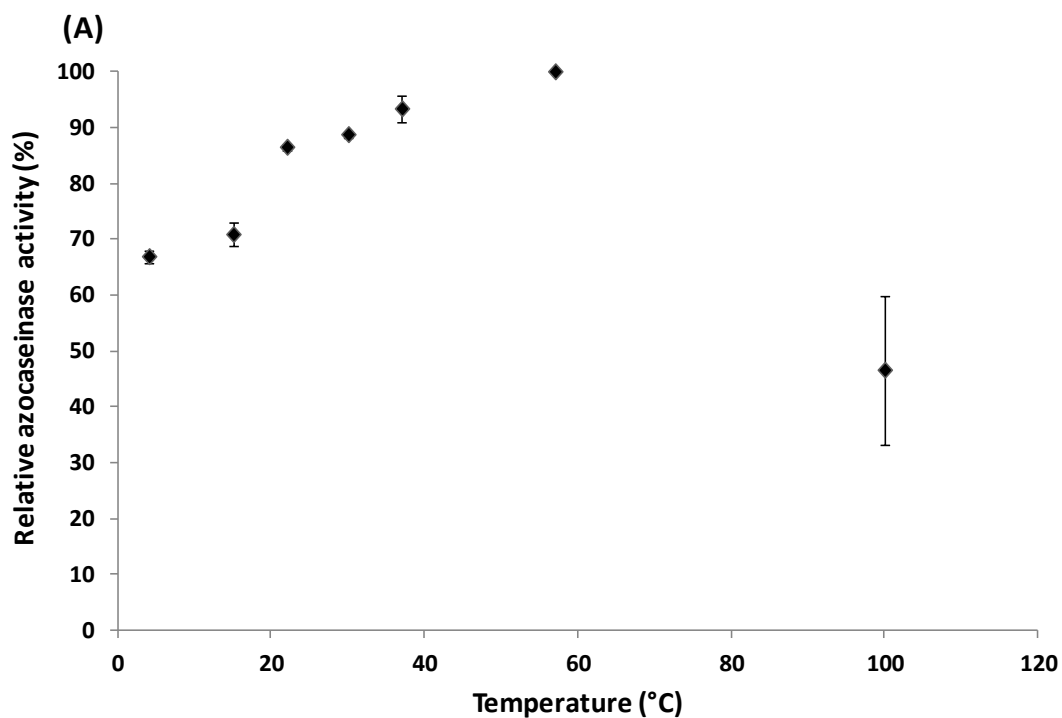
EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

n.d. not done

3.3.2 Evidences of a thermostable proteolytic activity with an alkaline optimum pH

The effect of temperature on azocaseinase activity is shown in figure 3A. Azocaseinase activity was still detected over a wide temperature range, between 4°C and 57°C, while a loss of more than 50% of the activity was observed at 100°C. The optimum temperature for the proteolytic activity of the ECPs was 57°C.

The effect of pH on proteolytic activity was tested using buffers with a pH ranging from 4.6 to 12. Azocaseinase activity was exceptionally stable between pH 5.6 and 11 (Fig. 3B) with an optimum at pH 8. Since the catalytic mechanism of zinc metalloproteases is a typical base-catalysis reaction that involves the bound water molecule being polarized by a Glu (Glutamic acid) residue (Kontogiorgis et al., 2005), a radical drop in protease activity was to be expected and was indeed observed at pH 4.6 and pH 12.



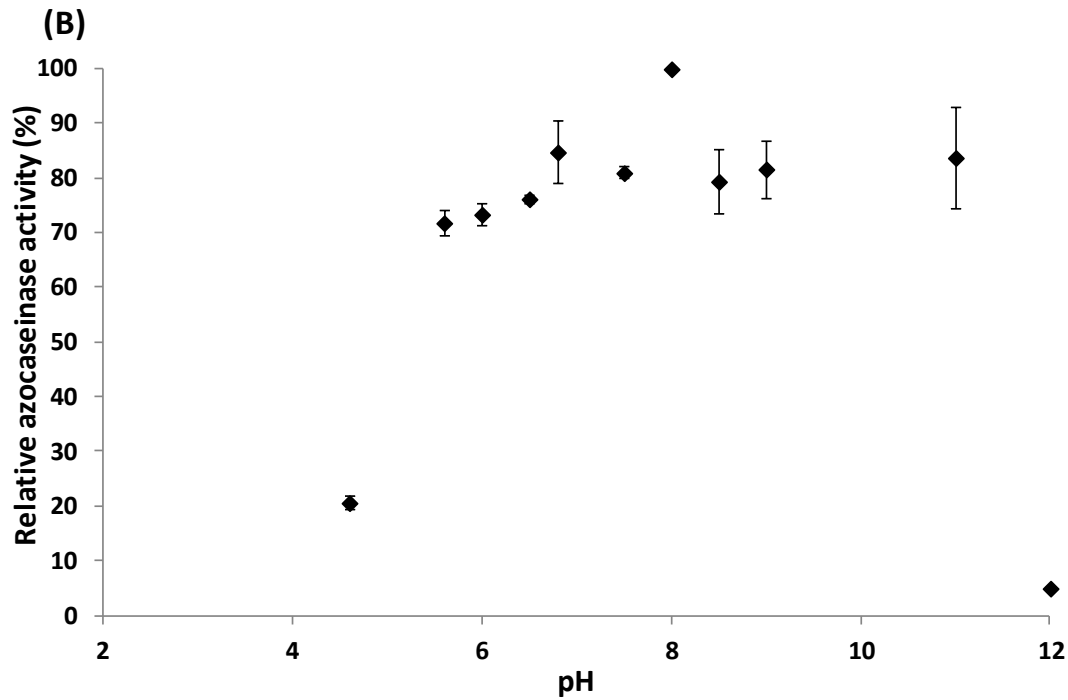


Figure 3: (A) Effect of temperature (°C) and (B) pH on the azocaseinase activity of the ECPs of *V. tubiashii* 07/118 T2 (n=2). For optimum temperature, protease activity was assayed at 4, 15, 22, 30, 37, 57 and 100°C and azocasein was used as a substrate. For optimum pH, the protease activity was tested in a pH range between 4.6 and 11 and protease activity was determined using an azocasein assay. The activity was calculated relative to the reaction at which the maximal activity was obtained (pH 8 and 57°C), which was taken as 100%.

3.4 Evidences of a highly present zinc metalloprotease belonging to the thermolysin family in *V. tubiashii* ECPs

Mass spectrometry Orbitrap analyses evidenced the presence of an “Extracellular zinc metalloprotease” (GI: 343500312) in *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs, with a score of 385.48 and coverage of 8.9 % with semiTrypsin analysis, and a score of 3668.01 and a coverage of 32.62 % with no enzyme analysis (Table 2). An extracellular N-acetylglucosamine-binding protein was also detected with none (no enzyme) analysis (Table 2).

Table 2: Mass spectrometry identification of protein contained in *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs. 2µg of crude ECPs were sequenced using LC-LTQ Orbitrap Velos mass spectrometry. Score and coverage were those given by the PEAKS software. The MS/MS data obtained were processed and submitted for database search which none (no enzyme) and semiTrypsin were specified for enzyme parameter. MS-MS data were searched against NCBI database and *V. tubiashii* ATCC 19109 genome (NCBI).

Identification	Accession no.	Cellular component/ molecular function	Sequenced peptides	Coverage (%)	Score	MW (kDa)	pI
None (no enzyme)							
Extracellular zinc metalloprotease	343500312	Extracellular/ catalytic activity; metal ion binding	AEATGTGPGGNLKTNR AEATGTGPGGNLKTNR AEATGTGPGGNLKTNR LVYQNMSGGINEA LVDINVAHEVSHG YSVDDVKAFTT IVGADIFKSEGGLRY + other peptides	32.62	3668.01	66.1	5.45

				5.77	527.87	53.1	4.69
N-acetylglucosamine-binding protein A	343503266	Extracellular/ND	VEDQTPPPGD SVEGPDGFPE DWNPNQPL				
Extracellular zinc metalloprotease	343500312	Extracellular/ catalytic activity; metal ion binding	AEATGTGPGGNLKTNR AAADMGYSDVDDVAAA FDQPSKDGR YSVDDVK AEATGTGPGGNLK IVGADIFKSEGGLR	8.9	385.48	66.1	5.45

The gene encoding the extracellular zinc metalloprotease identified in mass spectrometry analyses was sequenced and resulted in a 1821 bp product (accession number AHG50771). *Vibrio* metalloproteases phylogenetic analyses revealed that 07/118 T2 metalloprotease was close to predicted extracellular zinc metalloproteases of both *V. tubiashii* LMG 19109T (accession no. EGU55378) and LMG 19106 (accession no. EIF02000). However, the 07/118 T2 metalloprotease is distant from VtpA and VtpB (two *V. tubiashii* RE 22 metalloproteases) with 82 % and 50 % similarity, respectively (Fig. 5).

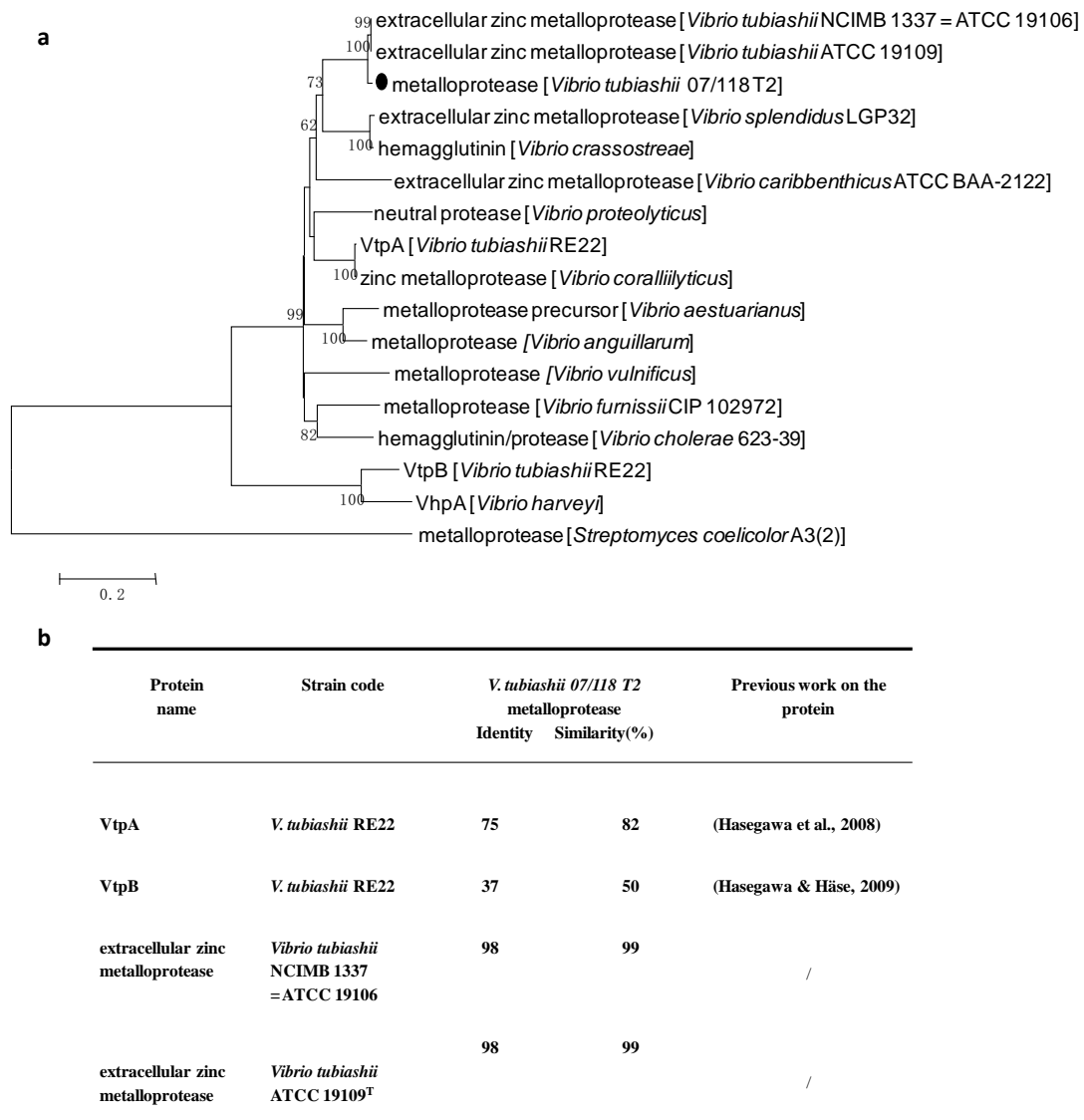


Figure 5: (a) Neighbor-joining phylogenetic tree showing the phylogenetic position of French *V. tubiashii* metalloprotease amino acid sequence (●) compared to other *Vibrio* metalloprotease amino acid sequences. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA 6. The optimal tree with the sum of branch length = 3.17949162 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000

replicates) is shown next to the branches. Nodes without a number are of low significance (<50%). (b) The percentage identity and similarity of *V. tubiashii* LMG27884 metalloprotease compared to other *V. tubiashii* metalloproteases (RE 22, ATCC 19106 and ATCC 19109T).

/: no published study.

The deduced metalloprotease amino-acid sequence contain the zinc-binding consensus sequence (HEXXH) = (H³⁴²EVSH³⁴⁶), which is typical of the zincins metalloprotease superfamily (Hooper, 1994; Miyoshi and Shinoda, 2000a). It also contains the potential third zinc ligand located 19 bases downstream from the second histidine of the zinc-binding motif (HEXXH~19aa~GXXNEXXSD) that corresponds to (H³⁴²EVSH³⁴⁶~19aa~GGINEE³⁶⁶AFSD), which characterizes the thermolysin family (EC 3.4.24.27) (Hooper, 1994; Miyoshi and Shinoda, 2000a; Miyoshi et al., 2002) (Fig. 4).

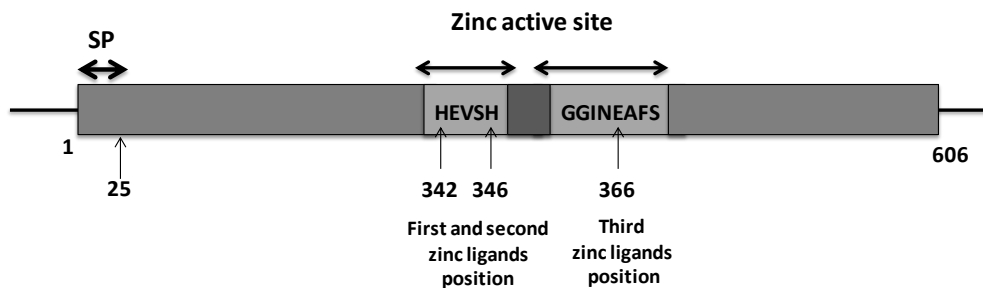


Figure 4: The amino acid sequence of a thermolysin-like metalloprotease (606 aa) from *V. tubiashii* 07/118 T2. The consensus zinc-binding motif is highlighted in light gray. SP: signal peptide.

V. tubiashii 07/118 T2 metalloprotease has a predicted molecular weight of 66 kDa and a putative signal sequence containing 25 amino acids with a potential signal peptidase cleavage site between Ala 25 and Ala 26 (Fig. 4). This signal peptide is followed by a protein with a predicted molecular mass of 63.25 kDa and a predicted isoelectric point of 5.22.

A prosite algorithm revealed the presence of an N-myristoylation site (13 sites) and an N-glycosylation site (8 sites). NetPhosbact revealed 14 potential sites of phosphorylation: serine (13) and threonine (1).

4. Discussion

As we had previously demonstrated the virulence of *V. tubiashii* 07/118 T2 and the toxicity of their ECPs on juvenile oysters (Travers et al., 2014), in this study we now assessed host cellular immune responses and bacterial potential effectors by which these ECPs can be associated with the virulence of this strain. The main objective of this work was to achieve a biochemical and molecular identification of these toxic ECPs coupled with the evaluation of their biological activities by (1) the identification of exoproteolytic fraction using electrophoretic, enzymatic, molecular and mass spectrometry analyses, (2) the determination of the effect of ECPs on the cellular immune response of the oyster.

4.1 Hemocyte impairments when exposed to ECPs produced by *V. tubiashii* 07/118 T2

Even if the impact of ECPs on *C. gigas* hemocytes was previously investigated in other interaction models (Allam and Ford, 2006; Hégaret et al., 2003; Labreuche et al., 2010; Paillard et al., 2004), no information concerning *V. tubiashii* secreted proteins on oyster immune cells is currently available. It is even more important to fill this gap with the recent identification of a distinct group of *V. tubiashii* strains in France (Travers et al., 2014).

In this study, the hemocytes of *C. gigas* were used as a biological model to demonstrate ECPs cytotoxicity to oyster hemocytes in *in vitro conditions*. Crude ECPs from *V. tubiashii* 07/118 T2 reduced by 28% the adhesive capacity of *C. gigas* hemocytes 3 h post-incubation. Consequently, phagocytic activity, one of the most important immune functions in bivalves (Cheng and Sullivan, 1984; Matozzo et al., 2007; Prado-Alvarez et al., 2012), was reduced by almost 56% within the first hours of incubation. No significant effect was detected on cell mortality, intra-cytoplasmic calcium, esterase activity and the presence of lysosomes.

The decrease in adhesion capacity and consequently in the phagocytic activity of hemocytes is often observed either with other species of *Vibrio* or their extracellular products. For *M. edulis* hemocytes, cell rounding was observed within 2 to 3 h post challenge by *V. alginolyticus* and *V. anguillarum* (Lane and Birkbeck, 2000, 1999). It was also reported that the loss of pseudopodia and the morphological changes in *V. philippinarum* hemocytes led to a loss of adherence capacity after incubation with *V. tapetis* (Choquet et al., 2003). The same morphological changes were observed with *V. aestuarianus* 01/32 with *C. gigas* hemocytes (Labreuche et al., 2006b) and *V. splendidus* with *M. arenaria* hemocytes (Araya et al., 2009; Mateo et al., 2009). Similar morphological damage to hemocytes was also described with

Vibrio ECPs. Labreuche *et al.* demonstrated that 16 µg/ml of ECPs from *V. aestuarianus* could cause a reduction in adhesion capacity (almost 21% of inhibition) and an inhibition of phagocytic activity (30% of inhibition) when placed in contact with *C. gigas* hemocytes (Labreuche *et al.*, 2006a). All these observations comforted the results obtained with 07/118 T2 ECPs on adhesion and phagocytic activity of adult oyster hemocytes. Furthermore, it would be interested to confirm our results on hemocytes sampled from the most affected age class (i.e. hemocytes from spat oyster).

The mechanism by which bacteria cause cell rounding and inhibit further phagocytosis was only poorly described in previous studies (Araya *et al.*, 2009; Brulle *et al.*, 2012; Labreuche *et al.*, 2006b; Lane and Birkbeck, 1999).

In our study, the hydrolytic action of *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs was assayed directly on purified structural proteins extracted from oysters. We showed that extracellular effectors degraded muscle collagen and also bovine actin and fibronectin proteins (data not shown). Indeed, the cleavage of these proteins, which are essential in extracellular matrix formation or are involved in the phagocytic process (May and Machesky, 2001; Proctor *et al.*, 1985) and in cell adhesion, chemotaxis and migration (Koutsogiannaki and Kaloyianni, 2011), might potentially affect hemocyte immune responses. It was reported that an alteration of actin rearrangement by a pathogen might protect it from being neutralized by phagocytic cells (May and Machesky, 2001). Using fluorescence microscopy, Moore *et al.* (Moore *et al.*, 1992) showed that the rounding of *M. arenaria* hemocytes is caused by an alteration in cytoskeletal architecture induced by a damage of actin filaments.

4.2 Molecular evidences of thermostable metalloprotease(s) in *V. tubiashii* 07/118 T2 secretome

To achieve a biochemical and molecular identification of these toxic ECPs, crude ECPs were analyzed by coupling electrophoretic, enzymatic, molecular and mass spectrometry analyses.

Firstly, a set of biochemical assays was carried out on ECPs. SDS-PAGE analysis showed a rich protein profile with different molecular weights. Azocasein zymogram showing regions of clearing indicated the presence of proteolytic activities. Comparing the two results, we observed a big smear which ended with the major protein (a band around 55 kDa) detected on SDS-PAGE and an individual digestion band that coincided with other high intensity

bands detected with SDS-PAGE (bands between 37 and 50 kDa). It seems that several other proteases, or one protease with different post-translational processing, may be present but could not be visualized due to the smearing of the hydrolytic activity.

Furthermore, the effect of inhibitors and metal ions was tested using azocasein, a non-specific protease substrate, and the ADAM substrate, which is usually used to monitor disintegrin and metalloproteinase activity (Jacobsen et al., 2008; Ochoa-Campuzano et al., 2007).

The results obtained with these two tests showed that the protease activity in 07/118 T2 ECPs was inhibited by the zinc-specific chelator, 1, 10-phenanthroline (about 80% of the total protease activity was inhibited). Also, the addition of the Zn^{2+} ion strongly affected protease activity. It has been demonstrated that high zinc concentrations inhibit metalloprotease activity through the formation of the zinc monohydroxide ($Zn(OH)^+$) that bridges the catalytic zinc ion to the side chain of the active site of the enzyme (Larsen and Auld, 1991). The results obtained are further proof of the high representation of zinc metalloprotease activity in the ECPs of 07/118 T2.

However, a decrease in proteolytic activity was observed when PMSF (a serine protease inhibitor) and the ADAM substrate were associated, while such phenomenon was not detected with the azocasein substrate. This result does not negate the presence of zinc metalloprotease activity but suggests a non-specific reaction of PMSF with the active site of the metalloprotease or with the ADAM substrate. However, the first hypothesis was dismissed because no inhibition was observed with the azocaseinase assay. The ADAM substrate used contains a single serine residue in its primary structure (Dabcyl-Leu-Ala-Gln-Ala-Homophe-Arg-Ser-Lys (5-FAM)-NH₂) *so it is possible that* PMSF could covalently fix this serine, making the ADAM substrate non-cleavable. A large folded protein like azocasein, should be less in favor to non-specific PMSF fixation, even if it contains about 5.9% of serine residues (Ellinger and boyne, 1965).

Moreover, ECPs proteases showed a fairly wide range of pH, from 5.6 to 11, with an optimum at pH 8. It was previously reported that the metalloproteases secreted by marine bacteria are usually alkaline proteases; they have an alkaline optimum pH and are stable within an alkaline range (Wu and Chen, 2011). In relation to temperature, ECPs proteases demonstrated a proteolytic activity from 4°C to 100°C with an optimum at 57°C. It should be mentioned that a loss of only 50% of protease activity was observed at 100°C. This

performance over a wide range of temperatures and pH tends to confirm the idea that proteolytic fraction of ECPs contains thermostable active zinc metalloprotease(s) (Kudryashova et al., 1998).

By liquid chromatography coupled with mass spectrometry, an extracellular zinc metalloprotease (GI: 343500312) was identified and the gene encoding this protein was sequenced in *V. tubiashii* 07/118 T2. Annotation of the gene encoding this exometalloprotease showed that this enzyme is a member of the thermolysin family (EC 3.4.24.27) (Miyoshi and Shinoda, 2000a; Miyoshi et al., 2002). In addition, glycosylation and phosphorylation motifs were identified on the metalloprotease sequence. The presence of these motifs suggested that the 07/118 T2 metalloprotease could be subject to post-translational modifications which can enable it to perform functions other than those determined by its primary sequence (Ahmad et al., 2007). Furthermore, it was shown that the HEXXH metalloprotease family is the only family of this protease group that is extensively modified post-translationally by both N-glycosylation and glycosyl phosphatidylinositol (McGwire and Chang, 1996).

Moreover, based on the phylogenetic tree, a large distance between the 07/118 T2 metalloprotease and the American *V. tubiashii* RE22 metalloproteases VtpA and VtpB (Hasegawa & Häse, 2009b; Hasegawa et al., 2008) were observed. This data could suggest that the 07/ 118 T2 metalloprotease is different from the metalloproteases of the American strains previously described as major virulence factors.

In fact, proteases are generally described as one of the factors that are most toxic to the host, and are involved in virulence and pathogenicity (Shinoda et al., 1996). Most of these proteases have been identified as zinc metalloproteases (Miyoshi and Shinoda, 2000b). Studies on *V. aestuarianus* metalloprotease (Vam) showed its toxicity and its capacity to impair oyster hemocyte functions (Labreuche et al., 2010). A metalloprotease from *V. splendidus* for pacific oyster *C. gigas* (Vsm) has been shown to be the major factor in the toxicity of the ECPs (Binesse et al., 2008). Extracellular products from *V. tubiashii* were also shown to be toxic to oyster larvae and its pathogenicity was linked to a metalloprotease (VtpA) and a hemolysin (VthA) (Delston et al., 2003; Hasegawa and Häse, 2009a; Hasegawa et al., 2008; Kothary et al., 2001).

5. Conclusions

It had previously been shown that the ECPs produced by *V. tubiashii* 07/118 T2 were toxic for juvenile oysters in experimental challenges. In this study, it was shown that these

toxic ECPs could inhibit hemocytes adhesion capacity and phagocytosis activity, and digest matrix host proteins. The proteolytic fraction of ECPs contained active and thermostable extracellular zinc metalloprotease(s) and a thermolysin.

Even if taken together, our results let us wonder if this (these) zinc metalloprotease(s) could be involved in the impairment of hemocyte immunological functions, the direct implication of this protein in ECPs toxicity still has to be demonstrated.

Acknowledgements

This study was supported by a Ph.D grant from the CNRS and IFREMER for R. Mersni-Achour (2010-2013). The PRES (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur) of the Limousin and Poitou-Charentes regions and the FR CNRS 3097 «Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable» are acknowledged for their financial support through the research project «Caractérisation *in vitro* des effets de métalloprotéases sur différents types cellulaires de l'huître creuse *C. gigas*». Special thanks go to L. Beaugeard, for technical assistance during the flow cytometer analyses. Thanks go to the platform “Structural and Functional Mass Spectrometry Facility, Jacques Monod Institute, UMR7592 CNRS – Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité” and especially to T. Léger and C. Garcia for mass spectrometry analysis. Acknowledgment also goes to M. Francis Healy for his revision of the English language.

References

- Ahmad, I., Hoessli, D.C., Gupta, R., Walker-Nasir, E., Rafik, S.M., Choudhary, M.I., Shakoori, A.R., Nasir-ud-Din, 2007. *In silico* determination of intracellular glycosylation and phosphorylation sites in human selectins: Implications for biological function. *J. Cell. Biochem.* 100, 1558–1572.
- Allam, B., Ford, S.E., 2006. Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 374–383.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., 2009. Morphological and Molecular Effects of *Vibrio splendidus* on Hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* 28, 751–758.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Roux, F.L., 2008. Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7108–7117.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broberg, C.A., Calder, T.J., Orth, K., 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* 13, 992–1001.
- Brulle, F., Jeffroy, F., Madec, S., Nicolas, J.-L., Paillard, C., 2012. Transcriptomic analysis of *Ruditapes philippinarum* hemocytes reveals cytoskeleton disruption after *in vitro* *Vibrio tapetis* challenge. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 368–376
- Cheng, T.C., Sullivan, J.T., 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.* 14, 305–315.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J., Paillard, C., 2003. Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 57, 109–116.
- Delston, R.B., Kothary, M.H., Shangraw, K.A., Tall, B.D., 2003. Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Can. J. Microbiol.* 49, 525–529.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 12, 951–963.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Roux, F.L., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., Lorget, J. de, Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201015326.
- Ellinger, G.M., Boyne, E.B., 1965. Amino acid composition of some fish products and casein. *Br. J. Nutr.* 19, 587–592.
- Elston, R.A., Hasegawa, H., Humphrey, K.L., Polyak, I.K., Häse, C.C., 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis. Aquat. Organ.* 82, 119–134.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783.

- Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S., Thomas-Guyon, H., 2003. Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr. Pharm. Des.* 9, 193–199.
- Garnier, M., Labreuche, Y., Nicolas, J.-L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 358–365.
- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., Colwell, R.R., 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 1–4.
- Hasegawa, H., Häse, C.C., 2009. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* directly inhibits its extracellular haemolysin. *Microbiology* 155, 2296–2305.
- Hasegawa, H., Lind, E.J., Boin, M.A., Häse, C.C., 2008. The Extracellular Metalloprotease of *Vibrio tubiashii* Is a Major Virulence Factor for Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4101–4110.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 249–265.
- Hooper, N.M., 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354, 1–6.
- Jacobsen, J., Visse, R., Sørensen, H.P., Enghild, J.J., Brew, K., Wewer, U.M., Nagase, H., 2008. Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 537–547.
- Jeffries, V.E., 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29, 201–226.
- Kontogiorgis, C.A., Papaioannou, P., Hadjipavlou-Litina, D.J., 2005. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and (Q)SARs results. *Curr. Med. Chem.* 12, 339–355.
- Kothary, M.H., Delston, R.B., Curtis, S.K., McCardell, B.A., Tall, B.D., 2001. Purification and Characterization of a Vulnificolysin-Like Cytolysin Produced by *Vibrio tubiashii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3707–3711.
- Koutsogiannaki, S., Kaloyianni, M., 2011. Effect of 17 β -estradiol on adhesion of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes to selected substrates. Role of alpha2 integrin subunit. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 73–80.
- Kudryashova, E.V., Mozhaev, V.V., Balny, C., 1998. Catalytic activity of thermolysin under extremes of pressure and temperature: modulation by metal ions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1386, 199–210.
- Labreuche, Yannick, Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006 b. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715–2724.
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D., Nicolas, J.-L., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 753–758.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J., 2006 a. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 367–379.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Publ. Online* 15 August 1970, 680–685.

- Lane, E., Birkbeck, T.H., 1999. Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Living Resour.* 12, 343–350.
- Lane, E., Birkbeck, T.H., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J. Fish Dis.* 23, 275–279.
- Larsen, K.S., Auld, D.S., 1991. Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 2613–2618.
- Lee, J.-H., Ahn, S.-H., Lee, E.-M., Kim, Y.-O., Lee, S.-J., Kong, I.-S., 2003. Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 293–300.
- Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J., 2009. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 50–56.
- Matozzo, V., Rova, G., Marin, M.G., 2007. Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 732–746.
- May, R.C., Machesky, L.M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114, 1061–1077.
- McGwire, B.S., Chang, K.-P., 1996. Posttranslational Regulation of a *Leishmania* HEXXH Metalloprotease (gp63). *J. Biol. Chem.* 271, 7903–7909. *J. Biol. Chem.* 271, 7903–7909
- Miyoshi, S., Shinoda, S., 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2, 91–98.
- Miyoshi, S., Sonoda, Y., Wakiyama, H., Rahman, M.M., Tomochika, K., Shinoda, S., Yamamoto, S., Tobe, K., 2002. An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization, and gene cloning. *Microb. Pathog.* 33, 127–134.
- Mizuta, S., Miyagi, T., Yoshinaka, R., 2005. Characterization of the quantitatively major collagen in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* 71, 229–235.
- Moore, C.A., Beckmann, N., Patricia Morse, M., 1992. Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 141–147.
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M.D., Martínez-Ramírez, A.C., Bravo, A., Rausell, C., 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 437–442.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 249–262.
- Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 69–78.
- Proctor, R.A., Textor, J.A., Vanin, J.M., Mosher, D.F., 1985. Role of Fibronectin in Human Monocyte and Macrophage Bactericidal Activity. *Infect. Immun.* 47, 629–637.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., 2011. Proteases Produced by *Vibrios*. *Biocontrol Sci.* 16, 1–11.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., Wakae, H., Rahman, M., Tomochika, K.-I., 1996. Bacterial Proteases as Pathogenic Factors, with Special Emphasis on *Vibrio* Proteases. *Toxin Rev.* 15, 327–339.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* mst197.
- Teo, J.W., Zhang, L.-H., Poh, C.L., 2003. Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* 303, 147–156.
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I., Saulnier, D., In press. First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J. Invertebr. Pathol.*
- Travis, J., Potempa, J., Maeda, H., 1995. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* 3, 405–407.
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E., Leifson, E., 1965. Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology. *J. Bacteriol.* 90, 1036–1044.
- Tubiash, H.S., Colwell, R.R., Sakazaki, R., 1970. Marine Vibrios Associated with Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. *J. Bacteriol.* 103, 271–272.

B/ Influences physique et chimique des conditions de culture de la souche française *V. tubiashii* sur la toxicité de ses produits extracellulaires.

L'effet de l'état physique d'un milieu de culture (solide ou liquide) ainsi que sa composition et la nature de ses éléments constitutifs dans le comportement métabolique des bactéries ont été souvent étudiés (Lorian, 1988, 1989; Wondrak *et al.*, 1991; Erz *et al.*, 1993; Mohedano *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002; Chopp *et al.*, 2003; Cobaxin *et al.*, 2014).

Dans une étude précédente, (Article 1), nous avons montré que les ECPs d'une souche française de *V. tubiashii*, issus d'une culture sur milieu solide LBSA (milieu Luria-Bertani gélosé supplémenté de 1% de chlorure de sodium) étaient toxiques pour l'huître creuse *C. gigas*. Cependant, aucun effet létal n'avait été observé avec les ECPs issus d'une culture sur le même milieu mais liquide (LBS). Afin de clarifier l'influence du milieu de culture sur la toxicité et la composition des ECPs bactériens, plusieurs types de milieux de culture ont été testés, i.e LBSA, Marine Agar (MA), Marine Broth (MB) et LBS.

Par des séries d'infections expérimentales sur des huîtres juvéniles, nous avons montré que seul le surnageant bactérien issu d'une culture sur milieu gélosé LBSA était toxique. Aucune mortalité n'a été observée quand les surnageants bactériens, respectivement préparés sur MA, MB et LBS, ont été testés.

L'analyse de la complexité moléculaire de ces différents ECPs a été résolue par combinaison de dosages enzymatiques (mesurant les activités protéasiques) et de séparations électrophorétiques (SDS-PAGE et zymographie sur azocaséine). Ces expériences ont permis de démontrer que les ECPs produits sur LBSA, MA et MB possédaient une activité azocaséinase plus importante que ceux issus de LBS et une diversité moléculaire plus grande. L'analyse protéomique a confirmé ces résultats. Elle a permis de montrer qu'une métalloprotéase à zinc semblait être la protéine majoritaire des surnageants bactériens, quel que soit le milieu utilisé et sécrétée sous diverses isoformes.

La sécrétion singulière de ces isoformes protéiques de haut poids moléculaire, restreinte aux conditions de culture utilisant le milieu LBSA, et la toxicité exclusive de ces ECPs, témoigne d'une variation phénotypique forte. Ces modes de culture influencent nettement la production d'exotoxines mais semblent également affecter l'activité

transcriptionnelle de cette souche, au regard de la différence enregistrée d'expression de certains gènes codant pour l'hémolysine, la métalloprotéase et l'exochitinase.

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un troisième article qui sera soumis prochainement à la revue «Microbiology».

Article III: TOXICITY AND PROTEASES COMPOSITION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS FROM THE FRENCH *VIBRIO TUBIASHII* ARE MODULATED BY PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF GROWTH MEDIA.

(Prepared for submission in the journal “Microbiology”)

Mersni-Achour Rachida^{1,2,5}, Doghri Ibtissem¹, Pichereau Vianney³, Ben cheikhYosra¹, Phillippe Haffner², Sophie Sablé¹, Denis Saulnier^{2,4}, Marie-Agnès Travers², Ingrid Fruitier-Arnaudin^{1,5}

¹UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

²Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

³Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, 29280 Plouzané, France.

⁴Ifremer, Centre Ifremer du Pacifique, UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniques, Tahiti, 98719 Taravao, French Polynesia

⁵Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable, FR CNRS 3097, Université de La Rochelle, France

Abstract

In a previous study, we showed that the extracellular products (ECPs) of the French *V. tubiashii* obtained from bacteria grown on solid medium were toxic towards juvenile *C. gigas* oyster. In opposite, bacteria grown in liquid medium was able to produce toxic ECPs. In order to decipher the basis of such results, the toxicity and proteases characterization of the ECPs of French *V. tubiashii*, cultured on various physical state media and in different compositions, were studied. Only the ECPs produced on the agar Luria-Bertani medium supplemented with sodium chloride (LBSA) contained toxicity towards *C. gigas* oysters. In addition, protease assays and zymography analysis revealed that ECPs produced on Marine Broth (MB), Marine Agar (MA) and LBSA showed an important protease activity compared to ECPs produced in LBS media. Besides, results obtained with inhibitors assays and SDS-PAGE analysis showed a difference in both protease composition and quantity of each *V. tubiashii* ECPs. Proteomic analysis conducted on a various ECPs proved that a zinc metalloprotease seemed to be the most dominate protein regardless of the medium used and probably in various isoforms. Interestingly a group of metalloprotease with high molecular weights (apparently due to glycosylation modifications) seemed to characterize ECPs produced on LBSA and correlated with their toxicity. Finally transcriptomic analyses proved that there are also differences in *V. tubiashii* hemolysin, metalloprotease and exochitinase gene expressions when bacteria it grew on different media. These observations suggested the importance of the microenvironment for the expression and secretion of exotoxins by the French *V. tubiashii*.

Keywords: *Vibrio*; ECPs; Culture media; Proteomic approach; Transcriptomic approach

Introduction

Marine fish and shellfish production are seriously affected worldwide by bacterial pathogens that cause high losses in the aquaculture sector. One of the principal causes of mortality events in marine bivalves is the presence of a number of *Vibrio* species (Paillard *et al.*, 2004a; Romalde & Barja, 2010; Romalde *et al.*, 2014). Among these species, *V. tubiashii* is a well-known pathogen that causes bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile mollusks (Tubiash *et al.*, 1965, 1970; Hasegawa *et al.*, 2008; Elston *et al.*, 2008; Travers *et al.*, 2014). Very recently in France (Travers *et al.*, 2014), several isolates affiliated to *V. tubiashii* have been associated to mortality events of molluscs and particularly *C. gigas*. In a previous study, we showed that extracellular products of the French strain *V. tubiashii* obtained from culture on LBSA agar were toxic towards juvenile *C. gigas* oyster. However, no mortality was observed with the LBS broth (Travers *et al.*, 2014).

The majority of *Vibrio* could grow in synthetic media with glucose as a source of carbon and energy and capable of both fermentative and respiratory metabolism. Most halophilic species require an enrichment with NaCl for optimal growth (Thompson *et al.*, 2004b; Cohen & Karib, 2007). For *V. tubiashii*, it was reported that the production of extracellular proteases was reduced by elevated salt concentrations and temperatures. Also, they showed that glucose and sucrose used as the sole carbon source in a minimal salts medium caused severe reduction in protease production (Hasegawa & Häse, 2009b). As extracellular proteases produced by *Vibrio* species are regularly described to play a significant role in pathogenesis (Shinoda & Miyoshi, 2011), we proposed to investigate the influence of culture conditions on the variability of the phenotypes expressed by the French *V. tubiashii*. In this objective, productions of *V. tubiashii* ECPs were carried out on various types of media (agar vs broth), coupled with experimental challenges and completed by proteomic and transcriptomic analyses.

Materials and methods

1. Bacterium, media and extracellular product (ECPs) production

The French *V. tubiashii* (07/118 T2) isolated from moribund spat oysters in experimental hatchery/nursery during 2007 molluscan mortalities was used in this study (Travers *et al.*, 2014). ECPs from this representative strain were produced on plate agar and in liquid medium.

For liquid media: LB Broth, Miller (Difco™) medium supplemented with 1% sodium chloride (LBS) and MB (CONDA) were used. Briefly, 100 µl of a pre-culture of bacteria (OD₆₀₀ of 1) was inoculated in 100 ml of LBS or MB medium. After 20 h of incubation, ECPs were obtained by centrifugation at 3,000 × g for 40 min at 4°C, filtrated through 0.22 µm, concentrated by lyophilisation and dialysed against distilled water and Tris-HCl 50mM pH 8 buffer.

For plate agar media, LBS supplemented with 1.5% agar (LBSA) and MB supplemented with 1.5% agar (MA) were used. ECPs were produced using the cellophane plate technique as described by Travers *et al.* (Travers *et al.*, 2014). A volume of 1 ml of an exponential phase culture in LBS or MB (OD₆₀₀ of 1, 22°C at 18h) was spread on a sterile cellophane film overlying medium plates. After 48h of culture at 22°C, the bacteria cells were washed off the cellophane using 10 ml of cold SASW and removed by centrifugation at 3,000 × g (45min at 4°C). The supernatant containing the ECPs was then treated in the same way as the ECPs from liquid media (see above). All ECPs obtained were stored at -80 °C until used. Proteins were quantified using the method described by Bradford (Bradford, 1976) using Bradford reagent (Sigma-Aldrich) and bovine serum albumin as a standard protein. Inhibitors effect on protease activity was determined as previously described (Travers *et al.*, 2014 , Mersni Achour *et al.*, 2014).

2. *In vivo* challenges

The toxicity of different ECPs (produced on MA and LBSA, and in LBS and MB) was tested as follows: a volume of 100 µl of each ECPs solution at a concentration of 5 µg of proteins. g⁻¹ of soft body weight was injected into the adductor muscle of juvenile oysters (twelve month-old) after anesthetizing them (for 3 hours at 22 °C in a magnesium chloride solution (MgCl₂, Fluka) at a final concentration of 50 g l⁻¹ (1/4: v/v seawater/freshwater) and

under aeration). After injection, oysters were transferred to tanks (triplicates of 10 oysters in 2 liters) filled with UV-treated and 1 µm-filtered seawater at 3.1‰ of salinity and maintained under static conditions at 22 °C with aeration. A group of oysters used as controls were injected with SASW and Tris-HCl buffer. Mortality was monitored twice a day and any newly dead oysters were removed from the tanks. Animals were considered to be dead when the valves did not close following stimulation. Two independent experimental infections were carried.

3. Proteomic analysis:

Besides 2-DE analysis, SDS-PAGE and zymography were carried for each ECP as described previously by Mersni Achour *et al.* (2014).

For 2-DE analysis and before isoelectric focusing, a volume corresponding to 50 µg of proteins of ECPs from three different culture media (MA, LBSA and LBS) were prepared and concentrated for 2-DE analyses using Ready Prep 2-D Cleanup kit (Biorad). The final pellet was suspended for protein solubilization in 250 µl of Destreak Rehydration (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3–10 (GE Healthcare). Strips were hydrated with each ECPs fraction for 15 h prior IEF. 2-DE was carried using protocol described by Galland *et al.* (2013). Briefly, the first dimension was performed on linear pH 3–10 gradient IPG strips (13 cm, GE Healthcare) in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare), using the following protocol: step 1: 15 min at 250 V, step 2: 2 h at 500 V, step 3: 1 h gradient to 1,000 V, step 4: 2.5 h gradient to 8,000 V, and a final step 4: 1.5 h at 8,000 V. Before the second dimension, strips were equilibrated 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 30% glycerol (v/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.8 and Bromophenol Blue, 1% of Dithiothreitol and 260 mM Iodoacetamide). The strips were then transferred onto vertical 10–15% gradient SDS-polyacrylamide gels and the separation was performed at 50 mA per gel. Gels were stained with Coomassie blue solution (overnight) and destained in a methanol/acetic acid/water (30/7/63: v/v/v) solution. Gels were scanned with SFLauncher software and comparison by using the Prodigy SameSpot software (Nonlinear Dynamics).

Selected spots were manually excised from gels and mass spectrometric analysis was performed by the "Structural and Functional Mass Spectrometry Facility" in the JACQUES MONOD Institute (CNRS and Paris-Diderot University). After trypsin digestion, spots were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass

spectrometry (MALDI TOF–TOF). System and peptide mass fingerprint obtained was examined using MASCOT (Matrix Science Ltd, London, UK). MS-MS data were searched against NCBI database and *V. tubiashii* genome database.

4. Relative expression of virulence factors

4.1 RNA extraction and RT cDNA synthesis

Bacterial pellets of each culture media was fixed by RNA protect bacteria reagent (Qiagen, UK) to stabilize/fixe bacterial RNA for quantitative real-time PCR (qPCR) assays. Briefly, A volume of each bacterial culture was added to 2 volume of RNA protect reagent. The mix was centrifugated for 10 min at $5,000 \times g$. Pellets were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. For each medium three biological replicates were performed.

Total RNA was extracted from each bacterial pellet using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), at a ratio of 1 ml Trizol to each pellet according to the manufacturer protocol. Briefly, Bacterial RNA was separated by chloroform (0.2 chloroform: 1 Trizol v/v) and precipitated by cold isopropanol (0.5 isopropanol: 1 Trizol). RNA pellets were washed with 1 ml of 75% ethanol and resuspended in ultrapure water. 17 μl of RNA suspensions were treated by 2 μl of DNase (2U for 10 μg of RNA) (Ambicon). Total RNA concentration was analyzed by spectrophotometry (Nanodrop/Thermo Scientific) and a negative Reverse Transcription (qPCR reaction with diluted RNA) was performed to check RNA purity.

The RT-PCR reaction was carried following the protocol of SuperScript[™] III Reverse Transcriptase (Invitrogen). For the first-Strand cDNA Synthesis, in a total volume of 13 μl , 800 ng of total RNA was well mixed with 200 ng of random primers, 1 μl of dNTP (10 mM) and nuclease free water. The mix was incubated at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and after chilled on ice. 1 μl of SuperScript III RT (200 U μl^{-1}) was added to 1 μl of RNase out (40 U μl^{-1}), 1 μl of DTT and 4 μl of 5X buffer. The reaction mix was incubated 5 min at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by an activation step of 60 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and ends with a deactivation step of 15 min at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. cDNA was conserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

4.2 Real-time PCR analyses

QPCR was used to analyze the expression of different virulence factors secreted by *V. tubiashii* grown on LBSA, LBS, MA and MB: Thermolabile hemolysin (gi: 342822783), metalloprotease (gi: 574609375), and exochitinase (gi: 342818655).

QPCR analysis was conducted on MX3000 and MX3005 Thermocycler (Agilent) using Brilliant III Ultra-Fast Syber Green QPCR Master Mix (Stratagene). Each reaction was run in triplicate in a final volume of 20 μ l containing 5 μ l cDNA (1/30 dilution) and 200 nM of each primer. Reactions were initiated with an initial denaturation for 3 min at 95 °C followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60°C for 20s. Each run included blank controls (water) for each primers and fluorescence intensity was expressed in delta reporters (dR) after background subtraction threshold. The threshold was set using amplification based algorithm from MX3000-3005 software (Stratagene) for the initial plate.

For QPCR efficiencies of each primer pair used, a standard curves were generated using eight serial dilutions ($2 \cdot 10^{-1}$ to $2 \cdot 10^{-8}$) of linearized plasmid (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) containing the insert of gyrase, metalloprotease, and thermolabile hemolysin gene obtained by PCR (Table 1) and directly with genomic DNA for exochitinase. The level of expression of the target genes in different media culture, normalized to the *gyrB* housekeeping gene, was then calculated using the $(1+\text{efficiency})^{-\Delta\Delta C_t}$ formula (Pfaffl, 2001) with reference celles grown in MB. Primer 3 software was used to design QPCR and PCR primers (Table 1)

Table 1: Primers used in QPCR expression analysis and cloning

Amplicon	Accession Number	Primers	Melting temperature (T_m)	Sequence	Application
Gyrase B	490881616	gyrB-94F gyrB-296R	60°C	TTGGTGAATCTGAGCAAACG CGCTTGGATAACCACCTTCAT	QPCR
Metalloprotease	574609375	Vtmp-F2 Vtmp-R2a	60°C	TCATCGATGCAATGACAGGT AGCATTTTCCAGCTTGCCT	
Thermolabile hemolysin	342822783	TL856-QF TL996-QR	60°C	AAGGCTCCGCAGTTCAAGTA GTTTGCATCGTAGAGCACCA	
Exochitinase	342818655	exochi2018-QF exochi2152-QR	60°C	AAGGTGCGTCAGCTTCAGAT AGGCATCAACCACAACAACA	
Gyrase B	490881616	VgyrB-274F VgyrB-1171R	60°C	GAAGTTATCATGACGGTACTTC CCTTTACGACGAGTCATTTTC	PCR
Metalloprotease	574609375	Metallo-DF1 Metallo-Nc R1	60°C	CAACAACGTCATTTAAGCTGGA TACTCGTCGTTGGTTTGCTG	
Thermolabile hemolysin	342822783	TL151F TL1140R	60°C	CCTGCTCAAACCTCATGACGA TGAACCGTGATGAGCACAAAT	
Exochitinase	342818655	exochi1092F exochi2399R	60°C	TGGTGTGGGTTACGACAAGA ACCGCTGTATCAACCCAAAG	

Results and discussion

1. Toxicity of different ECPs produced on different growth media

The toxicity of different ECPs secreted by the French *V. tubiashii* cultivated on two agar plates (LBSA and MA) and in two liquid media (LBS and MB) was tested on oysters. A mortality of 45 % was observed two days after injection of oysters only with ECPs produced on LBSA (LBSA-ECPs) (Table 2). No mortality was observed with ECPs produced in LBS, MB and MA, like in controls (Tris-HCl buffer or SASW). In addition, azocaseinase assays demonstrated that LBSA-ECPs, MA-ECPs and MB-ECPs contained two fold higher protease activity compared to those of LBS-ECPs (Table 2).

Table 2: Toxicity and protease characterization of French *V. tubiashii* ECPs produced on MB, LBS, MA and LBSA.

ECPs/culture media 5µg/g	Percentage of mortality ^a (%)	Azocaseinase Activity (UP) ^b	Residual activity ^c (%)	
			Phen 10mM (metalloprotease inhibitor)	PMSF 10mM (serine protease inhibitor)
ECPs produced in MB = MB-ECPs	0	2886 ± 72	27 ± 3	82 ± 5
ECPs produced in LBS = LBS-ECPs	0	1504 ± 96	11 ± 5	41 ± 5
ECPs produced in MA = MA-ECPs	0	2836 ± 48	56 ± 3	86 ± 1
ECPs produced on LBSA = LBSA-ECPs	45 ± 8	2990 ± 108	27 ± 4	97 ± 1
Tris HCl 50mM	0	-	-	-

^a Toxicity of different ECPs to *C. gigas* calculated by dividing the cumulative number of dead oysters with the total number of oysters injected multiplied by 100. Two independent experimental infections were carried out.

^b One unit of azocaseinase (UP) activity was defined as the amount of ECPs that caused an increase of 0.01 absorbance unit after a 2 h incubation at 22°C.

^c Azocaseinase activity of ECPs without the addition of inhibitors was taken to be 100%. % of residual activity was calculated as described by Mersni Achour *et al* (2014) based on an average of two independent experiments. PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride; Phen: 1,10-phenanthroline

The addition of 1, 10-phenanthroline (a metalloprotease inhibitor) into the reaction mix strongly inhibited azocaseinase activity of all ECPs, with a loss of 90 % of activity for LBS-ECPs, about 73 % for MB-ECPs and LBSA-ECPs and 45 % for MA-ECPs. Azocaseinase activity was slightly affected by the presence of PMSF (a serine protease inhibitor) for LBSA-ECPs, MA-ECPs and MB-ECPs however a loss of 60% was observed for LBS-ECPs (Table 1), suggesting differences in term of both protease composition and concentration.

Typically, to evaluate virulence of *Vibrio* extracellular products, exotoxins are produced by the cellophane overlay method (Labreuche *et al.*, 2006a; Binesse *et al.*, 2008; Soto-Rodriguez *et al.*, 2012). In this study, to test the toxicity of the French *V. tubiashii* ECPs, two physical states of a culture medium were used: solid medium to mimic *in vivo* conditions (colonization, adhesion...) and broth medium to reflect body fluids, where bacteria can be found after a detachment from the infection site or a rupture of a tissue that forms a natural physical barrier (Lorian, 1989).

The difference observed between ECPs in terms of toxicity or proteases composition could be explained by Quorum sensing (QS) process. It was reported that QS signal production levels, which differs between planktonic (free-living) and biofilm cells (surface-attached) (Chopp *et al.*, 2003) is known to modulate the expression of virulence gene for a large range of bacteria (Antunes *et al.*, 2010; Natrah *et al.*, 2011). For *V. harveyi*, extracellular toxins, such as a metalloproteases, a type III secretion system and a siderophore were quorum sensing dependent (Defoirdt *et al.*, 2008; Natrah *et al.*, 2011). Also, it was shown that cell-to-cell communication phenomenon has effects on virulence factor expression of *V. splendidus* and *V. aestuarianus* (De Decker *et al.*, 2013).

Moreover, bacteria behavior depends not only on the physical state of culture medium, but also on the composition and concentration of medium compounds that affect bacteria metabolisms. Mortality observed with LBSA-ECPs but not with MA-ECPs, could be explained by the effect of the medium composition on toxin secretions. MA contains different types of minerals (14 salts) that nearly duplicate the major mineral composition of sea water. However, LBSA contains only sodium chloride as a salt. Presumably, the difference in salt composition between the two media might be disadvantageous for protease production, a cellular activity implicated in metabolism, survival and pathogenicity (Shinoda *et al.*, 1996). Indeed, it has been described that protease activity of polymorphonuclear neutrophils was

affected by a complex interaction of salts (Erz *et al.*, 1993) and some salts as NaCl, KBr or KI reduced proteolytic activity of H IV.1 protease (Wondrak *et al.*, 1991). Also it was reported that the addition of $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ on Trypticase Soy broth increased protease production of *Micrococcus sp* by 45% (Mohedano *et al.*, 1997). Furthermore, Lee *et al* (2002) showed that *V. carchariae* grown on solid medium as peptone, nutrient or brain heart infusion agar, produces higher protease activities than on tryptic soy agar (TSA). According to the authors, it seemed that proteinaceous materials derived from animal enhanced protease production more than the plant source (TSA). Recent studies showed that even if *V. cholerae* O1 produces Cholerae Toxin (CT) in various settings, the biotype El Tor and O139 strains require specific growth conditions for CT induction (Cobaxin *et al.*, 2014).

2. Proteomics analyses of different ECPs

Bacteria ECPs produced on different media culture were characterized firstly by one dimensional electrophoresis: SDS-PAGE and zymography. Analysis of ECPs with SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated a rich protein profile for ECPs from solid media (LBSA and MA) compared to ECPs from liquid media (MB and LBS) (Fig.1A). Protein profile of ECPs produced on LBSA is more complex in terms of the number and intensity of bands detected compared to other protein profiles following a staining with SYPRO Ruby.

For zymography analysis, a protease activity, resulted by digestion of azocaseine copolymerized in SDS-PAGE gel, was observed in all ECPs with different levels of digestion (Fig.1B). A significant smear on the upper half of the gel and some individual halo seems to characterize ECPs derived from MB, MA and LBSA. This could reflect the richness and diversity of proteases present in these ECPs contrary to ECPs obtained from LBS medium which showed less intense bands. It should also be noted that zymography profile of ECPs produced on LBSA appeared more intense and diverse compared to other profiles. These results suggested that LBSA medium enhanced azocaseinase protease production by the bacteria in comparison with MA, MB and LBS ones.

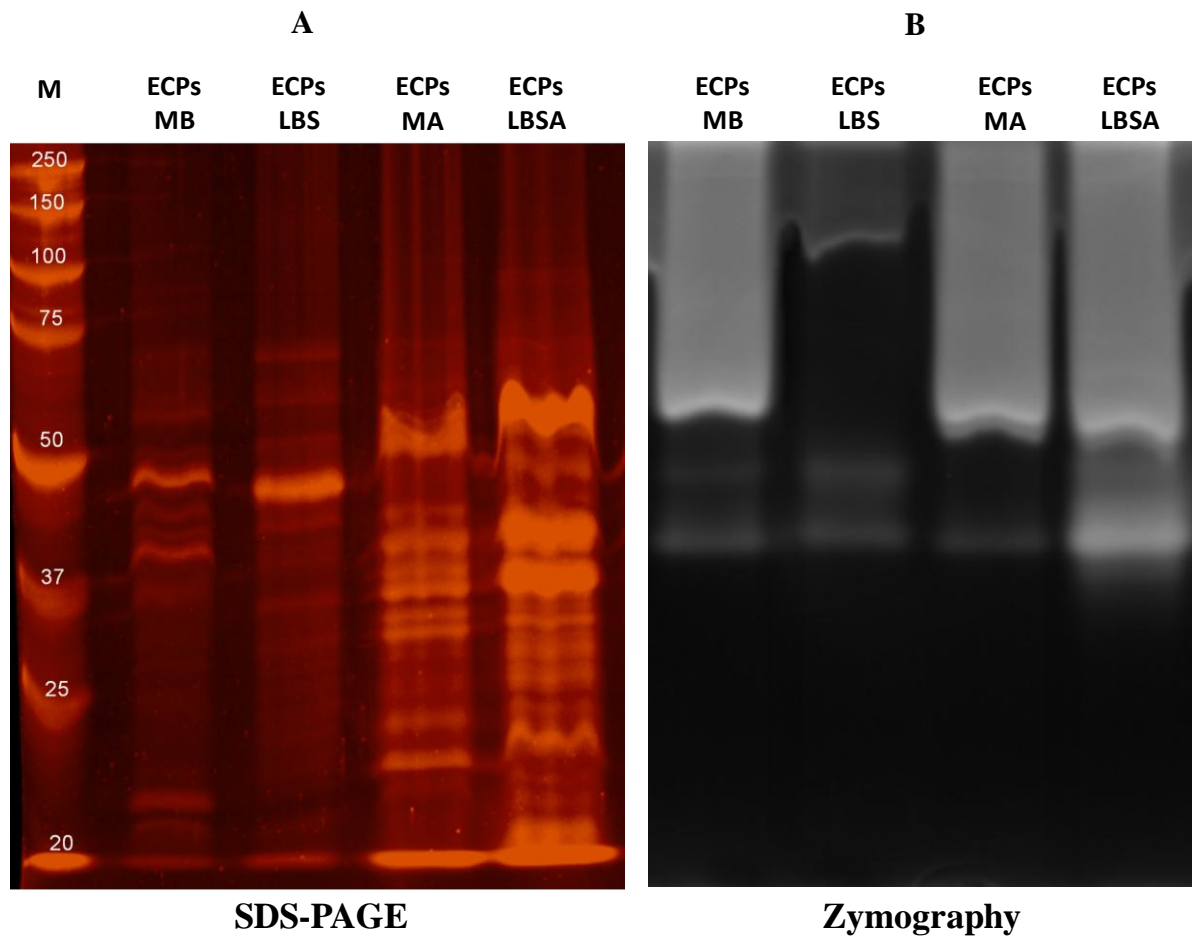


Figure 1: (A) SDS-PAGE and (B) azocasein zymography analyses of *V. tubiashii* ECPs derived from diverse culture media (MB, LBS, MA and LBSA). SDS-PAGE (20 µg per well) was carried out on a 10% polyacrylamide gel and the gel was stained with SYPRO Ruby. Protease activity (20 µg per well) was detected using 10% SDS-PAGE gel co-polymerized with 5mg ml⁻¹ of azocasein and stained with Coomassie brilliant blue.

The influence of the growth medium composition was already demonstrated by a study of Hare *et al.* (1983). They observed a difference on ECPs protease composition from *V. alginolyticus* cultivated on the presence or absence of histidine and at different temperatures. They demonstrated also, using gelatin SDS-PAGE, that without the addition of histidine in culture medium and cell growth at 30°C, more protease bands were visualized.

As proteomics analyses became an indispensable tool to detect proteins and post-translational modifications which cannot be predicted by mRNA expression analysis (Sauer, 2003), a 2-D separation over an isoelectric point range from 3 to 10 coupled with MS-MS analyses were carried for ECPs produced on LBSA, MA and LBS (Fig. 2 and Table 3). Only identifications with high confidence interval (CI%) and peptides with ions score were conserved. LBSA ECPs 2D-pattern showed the most complex profile compared with a majority of spots (16/25) that corresponded to zinc metalloproteases with an apparent molecular weight about 66.08 kDa. Besides, other proteins as outer membrane protein, oxidative stress defense protein and hypothetical proteins were found in LBSA ECPs. For MA ECPs, in addition to the extracellular zinc metalloprotease, an N-acetylglucosamine-binding protein and a porin like protein were detected. For LBS-ECPs, only three spots were identified. They corresponded to a zinc metalloprotease, a hypothetical protein and a porin-like protein H precursor.

It should be noticed that for the three ECPs, the difference in spot positions on the gel corresponding to zinc metalloprotease could be consequences of post-translational modifications as phosphorylation and/or glycosylation. Previously, it was reported that the HEXXH metalloprotease family, to which belonged our bacteria's metalloprotease (gi: 57460937) is the only family of these proteases so extensively modified posttranslationally by both *N*-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol addition in addition to the N-terminal ends processing (McGwire & Chang, 1996). Only gels having resolved ECPs produced on LBSA exhibited spots with high molecular weight. These spots identified majoritarly as zinc metalloprotease were not present in gel resolving ECPs produced on MA and LBS and could thus correspond to LBSA-ECPs specific factor potentially linked to the toxicity of the French *V. tubiashii* ECPs. To our knowledge, this is the first study characterizing the influence of nature of growth medium on *V. tubiashii* ECPs using 2-D separation coupled with MS-MS analysis. Binesse *et al.* (2008) have used similar tool to compare cytotoxic proteins from the wild *V. splendidus* LGP32 and the mutant lacking Vsm (*V. splendidus* metalloprotease). They found that the mutant strain Δ vsm produce another metalloprotease to compensate probably the missing of the Vsm.

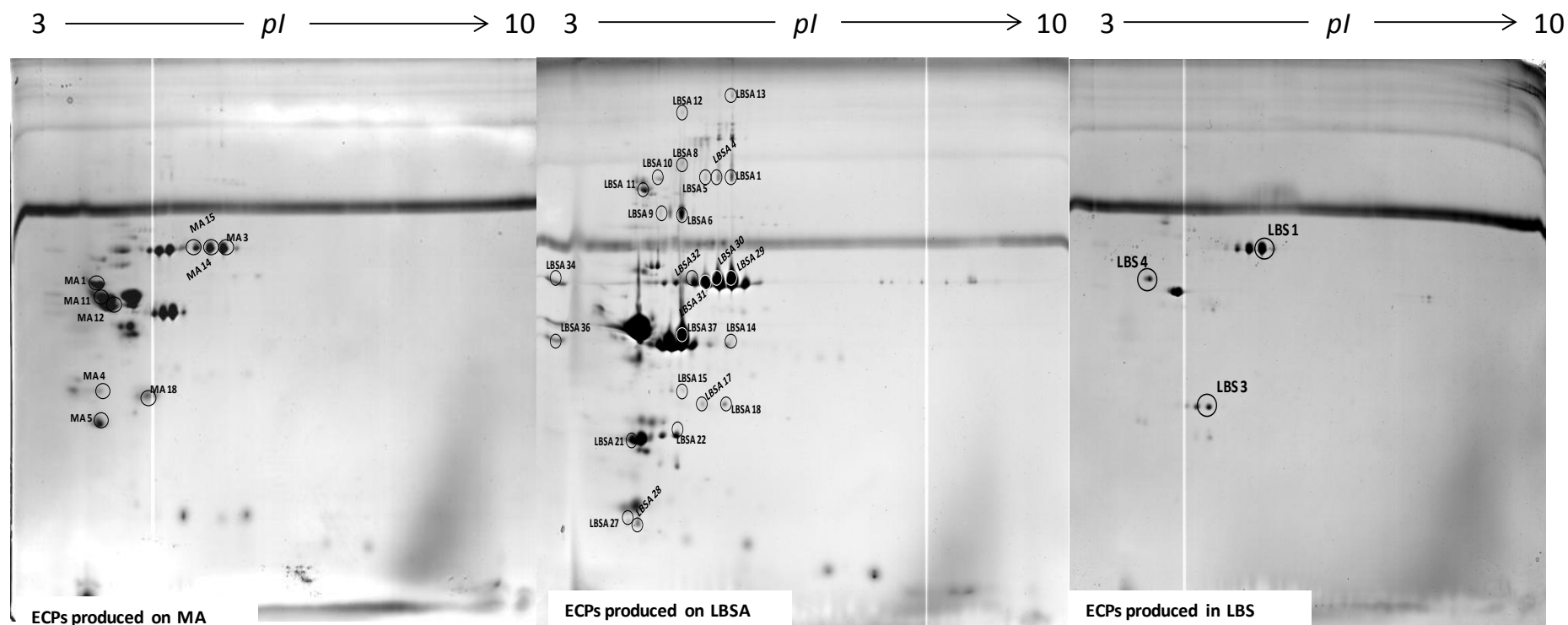


Figure 2: Comparison of 2-DE patterns of ECPs produced on different media (MA, LBSA and LBS). Proteins (50 µg loaded) were separated over pH range 3–10 (13cm strips) and gradient (10–15 %) SDS-polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue. Numbered spots corresponded to those showing qualitative differences. Each gel is representative of two independent replicates.

Table 3: MALDI TOF–TOF mass spectrometry identification of proteins in *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs produced from different culture medium (LBSA, MA and LBS). Only proteins with CI% (Confidence Interval) > 99% and peptides with ions score were presented.

A: ECPs from *V. tubiashii* cultured on LBSA

Spot	Protein name	Accession number	Mascot scores		Matched peptides	% Sequence coverage	Theoretical	
			Protein score/protein score CI%	Total ion score/total ion CI%			MW (kDa)	pI
LBSA1	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	554/100	526/100	14	23	66.08	5.22
LBSA4	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	345/100	321/100	13	22	66.08	5.22
LBSA5	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	302/100	279/100	13	22	66.08	5.22
LBSA6	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	178/100	172/100	8	21	66.08	5.22
LBSA8	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	275/100	267/100	8	21	66.08	5.22
LBSA9	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	157/100	147/100	9	16	66.08	5.22
LBSA10	Outer membrane protein assembly factor	343500502	66/99.86	66/100	6	11	89.59	4.86
LBSA11	Ferrichrome-iron receptor	343502500	416/100	375/100	20	33	82.91	4.77
LBSA12	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	517/100	504/100	9	14	66.08	5.22
LBSA13	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	314/100	305/100	9	21	66.08	5.22

Résultats: Article III

LBSA14	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	257/100	240/100	11	18	66.08	5.22
LBSA15	oxidative stress defense protein	343498185	201/100	193/100	4	22	25.401	4.85
LBSA17	Hypothetical protein	343502059	98/100	83/100	7	38	24.04	5.65
LBSA18	Hypothetical protein	343502059	160/100	135/100	9	45	24.04	5.65
LBSA21	Hypothetical protein	343502059	155/100	140/100	6	44	24.04	5.81
LBSA22	Hypothetical protein	343502059	935/100	905/100	9	51	24.04	5.81
LBSA27	Outer membrane protein OmpA	343502052	174/100	174/100	3	11	35.02	4.46
LBSA28	Hypothetical protein	343502059	140/100	140/100	2	15	24.04	4.71
LBSA29	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	442/100	420/100	13	26	66.08	5.22
LBSA30	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	700/100	670/100	15	31	66.08	5.22
LBSA31	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	731/100	704/100	14	31	66.08	5.22
LBSA32	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	84/99.99	84/100	5	11	66.08	5.22
LBSA34	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	661/100	632/100	14	24	66.08	5.22
LBSA36	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	281/100	267/100	10	14	66.08	5.22
LBSA37	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	562/100	543/100	12	24	66.08	5.22

B: ECPs from *V. tubiashii* cultured on MA

Spot	Protein name	Accession number	Mascot scores		Matched peptides	% Sequence coverage	Theoretical	
			Protein score/protein score CI%	Total ion score/total ion CI%			MW (kDa)	pI
MA1	Porin-like protein H precursor	343502123	879/100	845/100	12	55	36.92	4.40
MA3	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	639/100	610/100	14	26	66.08	5.22
MA4	N-acetylglucosamine-binding protein A	343503266	383/100	372/100	8	17	53.09	4.70
MA5	N-acetylglucosamine-binding protein A	343503266	301/100	292/100	6	15	53.09	4.55
MA11	Outer membrane protein	343502149	486/100	479/100	5	27	35.26	4.49
MA12	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	111/100	111/100	5	12	66.08	5.22
MA14	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	195/100	181/100	10	15	66.08	5.22
MA15	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	187/100	173/100	10	15	66.08	5.22
MA18	N-acetylglucosamine-binding protein A	343503266	185/100	185/100	5	10	53.09	4.55

C: ECPs from *V. tubiashii* cultured on LBS

Spot	Protein name	Accession number	Mascot scores		Matched peptides	% Sequence coverage	Theoretical	
			Protein score/protein score CI%	Total ion score/total ion CI%			MW (kDa)	pI
LBS1	Extracellular zinc metalloprotease	343500312	620/100	598/100	12	21	66.08	5.22
LBS3	Hypothetical protein	343502059	387/100	367/100	7	34	24.04	5.81
LBS4	Porin-like protein H precursor	343502123	534/100	508/100	11	53	36.92	4.40

3. Differential relative gene expression of the French *V. tubiashii* cultivated on different media

The relative gene expression of metalloprotease, thermostable hemolysin and exochitinase of the French *V. tubiashii* 07/118 T2 grew on LBSA, MA and LBS was analysed. Because these proteins were usually described as potential toxins secreted by the genus *Vibrio* (Actis *et al.*, 1986; Fabbri *et al.*, 1999; Binesse *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2012). Results demonstrated a difference in *V. tubiashii* hemolysin, metalloprotease and exochitinase gene expression between media (Fig. 3). For metalloprotease gene expression, transcriptomic results obtained sustain results obtained with proteomics analyses: solid medium (LBSA and MA) enhances the production of metalloproteases compared to the liquid medium (LBS). The thermostable hemolysin gene expression of the *V. tubiashii* cultivated on MA was up regulated about 14 times compared to bacteria grown in LBS and on LBSA medium. Exochitinase is more expressed when bacteria are grown on LBSA than LBS and MA. The effect of culture medium nature on bacterial genes expression has been already described. For example, for *V. salmonicida*, a cause of cold-water vibriosis in seawater-farmed Atlantic salmon, studies showed that the levels of flagellin expression are significantly higher under elevated salt conditions than at lower salinity (Karlsen *et al.*, 2008).

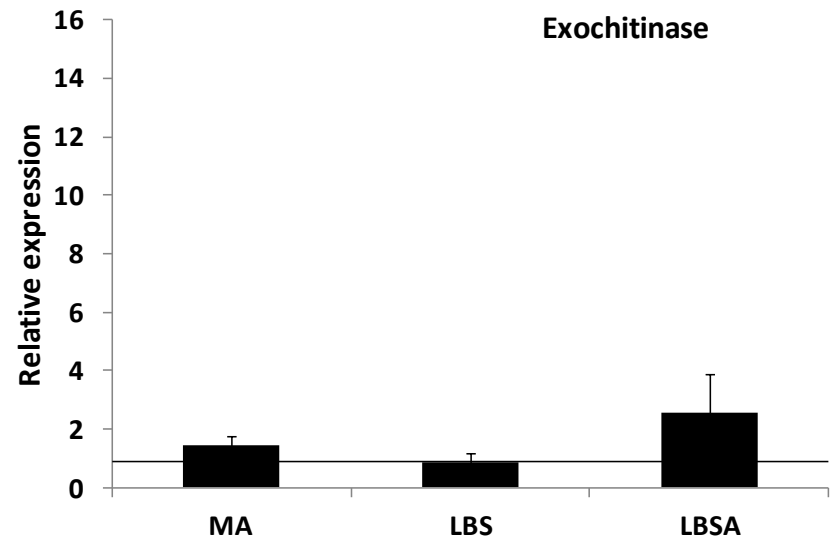
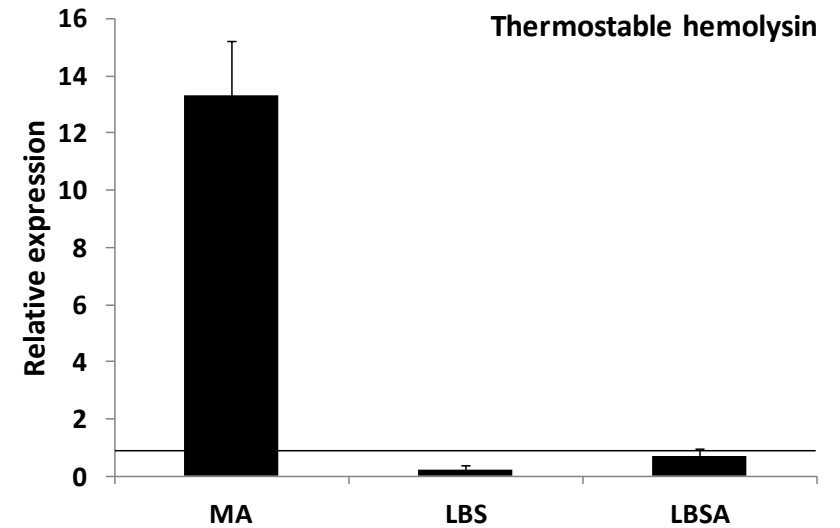
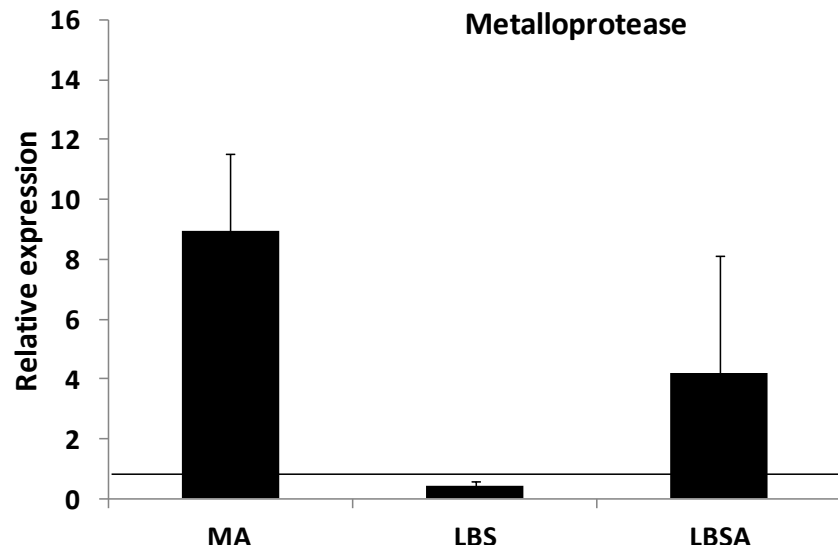


Figure 3: Relative expression of some virulence factors from *Vibrio tubiashii* grown on different culture media. The level of expression of the target genes was normalized to the *gyrB* housekeeping gene and was calculated using the $(1+effecacity)^{-\Delta\Delta Ct}$ formula with reference celles grown in MB. The error bars indicate standard deviation of three biological replicates per time of infection. The line corresponds to the threshold of expression (relative expression >1 means up-regulated).

Conclusion

In this present study, using experimental infections, proteomics and transcriptomics approach, we showed that the physical state and the composition of growth media culture affect the French *V. tubiashii* behavior regarding toxin production in terms of composition and concentration. Interestingly, the toxicity of the French *V. tubiashii* ECPs seems to not be linked to the over expression of metalloprotease even if it is dominant in the secretome but probably to other virulence factors or a specific metalloprotease post-translational modification forms. Therefore, further studies are underway to explain the importance this assumption.

Acknowledgements

This work was carried out with financial support by a Ph.D grant from the CNRS and IFREMER for R. Mersni-Achour (2010-2013). The PRES (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur) of Limousin Poitou-Charentes and the FR CNRS 3097 «Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable» are acknowledged for financial support through the research project «Caractérisation *in vitro* des effets de métalloprotéases sur différents types cellulaires de l'huître creuse *C. gigas*». Thanks go to the platform “Structural and Functional Mass Spectrometry Facility, Jacques Monod Institute, UMR7592 CNRS – Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité” and especially to T. Léger and C. Garcia for mass spectrometry analysis

References

- Actis, L. A., Fish, W., Crosa, J. H., Kellerman, K., Ellenberger, S. R., Hauser, F. M. & Sanders-Loehr, J. (1986). Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J Bacteriol* **167**, 57–65.
- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C. & Finlay, B. B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* **156**, 2271–2282.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D. & Roux, F. L. (2008). Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7108–7117.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Chopp, D. L., Kirisits, M. J., Moran, B. & Parsek, M. R. (2003). The dependence of quorum sensing on the depth of a growing biofilm. *Bull Math Biol* **65**, 1053–1079.
- Cobaxin, M., Martínez, H., Ayala, G., Holmgren, J., Sjöling, Å. & Sánchez, J. (2014). Cholera toxin expression by El Tor *Vibrio cholerae* in shallow culture growth conditions. *Microb Pathog* **66**, 5–13.
- Cohen, N. & Karib, H. (2007). *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche: Risques et prévention.
- De Decker, S., Reynaud, Y. & Saulnier, D. (2013). First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* **392–395**, 1–7.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. & Bossier, P. (2008). Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from in vivo work. *ISME J* **2**, 19–26.
- Elston, R. A., Hasegawa, H., Humphrey, K. L., Polyak, I. K. & Häse, C. C. (2008). Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis Aquat Organ* **82**, 119–134.
- Erz, W., Carrle, D. & Klessen, C. (1993). Proteases of polymorphonuclear neutrophils: Influence of different salts and buffers on pericellular lysis. *Acta Histochem* **94**, 46–53.
- Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A. & Fiorentini, C. (1999). *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells. *Infect Immun* **67**, 1139–1148.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J. & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J Sea Res* **75**, 135–141.
- Hare, P., Scott-Burden, T. & Woods, D. R. (1983). Characterization of Extracellular Alkaline Proteases and Collagenase Induction in *Vibrio alginolyticus*. *J Gen Microbiol* **129**, 1141–1147.
- Hasegawa, H. & Häse, C. C. (2009b). TetR-Type Transcriptional Regulator VtpR Functions as a Global Regulator in *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7602–7609.

- Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A. & Häse, C. C. (2008). The Extracellular Metalloprotease of *Vibrio tubiashii* Is a Major Virulence Factor for Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4101–4110.
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D. N., Lind, E. J. & Häse, C. C. (2009). Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **85**, 123–131.
- Karlsen, C., Paulsen, S. M., Tunsjø, H. S., Krinner, S., Sørum, H., Haugen, P. & Willassen, N.-P. (2008). Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen *Vibrio salmonicida*: Effects of salinity and temperature. *Microb Pathog* **45**, 258–264.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C. & Nicolas, J. (2006a). Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **30**, 367–379.
- Lee, K. K., Liu, P. C. & Chuang, W. H. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar Biotechnol N Y N* **4**, 267–277.
- Lorian, V. (1989). *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the culture medium. *J Clin Microbiol* **27**, 2403–2406.
- Lorian, V. (1988). Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 1600–1601.
- McGwire, B. S. & Chang, K.-P. (1996). Posttranslational Regulation of a Leishmania HEXXH Metalloprotease (gp63). *J Biol Chem* **271**, 7903–7909.
- Mohedano, A. f., Fernández, J., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1997). Effect of pH, temperature and culture medium composition on the production of an extracellular cysteine proteinase by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J Appl Microbiol* **82**, 81–86.
- Natrah, F. M. I., Ruwandeepika, H. A. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P. & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Vet Microbiol* **154**, 124–129.
- Paillard, C., Le Roux, F. & Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat Living Resour* **17**, 477–498.
- Park, S., Lee, J. & Lee, W. (2000). Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *J Microbiol* **38**, 224–229.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Romalde, J. L. & Barja, J. L. (2010). Bacteria in molluscs: good and bad guys. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* **1**, 136–147.
- Romalde, J. L., Dieguez, A. L., Lasa, A. & Balboa, S. (2014). New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol* **4**, 413.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**, 219.
- Shinoda, S. & Miyoshi, S.-I. (2011). Proteases Produced by Vibrios. *Biocontrol Sci* **16**, 1–11.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., Wakae, H., Rahman, M. & Tomochika, K.-I. (1996). Bacterial Proteases as Pathogenic Factors, with Special Emphasis on *Vibrio* Proteases. *Toxin Rev* **15**, 327–339.
- Soto-Rodríguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A. L. & Romalde, J. L. (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the ‘Bright-red’ Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol* **109**, 307–317.
- Thompson, F. L., Iida, T. & Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 403–431.

- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C. G., Renault, T. & other authors. (In press).** First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J Invertebr Pathol*.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E. & Leifson, E. (1965).** Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology. *J Bacteriol* **90**, 1036–1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R. & Sakazaki, R. (1970).** Marine Vibrios Associated with Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. *J Bacteriol* **103**, 271–272.
- Wondrak, E. M., Louis, J. M. & Oroszlan, S. (1991).** The effect of salt on the Michaelis Menten constant of the HIV-1 protease correlates with the Hofmeister series. *FEBS Lett* **280**, 344–346.
- Wong, S. K., Zhang, X.-H. & Woo, N. Y. S. (2012).** *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture* **330–333**, 29–36.

C/ La caractérisation moléculaire des facteurs de virulence produits par la souche française *V. tubiashii*

La souche *V. tubiashii* est un agent pathogène affectant les larves et les juvéniles de mollusques bivalves (Tubiash *et al.*, 1965 ; 1970). Elle a été détectée dans plusieurs endroits du monde (Amérique, Angleterre, Espagne et France) (Tubiash *et al.*, 1965; Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987; Estes *et al.*, 2004; Travers *et al.*, 2014). Cette souche est responsable d'une maladie nommée nécrose bacillaire caractérisée par une réduction de la motilité des larves et la formation d'amas bactériens autour de la coque et les organes internes (Tubiash *et al.*, 1965; Estes *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré l'implication de toxines extracellulaires dans la virulence de *V. tubiashii* (Brown & Roland, 1984; Kothary *et al.*, 2001; Delston *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2008).

Dans l'objectif de caractériser les mécanismes et les facteurs de virulence responsable de la pathogénicité de la souche française *V. tubiashii*, nous avons utilisé le modèle larvaire d'huîtres creuses *C. gigas* de 13 jours. La souche 07/118 T2 a montré une virulence remarquable envers les larves d'huîtres avec une DL₅₀ d'environ $2,3 \times 10^3$ CFU/ ml après 24 h d'infection). Les observations morphologiques indiquent qu'elle induit des symptômes semblables à ceux de la nécrose bacillaire et qui se manifestent par une réduction de la motilité larvaire et la formation d'amas bactériens autour des organes et des débris cellulaires. En outre, le surnageant bactérien total et les deux fractions obtenues par GP-HPLC ont montré une toxicité pour les larves avec un phénotype similaire mais pas complet par rapport à celui observé avec la souche vivante. Ce dernier résultat suggère que l'étape du fractionnement de l'ECPs brut a conduit à perdre un certain nombre de facteurs et/ou leur synergie d'action qui semble fondamentale à l'expression de ces anomalies larvaires. En conséquence, il nous est apparu nécessaire à ce stade du travail d'analyser plus finement le contenu moléculaire de ces deux fractions. Une électrophorèse 2-DE suivie d'une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF de spots protéiques résolus ont été menés.

L'analyse des spots protéiques des deux fractions obtenues a révélé l'existence (i) d'une métalloprotéase extracellulaire (caractéristique de la fraction 2) différente de métalloprotéases

décrites comme facteurs de virulence chez les souches de *V. tubiashii* américaines (Hasegawa & Häse, 2009b; Hasegawa *et al.*, 2008, 2009) et (ii) d'autres facteurs de virulence comme les porines et les protéines de la membrane externe (fraction 1).

La diversité et l'action séquentielle des facteurs de virulence sécrétés par cette souche ont été également suggérées par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et par l'étude de l'expression de gènes codant pour trois potentiels facteurs de virulence (une métalloprotéase, une hémolysine thermostable et une exochitinase). En effet, ni l'ajout de l'EDTA (un inhibiteur de métalloprotéase) ni l'inactivation de la bactérie par la chaleur ont réussi à restaurer la viabilité larvaire alors que les traitements combinés EDTA/chaleur l'ont permis. Enfin, les gènes codant pour la métalloprotéase et l'exochitinase sont sous-exprimés pendant les premières heures de l'infection puis surexprimés au-delà de 16 h d'infection. Le gène codant pour une hémolysine thermostable est quant à lui sur-exprimé à tous les temps analysés.

Ces principaux résultats suggèrent que la toxicité des ECPs de la souche française 07/118 T2 n'est pas due seulement à un facteur unique, la métalloprotéase, mais probablement à la conjonction d'un ensemble de facteurs.

La différence de sécrétion de la métalloprotéase et du gène de l'hémolysine au cours de l'infection a été aussi corrélée aux dosages de l'activité métalloprotéasique et hémolytique *in vitro* dans le surnageant de culture de la souche 07/118 T2 dans le milieu LBS (Figure 21) (un résultat complémentaire non inclus dans l'article 4).

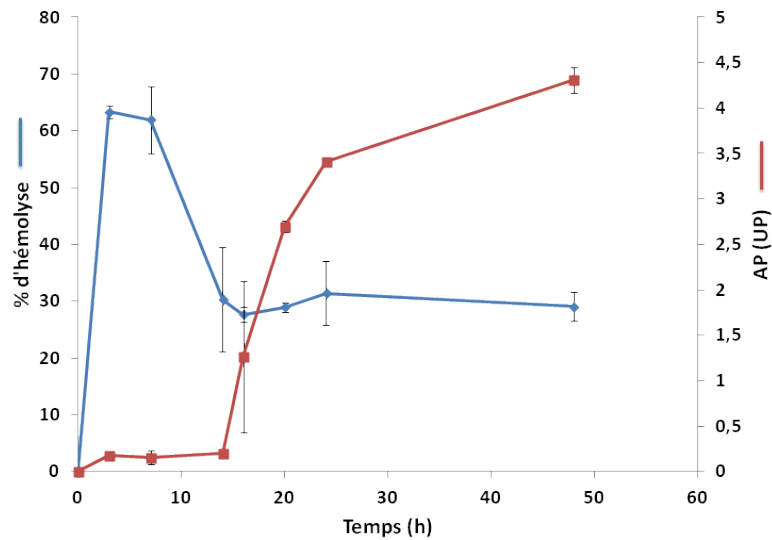


Figure 21: Relation entre le pourcentage d'hémolyse (courbe en bleu) et l'activité protéasique (AP) (courbe en rouge) au cours de la croissance de la souche 07/118 T2. Le % d'hémolyse a été mesuré à l'aide du sang de mouton dans des plaques 96 puits pour chaque point de la cinétique par rapport à un contrôle (milieu LBS) (Lee *et al.*, 2002) L'activité protéasique a été mesurée en utilisant l'azocaséine comme substrat (Teo *et al.*, 2003b). Expérience réalisée en duplicat.

Les résultats obtenus font l'objet d'un quatrième article qui sera soumis à la revue «Microbiology».

Article IV: MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF THE FRENCH V. TUBIASHII VIRULENCE FACTORS ON OYSTER'S LARVAE GIVE EVIDENCES THAT METALLOPROTEASE IS NOT THE ONLY MAIN TOXIC FACTOR

(Prepared for submission in the journal “Microbiology”)

Mersni-Achour Rachida^{1,2,5}, Ben Cheikh Yosra¹, Pichereau Vianney³, Doghri Ibtissem¹, Etien Cédric¹, Dégremont Lionel², Saulnier Denis^{2,4}, Fruitier-Arnaudin Ingrid^{1,5}, Travers Marie-Agnès²

¹UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs, Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé, Université de La Rochelle, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

²Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

³Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin LEMAR, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, 29280 Plouzané, France.

⁴Ifremer, Centre Ifremer du Pacifique, UMR 241 Ecosystèmes Insulaires Océaniques, Tahiti, 98719 Taravao, French Polynesia.

⁵Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable, FR CNRS 3097, Université de La Rochelle, France

Abstract

Vibrio tubiashii is a reemerging pathogen isolated from larval and juvenile bivalve molluscs causing bacillary necrosis. Recent studies demonstrated the isolations of this species in a French experimental hatchery/nursery affecting *Crassostrea gigas* spat in 2007. Here, using larvae of *C. gigas* as an interaction model, we showed that the French *V. tubiashii* is virulent to larvae and can cause bacillary necrosis symptoms with a LD₅₀ about 2.3×10^3 cfu ml⁻¹ after 24 h. Moreover, complete or GP- HPLC fractionated extracellular products (ECPs) of this strain appeared toxic to larvae. MS-MS analysis of the different ECPs fractions revealed the existence of an extracellular metalloprotease and other suspected virulence factors. This observation is also supported by the expression level of some potential virulence factors.

The overall results suggest that the pathology caused by the French *V. tubiashii* in *C. gigas* oysters is caused by a group of toxic factors

Keywords

Crassostrea gigas; larvae; pathogenicity; toxins; mass spectrometry

Introduction

Marine *Vibrio* species are considered as the most serious problem affecting hatchery-reared oyster larvae (Tubiash *et al.*, 1970; Sugumar *et al.*, 1998; Hada *et al.*, 1984; Estes *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008). Among these species, *V. tubiashii* is one of the main causative agents of larval and juvenile bivalve mollusc mortalities in hatcheries. Originally found on the east coast of America isolated from diseased hard-shell clams (Teo *et al.*, 2003; Miyoshi *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2009; Labreuche *et al.*, 2010), in England and Spain isolated from Pacific and flat oysters (Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987), *V. tubiashii* has been detected in recent decades in North of America infecting new hosts, the Pacific and Kumamoto oysters and Geoduck clams (Elston *et al.*, 2008) and very recently in France in diseased Pacific oysters and abalone (Travers *et al.*, 2014). Strains of this species are known to cause bacillary necrosis in mollusc larvae. This disease is clinically characterized by a reduction in larval motility and an increase in soft-tissue necrosis (Tubiash *et al.*, 1970). Considering the potential impact of this bacterium, complete genomes were recently sequenced (*V. tubiashii* ATCC 19106, ATCC 19109^T) (Temperton *et al.*, 2011) and will obviously allow the exploration of potentially encoded virulence factors.

It has been well described that marine *Vibrio* species produce a variety of extracellular products (ECPs) as potential pathogenic factors during infection steps (Shinoda & Miyoshi, 2011). With regards to the American *V. tubiashii*, Nottage *et al.* (1989) were the first to describe toxins produced by this strain; a proteinase and a ciliostatic toxin. Subsequently, Kothary *et al.* (2001) showed that *V. tubiashii* could produce a cytotoxin with cytotoxic and cytolytic properties and Delston *et al.* (2003) demonstrated that this species secretes a metalloprotease that shows a highly similar to others produced by pathogenic marine vibrios. Finally, Hasegawa *et al.* (2008, 2009) confirmed that the *V. tubiashii* metalloprotease acts as one of the critical factors explaining the toxicity of its extracellular products to Pacific oyster larvae.

The concept of sequential expression of virulence factors depending on bacterial environment was shown for *V. cholerae* toxin-coregulated pilus (a colonization factor) and choleric toxin (CT) (Krukonis & DiRita, 2003). In *V. tubiashii*, Hasegawa *et al.* (2009b) observed a sequential secretion of haemolytic and metalloproteasic activities in bacterial supernatant during growth kinetics, probably explained by the degradation of hemolysin by the metalloprotease(s) expressed in the late exponential phase.

The occurrence of the sequential expression of virulence factors clearly shows that virulence is most often multifactorial and that bacterial pathogenicity is the result of the association of several virulence determinants which differ according to the pathogen, the host, and the type of infection (Jacques, 2004; Valiente *et al.*, 2008; Paranjpye *et al.*, 2013).

In a previous study, Travers *et al.* (2014) reported the isolation of a group of strains, close to the American *V. tubiashii*, found in an experimental hatchery/nursery of *C. gigas* spat during mortality events in France in 2007. These isolates and their ECPs showed a significant virulence to juvenile Pacific oysters in experimental challenges. Moreover, Mersni *et al.* (under review) demonstrated that the extracellular products of 07/118 T2, a representative strain of the group, inhibited the adhesion capacity and phagocytosis activity of *C. gigas* hemocytes. Biochemical analyses showed that the proteolytic fraction of ECPs majority contain active and thermostable extracellular zinc metalloprotease(s).

This present study aims at (i) reproducing the pathogenicity of the French *V. tubiashii* and the toxicity of its ECPs on Pacific oyster larvae, and (ii) characterizing some potential virulence factors supporting the pathogenicity of the French *V. tubiashii* 07/118 T2. Therefore, experimental infections coupled with microscopic observations were performed, and the expression of some potential virulence factors during infection was monitored. Finally, the fractionation of ECPs and proteomic analysis of the purified material were conducted to access the molecular diversity of this bacterial secretome.

Material and methods

1. Bacteria growth conditions

V. tubiashii 07/118 T2 (LMG 27884 = CECT 8426) (Travers *et al.*, 2014), *V. coralliilyticus* 06/210 (Genard *et al.*, 2013) and *V. nigripulchritudo* LMG3896^T (Le Roux *et al.*, 2011) were used in this study. Bacteria were grown in Luria-Bertani medium (Difco) supplemented with 1% sodium chloride (LBS) and stock culture was stored at -80°C in LBS containing glycerol 15% (v/v).

2. Larval production

Larval production was achieved according to the protocol described by Dégremont *et al.* (2005) at the Ifremer hatchery in La Tremblade. Briefly, fifteen *C. gigas* oysters were randomly sampled from a wild population of the Marennes-Oléron Bay. Oysters were opened, and a sample of the gonad was analyzed under microscope in order to separate the oysters by sex. Eggs were collected by stripping of the gonad, as well as the sperm, and after cleaning the gametes by appropriate sieving, mating was carried out. Larvae were reared in 30-liter tanks at 26 °C in filtered sea water, which was changed 3 times per week. The larvae were fed daily with a mixed diet of cultured phytoplankton (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum*). When larvae were retained on a 150 µm screen, they were transferred into the laboratory and then tested with different *Vibrio* strains. At this step, larvae were 13 days old and their shell length were between 200 to 300 µm.

3. Preparation of *V. tubiashii* ECPs, fractionation and biochemical assays

Extracellular products were produced using the cellophane overlay method as described previously by Travers *et al.* (2014). Briefly, bacteria were grown in 5 ml of LBS at 22 °C for 18 h. A volume of 1 ml of exponential phase culture (OD₆₀₀=1) was spread on a sterile cellophane film overlying LBSA (LBS Agar) plates. After 48 h of incubation at 22 °C, the cells were washed off the cellophane using 10 ml of cold sterile artificial sea water (SASW) and removed by centrifugation at 3,000 × g (45 min at 4°C). The supernatant was filtered at 0.22 µm and then concentrated by lyophilisation, resuspended in Tris-HCl buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0) and dialyzed against distilled water for 12 h and Tris-HCl buffer for 12 h. Finally, crude ECPs samples were stored at -80°C until use.

Crude ECPs were purified using a gel permeation-high performance liquid chromatography (GP-HPLC). This purification step was performed using a Biosuite TM 250 column (5 μm , 300 \times 7.8 mm, Waters) and conducted with a Waters system (600 Controller, 2996 Photodiode Array detector and 2707 Autosampler). 10 μg per run of crude ECPs fractions were eluted with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, at a rate of 1 ml min⁻¹ and collected according to the chromatographic profile obtained at 215 nm. Each eluted fraction obtained was concentrated by lyophilisation, resuspended in Tris-HCl buffer, assayed from protein concentration and stored at -20°C until further utilization. The column was calibrated using “Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 29, 000-700, 000 Da” (Sigma-Aldrich) following the same analysis conditions applied to the samples.

Proteins were quantified using the method described by Bradford (Bradford, 1976) using Bradford reagent (Sigma-Aldrich) and bovine serum albumin as the standard protein. Azocaseinase activity was determined as previously described (Travers *et al.*, 2014).

4. *In vivo* larval experiments

Cultures of early stationary phase (18 h) *Vibrio* strains grown in LBS at 22°C were centrifuged at 3,000 \times g for 20 min, washed twice and resuspended in sterile sea water (SSW). In a 6-well flat-bottomed plate (Falcon), 1.5 ml of ten-fold dilutions of the cell suspensions between 10 and 10⁶ cfu ml⁻¹ were added to 1.5 ml of the larval suspension at a density of about 50 larvae per well and incubated at 22 °C with a gentle stirring. *V. nigripulchritudo* was used as a non virulent control strain and *V. coralliilyticus* as a virulent one for *C. gigas* larvae. Boiled bacteria (15 min at 100 °C), some incubated with EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (at a final concentration, f.c. = 5 mM), and others not incubated with EDTA, were also tested. Further, the toxicity of different crude ECP concentrations (f.c. 10 μg , 5 μg and 2.5 μg of protein per ml) and GP-HPLC fractions of ECPs (f.c. 5 μg of proteins per ml) were tested on model larvae in the presence and absence of EDTA (preincubated with EDTA 5 mM, f.c., for 30 min).

The counting of the live larvae was carried out by visualization using a binocular microscope and a Sedgewick Rafter cell. Oyster larvae were considered dead based on microscopic examination and phenotypic observations described by Hasegawa *et al.* (2008). The percentage of live larvae was calculated with reference to live larvae incubated in SSW for the live-bacteria experiments, and with reference to the live larvae incubated with Tris-

HCl buffer for ECPs and GP-HPLC fractions. Larval survival was recorded after 24 h, three biological replicates were performed for each assay and assays were replicated independently.

Following the same protocol described above, a kinetic was performed by bathing 25 ml of larvae (about 50 larvae per ml) with 25 ml of bacteria (10^5 cfu ml⁻¹) at different times (30 min, 3 h, 6 h, 16 h, and 18 h) in aerated bottles with gentle stirring. Azocaseine activity in the bath was performed as previously described (Travers *et al.*, 2014) for each kinetic point. At the end of each kinetic point, a centrifugation at $3,000 \times g$ for 15 min was carried out and the pellet (larvae + bacteria) was conserved with RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, UK) to stabilize/fix the bacterial RNA for QPCR assays. Pellets were stored at -80°C until use. Three biological replicates were performed for each assay and assays were replicated.

5. Microscopic observations

For microscopic observations, larvae from each well were filtered and fixed in a 1 ml glutaraldehyde (0.25%) - paraformaldehyde (4%) fixation solution (Sigma-Aldrich) overnight. Pictures were taken and treated using a BX51 System Microscope (Olympus®).

6. RNA extraction and RT cDNA synthesis

Total RNA was extracted from each bacterial pellet using TRIzol® Reagent (Invitrogen), at a ratio of 1 ml Trizol per pellet according to the manufacturer's protocol. Bacterial RNA was separated using chloroform (0.2:1 chloroform:Trizol, v/v) and precipitated using cold isopropanol (0.5:1 isopropanol:Trizol). RNA pellets were washed with 1 ml of 75% ethanol and resuspended in ultrapure water. 17 µl RNA suspensions were treated with 2 µl of DNase (2U for 10 µg of RNA) (Ambion) for 45 min at 37°C. Total RNA concentration was analyzed by spectrophotometry (Nanodrop/Thermo Scientific) and a negative reverse transcription (NO-RT) QPCR with diluted RNA was performed to check RNA purity.

The RT-PCR was carried out following the protocol of SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). For the first-strand cDNA Synthesis, in a total volume of 13µl, 800 ng of total RNA was well mixed with 200 ng of random primers, 1 µl of dNTP (10 mM) and nuclease free water. The mix was incubated at 60 °C for 5 min and then chilled on ice. 1

μl of SuperScript III RT ($200 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) was added to $1 \mu\text{l}$ of RNase OUT ($40 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$), $1 \mu\text{l}$ of DTT and $4 \mu\text{l}$ of 5X buffer. The reaction mix was incubated for 5 min at $25 \text{ }^\circ\text{C}$, followed by an activation step of 60 min at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ and ending with a deactivation step of 15 min at $70 \text{ }^\circ\text{C}$. cDNA was conserved at -20°C until use.

7. Quantitative polymerase chain reaction (QPCR)

QPCR analysis was conducted on an MX3000 and MX3005 Thermocycler (Agilent) using Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). Each reaction was run in triplicate with a final volume of $20 \mu\text{l}$ containing $5 \mu\text{l}$ cDNA (1/30 dilution) and 200 nM of each primer.

Reactions were initiated with an initial denaturation for 3 min at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ followed by 40 cycles at $95 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 s and at 60°C for 20 s. Each run included blank controls (water) for each primer and fluorescence intensity was expressed in delta reporters (dR) after the background threshold was subtracted. The threshold was set using an amplification based algorithm from MX 3000-3005 software (Stratagene) for the initial plate.

For the QPCR efficiencies of each primer pair used, standard curves were generated using eight serial dilutions ($2 \cdot 10^{-1}$ to $2 \cdot 10^{-8}$) of linearized plasmid (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) containing an insert of gyrase, metalloprotease, aerobactin and thermolabile hemolysin gene obtained by PCR (Table 1) and the efficiency of exochitinase primer was generated directly with genomic 07/118 T2 DNA. The level of expression of the target genes at different kinetic times, normalized to the *gyrB* housekeeping gene, was then calculated using the $(1+\text{efficiency})^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formula (Pfaffl, 2001) with reference to the point of infection at 30 min. Used primers were designed as described previously (Article III; Achour *et al.* unpublished).

8. 2-Dimensional electrophoresis (2-DE) analyses and mass spectrometric analysis

Before isoelectric focusing, a volume corresponding to $50 \mu\text{g}$ of protein for each ECP fraction was prepared and concentrated for 2-DE analysis using the Ready Prep 2-D Cleanup kit (Biorad). The final pellet was suspended in $250 \mu\text{l}$ of Destreak Rehydration (GE Healthcare) containing 1% IPG buffer pH 3–10 (GE Healthcare) for protein solubilization. Strips were hydrated with each ECPs fraction for 15 h prior to IEF.

2-DE was carried out using the protocol described by Galland *et al.* (2013). Briefly, the first dimension was performed on linear pH 3–10 gradient IPG strips (13 cm, GE

Healthcare) in an Ettan IPGphor III isoelectric focusing system (GE Healthcare), using the following protocol: step 1: 15 min at 250 V, step 2: 2 h at 500 V, step 3: 1 h gradient to 1000 V, step 4: 2.5 h gradient to 8,000 V, and finally step 5: 1.5h at 8,000 V.

Before the second dimension, strips were equilibrated for 15 min in an equilibration solution (2% SDS, 6 M Urea, 30% glycerol (v/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.8 and BBP) containing 1% of DTT, followed by a 15-min incubation in the same solution containing 260 mM of iodoacetamide. The strips were then transferred onto vertical 10–15% gradient SDS-polyacrylamide gels (12.5 cm × 12.5 cm) and the separation was performed at 50 mA per gel. Gels were stained with coomassie blue solution (overnight) and destained in a methanol/acetic acid/water (30/7/63: v/v/v) solution. Gels were scanned with SFLauncher software and compared using the Prodigy SameSpot software (Nonlinear Dynamics).

Selected spots were manually excised from the gels and mass spectrometric analysis was performed by the "Structural and Functional Mass Spectrometry Facility" in the JACQUES MONOD Institute (CNRS and Paris-Diderot University). After trypsin digestion, the spots were analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI TOF-TOF). The system and peptide mass fingerprint obtained was examined using MASCOT (Matrix Science Ltd, London, UK). MS-MS data were compared against both the NCBI nr and *V. tubiashii* genome databases.

9. Statistical analysis

Significant differences between analyses were tested using the "Student t" test in <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>. Results were considered significant at $P < 0.05$.

Results

1. Virulence of the French *V. tubiashii* 07/118 T2 on oyster larvae

The virulence of the 07/118 T2 strain on 13-day old oyster larvae was estimated 24 h post infection (Fig. 1). *V. tubiashii* 07/118 T2 caused important dose-dependent mortality: no live larvae were observed at 10^6 cfu ml⁻¹ and the LD₅₀ (lethal dose 50%) values were approximately 2.3×10^3 cfu ml⁻¹ (Fig. 1a). Moreover, 100% mortality was noticed with heat-killed *V. tubiashii* 07/118 T2 at 10^6 cfu ml⁻¹ with live bacteria preincubated with EDTA (ion metal chelator). However, no mortality was observed with the boiled 07/118 T2 strain, preincubated with EDTA, at 10^6 cfu ml⁻¹. In the positive controls (Fig. 1b), *V. coralliilyticus* caused significant mortality even at 10^3 cfu ml⁻¹ (only 6% live larvae) compared with 07/118 T2. With the negative control, *V. nigripulchritudo*, no considerable mortality was detected even at 10^6 cfu ml⁻¹.

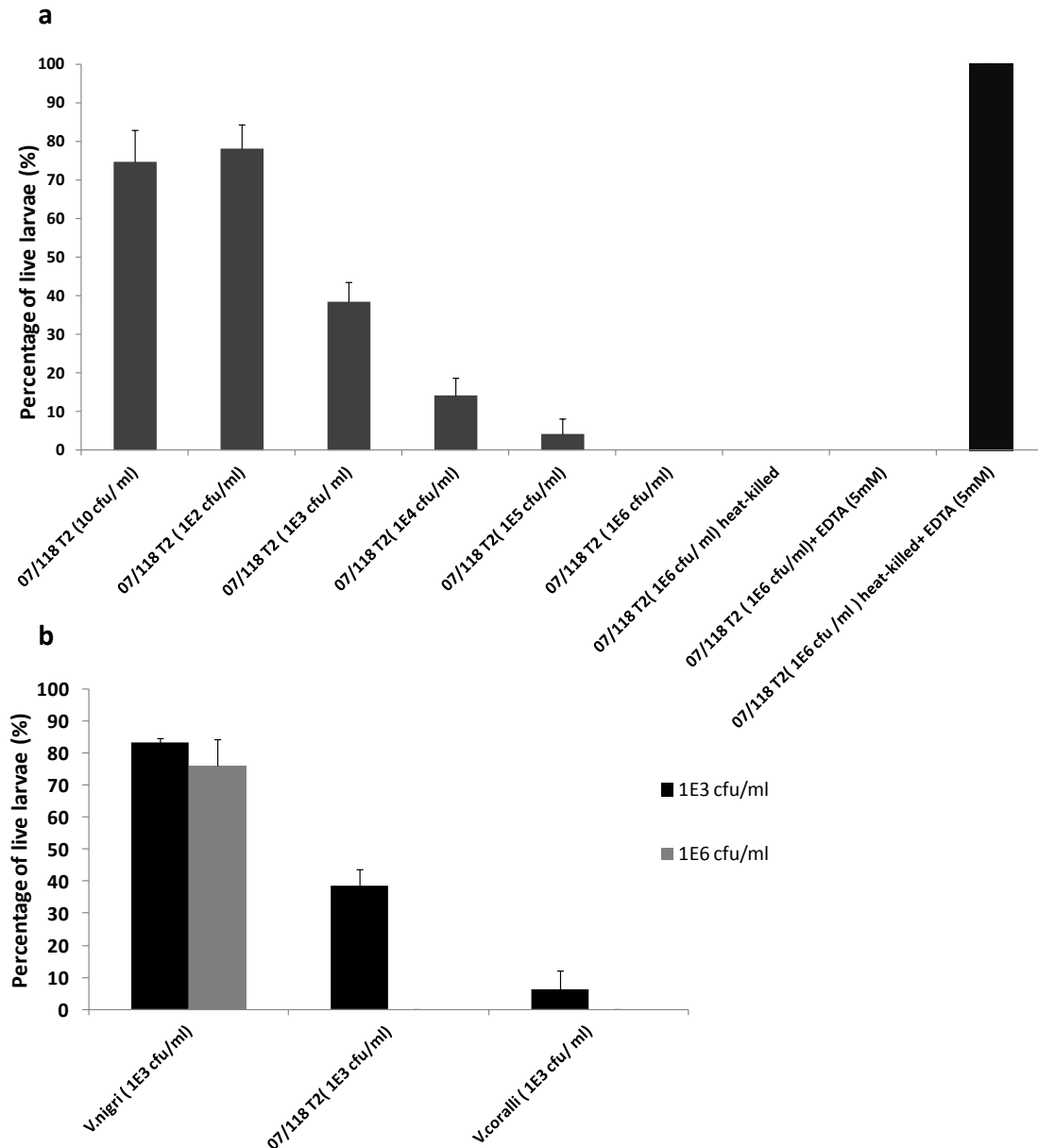


Figure 1: (a) Dose-response effect of *V. tubiashi* 07/118 T2 ($10\text{-}10^6$ cfu/ml) on 13-day old *C. gigas* larvae estimated 24 h post infection. The virulence of *V. tubiashii* 07/118 T2 was also assayed with a heat killed strain and in the presence or absence of EDTA. (b) *V. nigripulchritudo* (*V.nigri*) and *V. coralliilyticus* (*V.coralli*) were used as controls at 10^3 and 10^6 cfu/ml. The error bars indicate the standard deviation of the three biological replicates.

2. Toxicity of total and fractionated ECPs of *V. tubiashii* 07/118 T2

Extracellular products of *V. tubiashii* 07/118 T2 induced a dose dependent toxicity on 13-day old oyster larvae (Fig. 2), with an LD₅₀ estimated around 7.16 μg of protein per well

(for 50 larvae). No larval mortality was observed after preincubating the ECPs with 5 mM EDTA regardless of the concentration of ECPs tested.

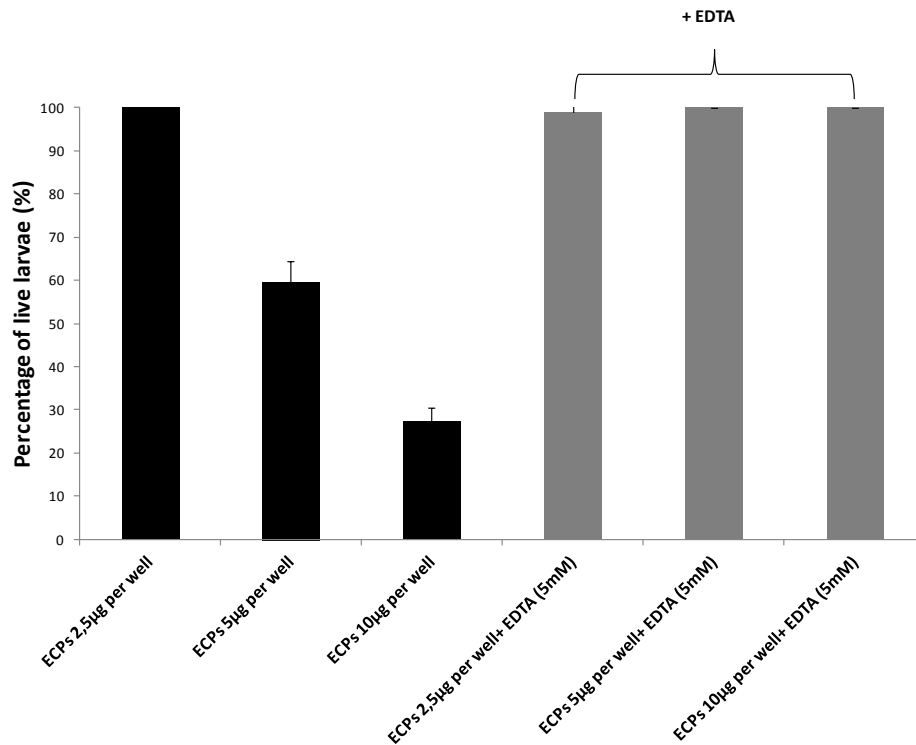


Figure 2: Dose-response effect of *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs (2.5 µg, 5 µg and 10 µg of proteins per well) on 13-day old *C. gigas* larvae in the absence (black bars) and presence (grey bars) of EDTA (f.c 5mM) 24 h post infection. The error bars indicate the standard deviation of the three biological replicates.

Using GP-HPLC, two major fractions were separated from *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs (Fig. 3a). Contrary to the second eluted fraction (F2), the eluted fraction 1 (F1) did not exert any proteolytic activity (Fig. 3b). However, both fractions, showed toxicity on larvae: about 57 % of the larvae counted were living in the presence of the F1 fraction and only 30% in presence of the F2 fraction. 100% mortality was observed after the reconstitution of ECPs (mixing F1 + F2). The preincubation of F1 and F2 with EDTA (5mM) removed the observed toxicity (Fig. 3c).

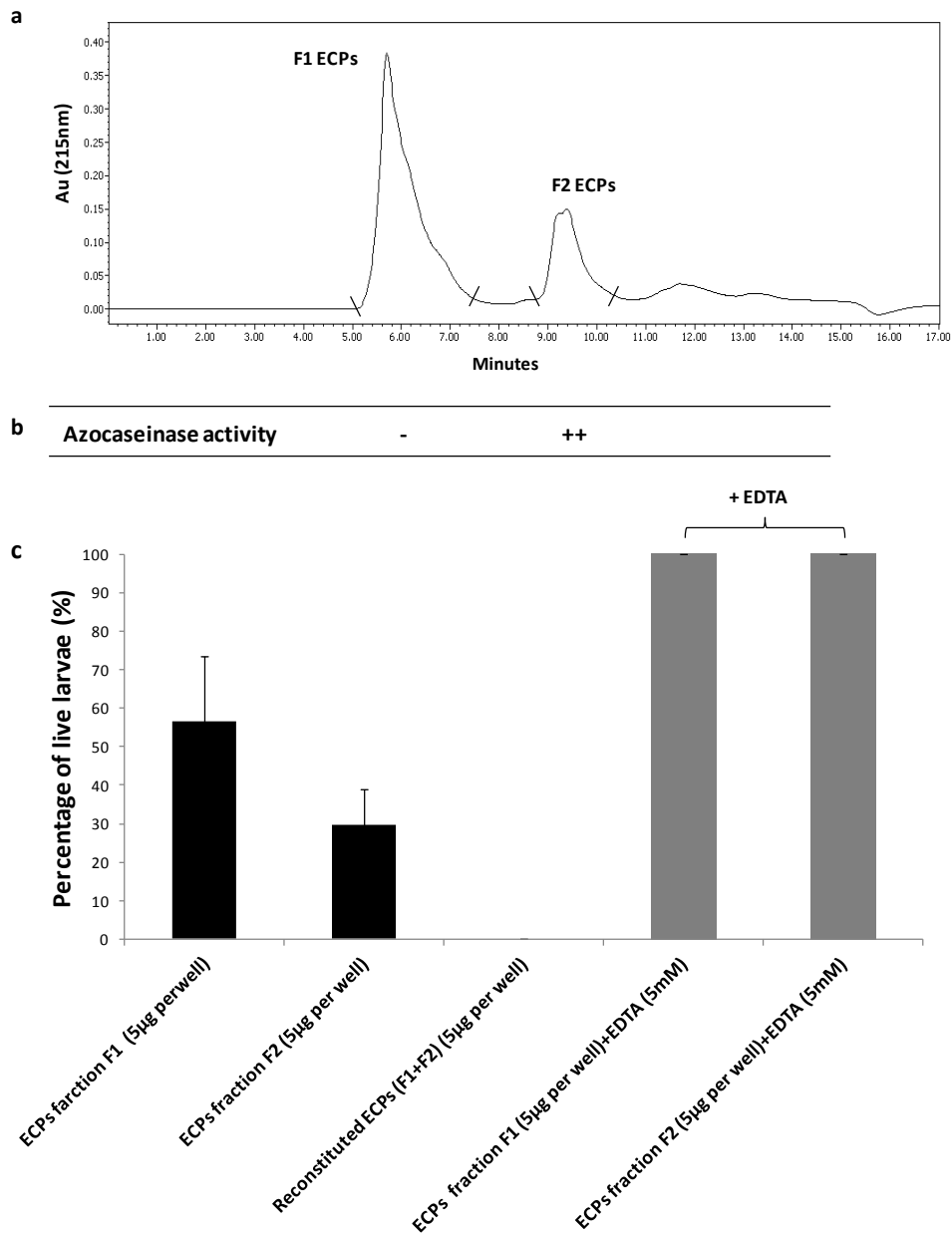


Figure 3: **(a)** Fractionation of *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs by GP-HPLC into two major fractions, F1 and F2. **(b)** Each eluted fraction was assayed for azocaseinase activity. **(c)** Toxicity of fractions (5 µg of protein per well) on 13-day old oyster (*C.gigas*) larvae in absence (black bars) and presence (grey bars) of EDTA (f.c 5mM) 24 h post infection. The error bars indicate the standard deviation of the three biological replicates.

3. 2D and MS-MS analyses of GP-HPLC fractions

The two fractions obtained from crude *V. tubiashii* 07/ 118 T2 ECPs were separated on large 2-DE gels in a *pI* range of 3-10 (Fig. 4). More proteins were detected in the first fraction of ECPs (F1) than in the second one (F2). For both, most of the proteins detected were localised in the acidic part of the pH range. For F1, visual inspection revealed different proteins which differed in their molecular weights. However, for F2 the detected proteins were in single horizontal line which differed only by their isoelectric point (Fig. 4).

All the visualised proteins, ie 19 spots for F1 and 12 spots for F2, were analysed by using mass spectrometry. Only 12 proteins for F1 and 5 proteins for F2 were well identified using MS/MS analyses (Fig. 4, Table 2). F1 Fraction ECPs showed a diversity of outer membrane proteins (porin-like protein H precursor, outer membrane channel protein, long chain fatty acid transport protein, Outer membrane protein N and hypothetical protein). By contrast, the second fraction of ECPs (F2) appeared as an enrichment of a unique protein “extracellular zinc metalloprotease” (accession no. EGU55378) with potentially different isoforms.

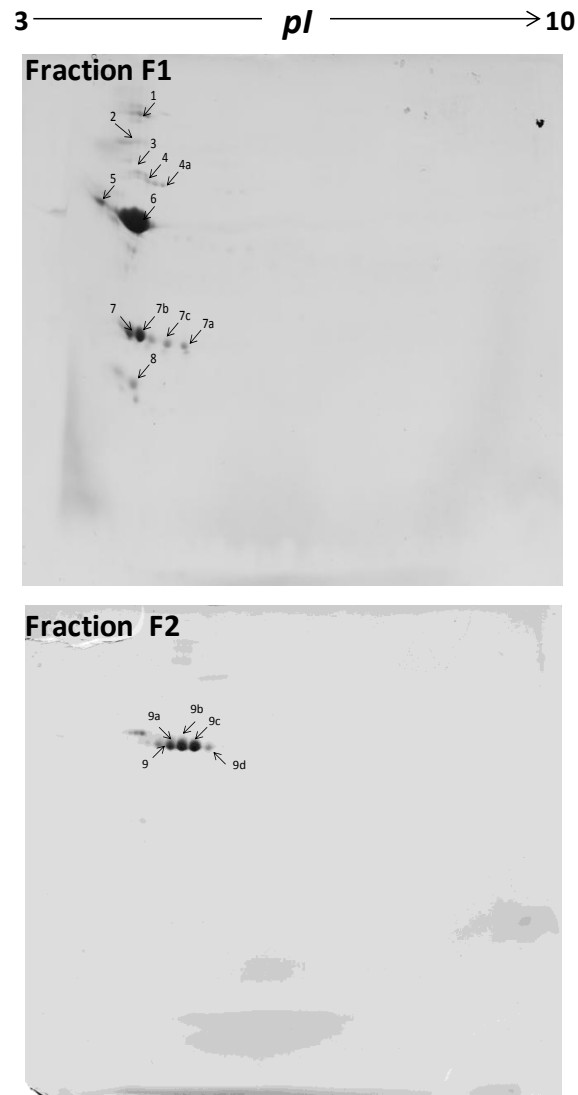


Figure 4: 2-DE patterns of 07/118 T2 ECP GP-HPLC fractions (F1 and F2). Proteins (50 μ g of protein loaded) were separated over pH range 3–10 (13cm strips) and gradient (10-15%) SDS-polyacrylamide gel. The gel was stained with coomassie blue. Numbered spots correspond to those showing qualitative differences and associated letters designate the same protein but with different protein/ion score. The identified proteins using MS or MS/MS are labeled with spot numbers. F1: GP-HPLC fraction 1, F2: GP-HPLC fraction 2.

Table 2: MALDI TOF–TOF mass spectrometry identification of proteins in *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs GP-HPLC fractions. Only proteins with CI% (Confidence Interval) > 92% and peptides with ions score were presented. Protein localization were determined using MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform (<https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/>). F1: GP-HPLC fraction 1 , F2: GP-HPLC fraction 2

F1 spots identification

Spot (F1)	Protein identification/Localization	Accession Number (GI)	Mascot scores		Peptide sequences with ions score	Coverage (%)	Total Matched peptides	Theoretical	
			Proteinscore/ protein score CI%	Total ion score/ total ion CI%				MW (kDa)	pI
1	Ferrichrome-iron receptor/Outer membrane	EGU49312	491/100	491/100	EINEDVAFR YDDTSNEQR TDLAIHETPR INDWVVQAGVR TPQQVADTLASAWAK VSAYTLYDATVSYR YQFFDGVNLGLSVGGGVR GPASVLYGQNPPGGLINTVSK	42	26	82.97	4.76
2	Bifunctional UDP-sugar hydrolase/5'nucleotidase periplasmic precursor/periplasmic	EGU50117	204/100	204/100	GVNAPGDVALAR ADFVMMNSGGVR LTVLHTNDHHGR IGNPEFIGGIDFR FTVPSFNASGGDGYPK	32	18	61.07	4.99
3	Outer membrane channel protein/Outer membrane	EGU54889	69/99.93	69/99.93	VSTAYFDVLR	31	11	47.59	4.6
4	Long-chain fatty acid transport protein/Outer membrane	EGU47320	86 /99.999	86 /100	NAAAMSLFDR FGLSYHYSPEK	26	10	47.61	4.76

4a	Long-chain fatty acid transport protein/Outer membrane	EGU47320	112/100	112/100	NAAAMSLFDR FGLSYHYSPEK	23	8	47.61	4.76
5	Porin-like protein H precursor/ outer membrane	EGU50462	491/100	491/100	NTDVGYGVGIK QEIDDADFGFDTR VADFDFTAFYGAAELK YDYDNNGSFYAGLGLIQDK YAVNDDLQVGAFLEFSG DNSDR AIGNDQTTKQEIDDADFG FDTR	49	12	36.94	4.4
6	Outer membrane protein N/Outer membrane	EGU58844	49/92.919	49/99.75	LGYVGLSHDSYGR	16	6	38.92	4.68
7	Hypothetical protein/ Outer membrane	EGU50715	58/99.129	58/ 99.966	FNYFTGNEHK	30	6	24.06	5.81
7a	Hypothetical protein/ Outer membrane	EGU50715	327/100	327 /100	GGSYLTENVR FNYFTGNEHK SSNQGYINATYK TVVDKLDNAGSFAIK FQLDGYQFGAGSDYVYHIDK	30	6	24.06	5.81
7b	Hypothetical protein/ Outer membrane	EGU50715	209/100	209/100	GGSYLTENVR FNYFTGNEHK SSNQGYINATYK TVVDKLDNAGSFAIK	26	6	24.06	5.81
7c	Hypothetical protein/Outer membrane	EGU50715	599/100	599/100	GGSYLTENVR FNYFTGNEHK SSNQGYINATYK SSNQGYINATYKF TVVDKLDNAGSFAIK SFYVLAGGSLGYYNSELETK FQLDGYQFGAGSDYVYHIDK VYGYLQYNGESELSIIDTEENA QVK	51	8	24.06	5.81

8	Hypothetical protein/Uknown	EGU58130	108/100	108/100	AGLHSYELTGTNFK	8	1	17.43	4.87
---	-----------------------------	----------	---------	---------	----------------	---	---	-------	------

F2 spot identification

Spot (F2)	Protein identification/Localization	Accession Number (GI)	Mascot scores		Peptide sequences with ions score	Coverage (%)	Total Matched peptides	Theoretical	
			Protein score/protein score CI%	Total ion score/total ion CI%				MW (kDa)	pI
9	Extracellular zinc metalloprotease/ Extracellular	EGU55378	285/100	285/100	DFPAFAIDK YFDQPSKDGR GNVDWIVGADIFK YDYGKDFPAFAIDK SIDHASQYYDGLNVHYSSGVFNR	24	14	66.08	5.22
9a	Extracellular zinc metalloprotease/ Extracellular	EGU55378	414/100	414/100	DFPAFAIDK YFDQPSKDGR AAADMGYSVDDVK GNVDWIVGADIFK YDYGKDFPAFAIDK SIDHASQYYDGLNVHYSSGVFNR	24	16	66.08	5.22
9b	Extracellular zinc metalloprotease/ Extracellular	EGU55378	462/100	462/100	DFPAFAIDK YFDQPSKDGR GNVDWIVGADIFK YDYGKDFPAFAIDK SIDHASQYYDGLNVHYSSGVFNR	24	15	66.08	5.22
9c	Extracellular zinc metalloprotease/ Extracellular	EGU55378	498/100	498/100	DFPAFAIDK YFDQPSKDGR GNVDWIVGADIFK YDYGKDFPAFAIDK	30	18	66.08	5.22

					SIDHASQYYDGLNVHYSSGVFNR				
9d	Extracellular zinc metalloprotease/ Extracellualr	EGU55378	202/100	202/100	DFPAFAIDK YFDQPSKDGR GNVDWIVGADIFK YDYGKDFPAFAIDK SIDHASQYYDGLNVHYSSGVFNR	18	11	66.08	5.22

4. Phenotypic description of *C. gigas* larvae after incubation with *V. tubiashii* 07/118 T2 and with total and fractionated ECPs

After a 24 h incubation period in SSW, control larvae were observed to be swimming normally, to have a velum with cilia, two closed shells and regular soft tissue pigmentation. The same phenotypic profile was observed in fixed larvae (Fig. 5a) apart from the absence of the velum, which is typically in a retracted state when larvae are fixed (Elston, 1999).

The first morphological changes started to appear six hours post-infection with 07/118 T2 (10^5 cfu ml⁻¹). Larvae that had a damaged velum, that were immobile, or exhibiting a circular swimming movement were observed (Fig. 5a). The majority of larvae were considered as dead (no motion) with damaged tissues as early as 16 h post-infection. Twenty four hours post- infection, an almost complete decomposition of velar epithelial cells was observed (a clear shell) with microorganisms swarming around cellular debris (Fig. 5a). Larvae infected with *V. coralliilyticus*, the positive control, displayed a similar phenotype (Fig. 5a).

After a 24 h period of incubation in 07/118 T2 ECPs, larvae stop moving (a sign of death) and fixed larvae showed soft-tissue decomposition (Fig. 5b). With GP-HPLC fractions 1 (F1) and 2 (F2), the same phenotype was observed as with the ECPs (swimming stopped) and fixed larvae showed signs of the start of decomposition after incubation in F2 (Fig. 5b).

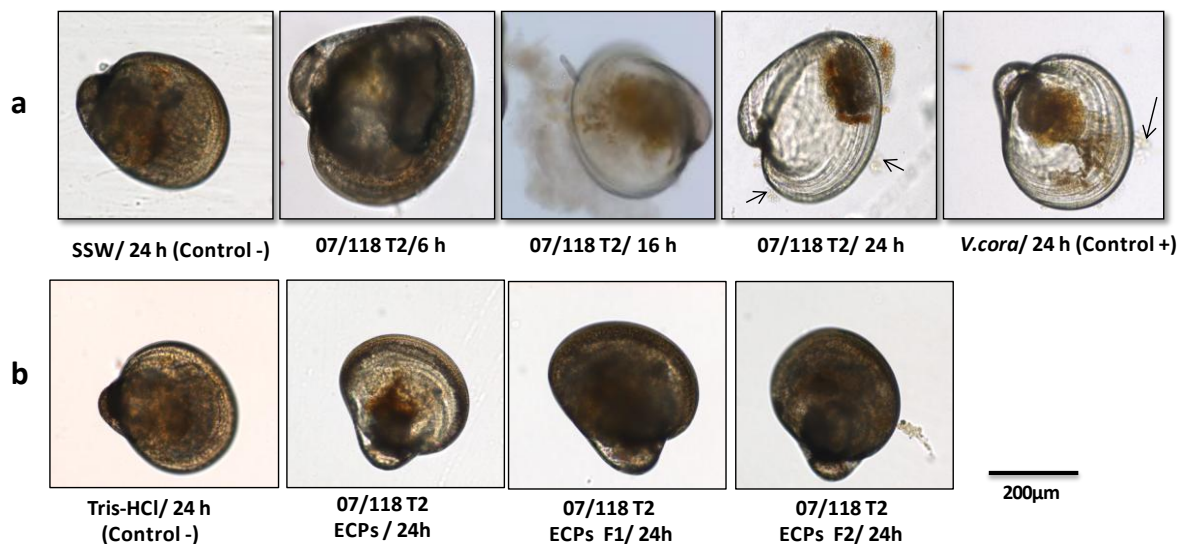


Figure 5: Morphological evolution of 13-day old *C. gigas* larvae during infection by (a) *V. tubiashii* 07/118 T2 strain at 10^5 cfu ml⁻¹ and (b) *V. tubiashii* 07/118 T2 ECPs and GP-HPLC fractions. Pictures were taken and treated using a BX51 System Microscope (Olympus®).

Arrows indicate swarming bacteria. SSW: sterile sea water, *V. cora*: *V. coralliilyticus* 06/210, F1: GP-HPLC fraction 1 and F2: GP-HPLC fraction 2.

5. Expression of genes encoding potential virulence factor during infection with *V. tubiashii* 07/118 T2

The relative expression of some potential virulence genes from *V. tubiashii* 07/118 T2 was carried out using RT-QPCR at different larval infection times (3 h, 6 h, 16 h and 18 h) (Fig.6). The chosen genes corresponded to previously described factors implicated in bacterial virulence: thermostable hemolysin (TLH) (Wong *et al.*, 2012), metalloprotease (Mersni *et al.* under review) and exochitinase (Wang *et al.*, 2001).

Metalloprotease gene expression underwent a small down regulation during the first few hours of infection (3 h) a significant (20-fold) increase in expression was observed 16 h post infection ($p < 0.05$). This over expression remained stable even 18 h post infection (Fig. 6a). At the same post-infection time-points (16 h and 18 h), azocaseinase activity was detected in the supernatant of larval + bacterial interaction (Fig. 6a').

By contrast, TLH gene expression was significantly up-regulated during the first few hours of larval infection (3 h and 6 h, $p < 0.05$) (Fig. 6b). Exochitinase gene expression showed few variations: a little down-regulation 6 hours post-infection, followed by an up-regulation ($p < 0.05$) (Fig. 6c).

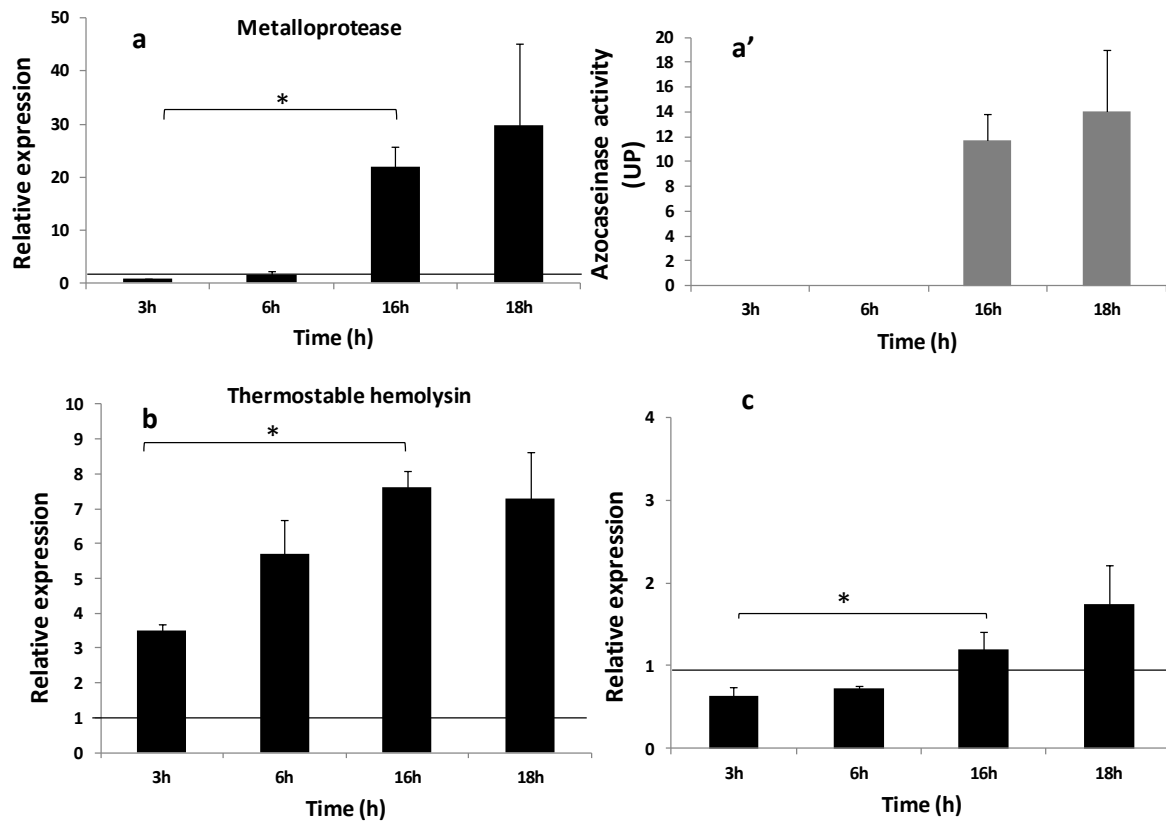


Figure 6: The relative expression of (a) metalloprotease (b) thermostable hemolysin and (c) exochitinase genes from *V. tubiashii* 07/118 T2 strain at different times of larval infection (3 h, 6 h, 16 h, and 18 h). (a') Azocaseinase activity (UP) assayed in culture supernatant during larval infection. The level of expression of the target genes was normalized to the *gyrB* housekeeping gene and was calculated using the $(1+efficiency)^{-\Delta\Delta Ct}$ formula with reference relative expression at 30 min. The error bars indicate the standard deviation of the three biological replicates per time of infection. The line corresponds to the threshold of expression (relative expression >1 means up-regulated). An asterisk indicates a significant ECP effect (Student's t, $p < 0.05$).

Discussion

It has previously been demonstrated that the French *V. tubiashii* 07/118 T2 and its extracellular products cause pathogenesis to juvenile Pacific oyster (Travers *et al.*, 2014). A thermolysin-like metalloprotease was suggested to be one of the virulence factors responsible for the toxicity of this strain (Mersni *et al.* under review).

In this paper, using experimental infection of larvae, we showed for the first time that the French *V. tubiashii* 07/118 T2 is virulent to 13-day old larvae with an LD₅₀ value of approximately 2.3×10^3 cfu ml⁻¹ 24 h post-infection. These results were comparable to those found with the American *V. tubiashii* by Estes *et al.* (2004) who observed an LD₅₀ between 1.6 and 3.6×10^4 cfu ml⁻¹ 24 h post infection in 10- to 12-day old larvae. Secondly, consistent with previous studies (Takahashi *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2008), the 07/118 T2 culture supernatants showed a high toxicity to larvae. Furthermore, with the aim to explore the diversity of toxic ECPs, an HPLC-gel permeation separation was conducted. Both collected fractions showed a partial toxicity to oyster larvae with the greatest toxicity for F2, the only fraction that demonstrated protease activity. It is interesting also to note that the reconstitution of ECPs with the two GP-HPLC fractions caused total toxicity to the larvae although the loss of some of the toxins may have occurred during the purification step. At this stage, it could be supposed that several virulence factors, that would act synergistically, are necessary for the full virulence phenotype induced by the French *V. tubiashii*.

During experimental infection, larval pathological manifestations were monitored. It was reported that *V. tubiashii* caused bacillary necrosis, a larval and juvenile bivalve disease characterized by a reduction in larval motility and the formation of bacterial swarms (Tubiash *et al.*, 1965). Histological sections showed an extensive destruction of larval epithelial cells with a massive bacterial invasion and proliferation (Tubiash *et al.*, 1965; Estes *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008). Herein, with the French *V. tubiashii*, approximately the same signs of bacillary necrosis were observed. However, infection with 07/118 T2 ECPs showed a less pronounced effect (without complete decomposition) and GP-HPLC fractions caused larval mortality without reproducing the same phenotype observed with live bacteria or with crude ECPs.

Results obtained, both by experimental infections and by microscope observations, raise the question of whether proteases, specifically metalloproteases as previously reported (Binesse *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2008; Labreuche *et al.*, 2010), are the sole primary

virulence factor or whether the association of several factors is required to induce a complete infection phenotype. The toxicity of the GP-HPLC fraction 1, which doesn't present protease activity, is an important finding to support this second assumption.

It has been described that pathogenic *Vibrio* is capable of producing various pathogenic factors. Of these, enterotoxins, hemolysin and cytotoxins are the direct toxic factors causing the symptoms, whereas siderophores and adhesive factors are indirect factors involved in the establishment of the infection and proteases are recognized as playing pathogenic roles in the subsequent infection (Shinoda & Miyoshi, 2011).

In order to explore the involvement of several factors in the pathogenicity of the French *V. tubiashii*, other characterization tests were applied using EDTA as a cation chelating agent, to further characterize metalloprotease activity (Teo *et al.*, 2003; Miyoshi *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2009; Labreuche *et al.*, 2010), and heat treatment to kill the bacteria via the restriction of adhesion capacity, proliferation ability and the denaturation of a group of thermolabile factors. Interestingly, neither the use of EDTA nor the heat killed bacteria were sufficient to limit the toxicity of the French *V. tubiashii*.

Indeed, heat treatment could destroy the bacterial cell and make it non culturable but couldn't abolish all pathogenic effectors (Fontana, 1988; Kudryashova *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2010; Shinoda & Miyoshi, 2011). Moreover, the addition of EDTA into the infection bath could partially affect protease activity (Mersni *et al.*, under review; Labreuche *et al.*, 2010; Teo *et al.*, 2003) and some bacterial properties (Kavitha *et al.*, 2013) but not all bacterial virulence factors. However, when we combined the chemical and physical treatments, toxicity to larvae was removed. In addition, using EDTA, the importance of the secreted metalloprotease in the toxicity of the French *V. tubiashii* supernatants was confirmed; more clearly and completely with the GP-HPLC fraction 2. Nevertheless, a total inhibition of the F1 toxicity was observed despite the absence of protease activity. This could be explained by a nonspecific interaction of EDTA with other kind of secreted toxins (Marvin *et al.*, 1989).

These results expand our previous observations on the implication of multiple factors on the toxicity of the French *V. tubiashii* (Hasegawa & Häse, 2009a; Shinoda & Miyoshi, 2011)

In order to examine the composition of culture supernatants in more detail, a 2-D separation of GP-HPLC fraction coupled with MS- MS analyses was performed. Analyses revealed the presence of some potential toxic factors in fraction 1, such as the UDP-sugar hydrolase (cleaves uridine nucleotides (Glaser *et al.*, 1967)), the outer membrane protein N, the porin-like protein H precursor, the long-chain fatty acid transport protein and some hypothetical proteins. It should be noted that some receptor, transport and channel proteins were also

detected in F1. Their presence may have come from bacterial cell lysis during the experimental steps.

Contrary to F1, a single protein, an extracellular zinc metalloprotease (accession no. EGU55378) was observed in fraction 2.

Extracellular metalloproteases have been well studied as the main pathogenic factors in several species of *Vibrio* pathogen for the Pacific oyster (Binesse *et al.*, 2008; Hasegawa & Häse, 2009b; Hasegawa *et al.*, 2008; Labreuche *et al.*, 2010). Nevertheless, other virulence factors have also been found to play an important role in the pathogenicity of the genus *Vibrio*. Indeed, Valiente *et al.* (2008) suggested that the pathogenicity of *V. vulnificus* in the eel is not only caused by bacterial growth in the blood and internal organs, but also by the effect of potent toxic factors other than metalloprotease. They explain that the abundance of proteases in ECPs could mask the effect produced by other cytotoxins like the RtxA toxin. Duperthuy *et al.* (2010, 2011) showed that the outer membrane protein (OMP) OmpU is required for *V. splendidus* LGP32 virulence by acting on the adhesion and on the destruction of the host cell actin cytoskeleton during the invasion step. Lee *et al.* (2008) proved that *V. vulnificus* RtxA toxin (a pore-forming protein toxin) induced apoptotic death in human intestinal epithelia. Moreover, long-chain fatty acid transport proteins have the ability to uptake lipids used for bacterial growth (Black, 1988) which were also shown to be essential for larval development (Chu & Webb, 1984).

The monitoring of gene expression of some potential virulence factors during infection was also carried out in this study. Results showed that one metalloprotease and one exochitinase gene are up regulated 16 h post infection. However, the thermostable hemolysin gene was up regulated at all the infection times examined. This difference in the gene expression of some virulence factors was in accordance with the morphological evolution of oyster larvae observed during infection and could partially explain what really happened during bacterial infection steps (Hasegawa & Häse, 2009a; Krukoniš & DiRita, 2003).

In summary, in order to understand the processes leading to larval disease, *C. gigas* larvae were used as an interaction model. Results showed that the virulence of the French *V. tubiashii* seems to be related to multiple toxic factors, including metalloprotease. Further studies will be required, using gene mutation or recombinant proteins of the potent virulence factors to further understand the involvement of these toxins in the virulence of the French strain.

Acknowledgements

This study was supported by a Ph.D grant from the CNRS and IFREMER for R. Mersni-Achour (2010-2013). The PRES (Pôle de Recherche et d'Enseignement Supérieur) of Limousin PoitouCharentes and the FR CNRS 3097 «Fédération de Recherche en Environnement et Développement Durable» are acknowledged for financial support through the research project « Caractérisation in vitro des effets de métalloprotéases sur différents types cellulaires de l'huître creuse *C. gigas*». Special thanks go to Bruno Chollet, for technical assistance during microscopic analyses.

References

- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D. & Roux, F. L. (2008).** Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7108–7117.
- Black, P. N. (1988).** The *fadL* gene product of *Escherichia coli* is an outer membrane protein required for uptake of long-chain fatty acids and involved in sensitivity to bacteriophage T2. *J Bacteriol* **170**, 2850–2854.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Chu, F.-L. E. & Webb, K. L. (1984).** Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* **19**, 815–820.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F. & Boudry, P. (2005).** Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **249**, 213–229.
- Delston, R. B., Kothary, M. H., Shangraw, K. A. & Tall, B. D. (2003).** Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Can J Microbiol* **49**, 525–529.
- Elston, R. A., Hasegawa, H., Humphrey, K. L., Polyak, I. K. & Häse, C. C. (2008).** Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Dis Aquat Organ* **82**, 119–134.
- Elston, R. A. (1999).** *Health Management, Development and Histology of Seed Oysters*. World Aquaculture Society.
- Estes, R. M., Friedman, C. S., Elston, R. A. & Herwig, R. P. (2004).** Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **58**, 223–230.
- Fontana, A. (1988).** Structure and stability of thermophilic enzymes Studies on thermolysin. *Biophys Chem* **29**, 181–193.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J. & Pichereau, V. (2013).** Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J Sea Res* **75**, 135–141.

- Glaser, L., Melo, A. & Paul, R. (1967).** Uridine Diphosphate Sugar Hydrolase: Purification of Enzyme and protein inhibitor. *J Biol Chem* **242**, 1944–1954.
- Hada, H. S., West, P. A., Lee, J. V., Stemmler, J. & Colwell, R. R. (1984).** *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks. *Int J Syst Bacteriol* **34**, 1–4.
- Hasegawa, H., Häse, C.C., (2009a).** The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* directly inhibits its extracellular haemolysin. *Microbiology* **155**, 2296–2305.
- Hasegawa, H. & Häse, C. C. (2009b).** TetR-Type Transcriptional Regulator VtpR Functions as a Global Regulator in *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7602–7609.
- Hasegawa, H., Lind, E. J., Boin, M. A. & Häse, C. C. (2008).** The Extracellular Metalloprotease of *Vibrio tubiashii* Is a Major Virulence Factor for Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4101–4110.
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D.N., Lind, E.J., Häse, C.C., 2009b.** Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* **85**, 123–131.
- Jacques, M. (2004).** Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* **68**, 81–85.
- Jeffries, V. E. (1982).** Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **29**, 201–226.
- Kavitha, S., Adish Kumar, S., Yogalakshmi, K. N., Kaliappan, S. & Rajesh Banu, J. (2013).** Effect of enzyme secreting bacterial pretreatment on enhancement of aerobic digestion potential of waste activated sludge interceded through EDTA. *Bioresour Technol* **150**, 210–219.
- Kothary, M. H., Delston, R. B., Curtis, S. K., McCardell, B. A. & Tall, B. D. (2001).** Purification and Characterization of a Vulnificolysin-Like Cytolysin Produced by *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3707–3711.
- Krukonis, E. S. & DiRita, V. J. (2003).** From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 186–190.
- Kudryashova, E. V., Mozhaev, V. V. & Balny, C. (1998).** Catalytic activity of thermolysin under extremes of pressure and temperature: modulation by metal ions. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* **1386**, 199–210.
- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D. & Nicolas, J.-L. (2010).** *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* **29**, 753–758.

- Lee, B. C., Choi, S. H. & Kim, T. S. (2008).** *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect* **10**, 1504–1513.
- Lin, J. E., Valentino, M., Marszalowicz, G., Magee, M. S., Li, P., Snook, A. E., Stoecker, B. A., Chang, C. & Waldman, S. A. (2010).** Bacterial Heat-Stable Enterotoxins: Translation of Pathogenic Peptides into Novel Targeted Diagnostics and Therapeutics. *Toxins* **2**, 2028–2054.
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. P. & Toranzo, A. E. (1987).** Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**, 15–29.
- Marvin, H. J., ter Beest, M. B. & Witholt, B. (1989).** Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J Bacteriol* **171**, 5262–5267.
- Mersni Achour, R., Imbert, N., Huet, V., Ben Cheikh, Y., Faury, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A. & other authors. (under review).** First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. . Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *JIP*.
- Miyoshi, S., Sonoda, Y., Wakiyama, H., Rahman, M. M., Tomochika, K., Shinoda, S., Yamamoto, S. & Tobe, K. (2002).** An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization, and gene cloning. *Microb Pathog* **33**, 127–134.
- Nottage, A. S., Sinclair, P. D. & Birkbeck, T. H. (1989).** Role of Low-Molecular-Weight Ciliostatic Toxins in Vibriosis of Bivalve Mollusks. *J Aquat Anim Health* **1**, 180–186.
- Paranjpye, R. N., Myers, M. S., Yount, E. C. & Thompson, J. L. (2013).** Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence. *Microbiol Read Engl* **159**, 2605–2615.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B. M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D. & Waldor, M. K. (2011).** Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ Microbiol* **13**, 296–306.
- Shinoda, S. & Miyoshi, S.-I. (2011).** Proteases Produced by Vibrios. *Biocontrol Sci* **16**, 1–11.
- Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A. & Gubitz, G. M. (2007).** A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1772–1781.

- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. & Muroga, K. (1998).** *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **33**, 111–118.
- Takahashi, K. G., Nakamura, A. & Mori, K. (2000).** Inhibitory Effects of Ovoglobulins on Bacillary Necrosis in Larvae of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* **75**, 212–217.
- Temperton, B., Thomas, S., Tait, K., Parry, H., Emery, M., Allen, M., Quinn, J., MacGrath, J. & Gilbert, J. (2011).** Permanent draft genome sequence of *Vibrio tubiashii* strain NCIMB 1337 (ATCC19106). *Stand Genomic Sci* **4**, 183–190.
- Teo, J. W. ., Zhang, L.-H. & Poh, C. L. (2003).** Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **303**, 147–156.
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T. & other authors. (In press).** First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J Invertebr Pathol*.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E. & Leifson, E. (1965).** Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology. *J Bacteriol* **90**, 1036–1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R. & Sakazaki, R. (1970).** Marine Vibrios Associated with Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. *J Bacteriol* **103**, 271–272.
- Valiente, E., Padrós, F., Lamas, J., Llorens, A. & Amaro, C. (2008).** Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. *Microb Pathog* **45**, 386–393.
- Wang, S.-Y., Moyne, A.-L., Thottappilly, G., Wu, S.-J., Locy, R. D. & Singh, N. K. (2001).** Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microb Technol* **28**, 492–498.
- Wong, S. K., Zhang, X.-H. & Woo, N. Y. S. (2012).** *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture* **330–333**, 29–36.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Depuis l'introduction dans les années 70, d'une nouvelle espèce d'huître en France, l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la filière ostréicole, première industrie aquacole du pays est devenue particulièrement vulnérable. Amplifiées par les changements climatiques globaux, toutes les études sur les causes de mortalité s'accordent sur la présence dans l'environnement d'agents infectieux. En plus des virus de type herpes, les bactéries appartenant à l'espèce *V. aestuarianus* et au groupe *V. splendidus* ont régulièrement été associées aux épisodes de mortalités détectés en France et particulièrement ces dernières années. Les différents agents infectieux affectent de nombreux stades de la croissance de l'huître, quels que soient leur niveau de ploïdie (diploïde ou triploïde) et leur origine (écloserie ou milieu naturel). Dans une étude menée par Saulnier et collaborateurs (Saulnier *et al.*, 2010), un nouveau groupe de *Vibrio*, le groupe *Harveyi*, a été isolé pendant les épisodes de mortalités en 2007 touchant les naissains dans les écloseries. Les souches isolées dans ce groupe étaient diverses et leur affiliation au rang d'espèce n'avait pas encore été affiné. C'est donc, la classification taxonomique de ce groupe de *Vibrio* basée seulement sur le séquençage de l'ARNr 16S, qui nous a amené à pousser leur étude taxonomique et qui a constitué le premier grand volet de ce travail de thèse. D'autre part, nous avons cherché à confirmer, par infections expérimentales *in vivo*, la virulence des isolats et la toxicité des produits de sécrétion d'une souche modèle (07/118 T2) et ce sur plusieurs modèles d'interaction : huîtres adultes, juvéniles et larves. La toxicité des ECPs a été également évaluée *in vitro* sur quelques fonctions immunitaires de l'huître. La variabilité phénotypique de cette souche modèle, induite par des conditions de culture différenciée, a été analysée. En effet, l'influence du mode de culture (sur milieu gélosé ou liquide) a été étudiée au niveau transcriptionnel et traductionnel, ciblant quelques facteurs de virulence bactériens bien connus (hémolysine, métalloprotéase et exochitinase). Des variantes phénotypiques sont apparues clairement au cours des expériences qui visaient à étudier la toxicité des produits extracellulaires de la souche 07/118 T2. La toxicité de ces sécrétomes semble être reliée au mode de culture de la souche. Parallèlement, il nous a semblé essentiel de mieux caractériser la diversité moléculaire des facteurs de virulence sécrétés par cet isolat au cours de l'infection par le couplage d'analyses protéomiques et transcriptomiques. La figure 22 résume la démarche expérimentale appliquée lors de ce projet.

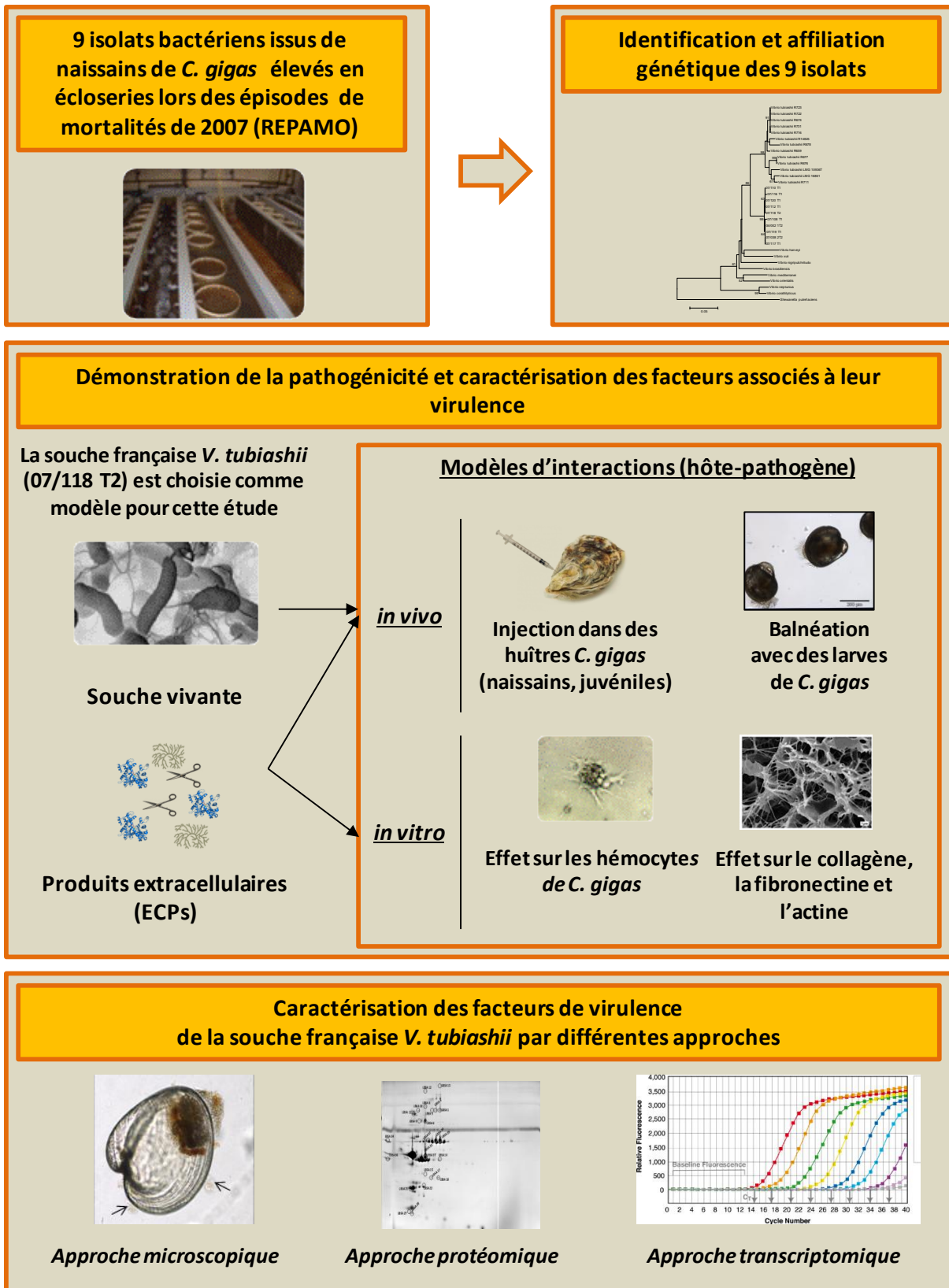


Figure 22: Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale utilisée lors de ce projet

1. V. TUBIASHII EN France !!!

Même si l'espèce *V. tubiashii* n'a été officiellement reconnue qu'en 1984 (Hada *et al.*, 1984), l'histoire de cette espèce bactérienne a commencé avec les travaux de Tubiash en 1965, qui a décrit une nouvelle maladie 'la nécrose bacillaire' caractérisée par une réduction de la motilité larvaire et la formation d'amas bactériens autour des organes et des débris cellulaires. Cette espèce a été isolée pour la première fois dans des écloséries sur la côte Est des États-Unis chez l'huître *Crassostrea virginica* (larves et juvéniles) et la praire *Mercenaria mercenaria* (Tubiash *et al.*, 1965; Tubiash, 1970). Quelques années plus tard, des souches de *V. tubiashii* ont été identifiées dans des écloséries en Angleterre et en Espagne affectant les larves d'huîtres *Ostrea edulis* et *C. gigas* (Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987). Entre 1999 et 2000, des bactéries appartenant à l'espèce *V. tubiashii* ont pu être ensuite isolées de larves d'huître creuse sur la côte ouest de l'Amérique du Nord (Estes *et al.*, 2004), puis une réémergence de *V. tubiashii* a été observée en 2006-2007 sur la côte ouest américaine, ainsi qu'à Hawaï, infectant de nouveaux mollusques bivalves aux stades larvaire et juvénile de l'huître Kumamoto (*C. sikamea*) et de la palourde royale (*Panopea abrupta*). Elle a également été identifiée dans l'eau de mer, dans les réserves de microalgues et d'algues, dans les réservoirs d'eau et même dans les conduites d'air d'écloséries (Elston *et al.*, 2008). Le premier isolat français date de 2004 où il avait été isolé dans une éclosérie de mollusques gastéropodes. Cette bactérie n'a pu être détectée de nouveau en France qu'en 2007, au moment de sa réémergence en Amérique entre 2006 et 2007 (Article 1). Ainsi, depuis sa description initiale, des bactéries appartenant à l'espèce *V. tubiashii*, ont pu être décrites à travers le globe, toujours dans les écloséries, isolées d'hôtes jeunes (larves-juvéniles) et surtout sur un spectre d'hôtes variés.

Toutes ces observations nous amènent à envisager deux questions majeures:

(1) S'agit-il d'un agent infectieux spécifique aux stades précoces de la vie des mollusques bivalves? (2) S'agit-il d'un agent infectieux spécifique des écloséries ?

Rétrospectivement, et par le biais de la PCR quantitative (ciblant le gène *gyrB*), notre étude a montré qu'en France, ces nouveaux isolats de *V. tubiashii* avaient été associés à un épisode de mortalité en 2004 d'ormeaux (*Haliotis tuberculata*) issus d'écloséries françaises, à des épisodes de mortalités en 2007 de naissains d'huîtres creuses d'éclosérie et à des

mortalités en 2008 d'huîtres juvéniles également issus d'écloseries. Cependant, aucune identification de cette souche n'a été faite à partir d'huîtres moribondes (naissains, juvéniles ou adultes) prélevées en milieu naturel (Article 1).

Dans le même temps, la virulence de ces isolats a été démontrée par des séries d'infections expérimentales d'huîtres à différents stades de développement (Article 1 et Article 4). L'utilisation de plusieurs techniques d'infection expérimentales (par balnéation et par injection) sur plusieurs stades de vie de l'hôte et sur plusieurs familles d'huîtres de résistances différentes (données non présentées), nous ont permis de modéliser au maximum les phénomènes observés naturellement et de cibler le stade de vie le plus sensible. Pour *C. virginica*, une étude comparative des stades larvaires et juvéniles a rapporté que la sensibilité de l'hôte envers la souche *V. tubiashii* diminuait avec l'âge de l'hôte, un temps moyen de survie de 24 h pour les larves et plus de 6 semaines pour les juvéniles (Gomez-Leon *et al.*, 2008). Dans notre étude, et utilisant le modèle larvaire, nous avons pu visualiser les symptômes de la nécrose bacillaire et repérer à quel moment de l'infection on pouvait commencer à apercevoir les premiers changements phénotypiques (absence de mouvement) (Article 4). Par contre, cela est apparu plus délicat d'observer ces anomalies avec le modèle juvénile car en moins de 24 h post-infection le corps humide de l'huître était dégradé.

Par conséquent, pour la souche française *V. tubiashii*, le modèle larvaire semble le plus sensible et le mieux adapté pour imiter les phénomènes naturels (infection par balnéation avec des concentrations bactériennes plus contrôlées) par rapport au modèle juvénile qui nécessite déjà des injections intramusculaires et des concentrations importantes en bactéries. Il apparaît donc désormais nécessaire de procéder à des examens histologiques et microscopiques sur des larves moribondes de *C. gigas* afin de cibler les organes les plus atteints par la souche française *V. tubiashii*. Le laboratoire LGPMM Ifremer de la station Ronce-Les-Bains dispose déjà de ces techniques et devrait donc pouvoir prochainement aider à l'évaluation de ces atteintes larvaires.

Ce qui est remarquable dans les phénomènes de mortalités observées en France ou ailleurs, c'est que la souche de *V. tubiashii* ait souvent été isolée à partir d'animaux d'écloseries. Cet environnement confiné qui est devenu indispensable pour répondre aux demandes en naissains des conchyliculteurs trouve ici ses limites. Ces installations, dont la température, la salinité, la qualité de l'eau de mer, l'alimentation sont contrôlées, ont été à plusieurs reprises associées aux phénomènes de mortalités touchant plusieurs types d'animaux

d'élevage. En effet, il a été rapporté que la prolifération des bactéries du genre *Vibrio* chez l'ormeau semblait être relative aux conditions d'élevage qualifiées de stressantes et d'intensives qui rendent les jeunes ormeaux plus sensibles à l'infection (Berthe, 2005). Néanmoins, il suffit qu'une seule condition d'élevage soit dérégulée ou non optimisée (température, propreté des installations, air, microalgues contaminées...) pour que l'agent pathogène trouve un champ favorable et passe d'un état de veille à un état actif exposant ainsi la production à une véritable menace (Le Deuff Rose-marie, 1996; Berthe, 2005). Ce cas est très courant fréquent chez les larves qui montrent rarement des symptômes pathologiques prolongés et subissent des mortalités très rapides.

En conclusion, il est important de retenir que les bactéries de l'espèce *V. tubiashii* semblent trouver des conditions favorables en écloserie et affecter même le stade larvaire quand les bactéries sont présentes dans l'eau de mer environnante et ce, pour différentes espèces hôtes. Il semble évident que les systèmes d'élevages au lieu d'être un moyen assurant une production de qualité et continue de naissains pourraient devenir des niches de contamination et de développement de plusieurs types de microorganismes pathogènes. Par conséquent, il semble essentiel que la surveillance des écloséries devrait souvent être maintenue pour assurer une production de qualité.

L'autre question pertinente que l'on peut se poser concernant l'apparition de la souche *V. tubiashii* en France est:

S'agit-il de la même souche qui affecte tous ces différents hôtes dans le monde ou divers «pathotypes» que l'on ne sait pas encore décrire?

Les changements globaux sont susceptibles d'influer tant sur les animaux marins (fragilité, déséquilibre de reproduction et de développement que sur les agents pathogènes (évolution, mutation...) et favorisent ainsi leur émergence et leur prévalence (Burge *et al.*, 2014). L'élévation de la température de l'eau de mer est parmi les facteurs majeurs qui contribuent à l'aggravation des infections. Elston et collaborateurs (Elston *et al.*, 2008) ont expliqué que la réapparition de la vibriose dont celle causée par la souche *V. tubiashii* sur les côtes ouest des États-Unis d'Amérique est probablement due à des changements climatiques divers y compris les variations thermiques, l'acidification de l'eau mer, la mauvaise nutrition et l'accumulation des produits toxiques issus de la dégradation des algues ou de la flore marine. De plus, certains isolats bactériens repérés pendant la réémergence de la souche *V.*

tubiashii en Amérique en 2006 ont montré des nouveaux phénotypes, par comparaison avec la souche *V. tubiashii* RE22 isolée durant les épisodes de mortalités de 2000.

Concernant les souches françaises de *V. tubiashii*, les différentes études menées dans ce travail de thèse ont permis de révéler quelques différences sur le plan phénotypique et métabolique par rapport à la souche américaine. La souche *V. tubiashii* française a été isolée à partir de naissains de *C. gigas* alors que la souche américaine a souvent été détectée chez les larves et à une reprise chez les juvéniles de *C. gigas* (Jeffries, 1982; Estes *et al.*, 2004; Elston *et al.*, 2008). Les essais phylogénétiques basées sur l'analyse de plusieurs gènes de ménages ont montré que les isolats français formaient un groupe phylogénétique homogène, distinct mais proche de la souche américaine *V. tubiashii* (Article 1). En outre, sur les 31 analyses phénotypiques réalisées (portant sur différents critères biochimiques et métaboliques, et en comparaison avec la souche type *V. tubiashii*) ont montré que tous les isolats étaient capables d'utiliser le cellobiose en tant que source de carbone mais qui reste un caractère variable chez les souches de *V. tubiashii* américaines (Article 1). L'étude moléculaire de la structure primaire de la métalloprotéase de la souche française a montré des différences avec des métalloprotéases déjà décrites chez la souche américaine RE22 (VtpA et VtpB) (Article 2 et Article 4). Toutes ces différences laissent suggérer qu'il pourrait s'agir d'un autre «pathotype» ou groupe de virulence) appartenant à l'espèce *V. tubiashii* qui pourrait avoir évolué afin de s'adapter à un nouvel environnement. Nos études *in vitro* illustrent parfaitement les capacités d'adaptation des souches de *V. tubiashii* aux changements environnants. En effet, leurs produits de sécrétion diffèrent en termes de toxicité, de qualité et de quantités protéiques selon les modes de culture utilisés pour notre souche modèle (liquide *vs* solide et compositions variées) utilisés (Article 3).

A l'issue de ces résultats, il serait intéressant de réaliser une étude phylogénétique plus poussée sur des souches de *V. tubiashii* isolées sur différentes années, dans différents endroits du monde et à partir de différents hôtes et de chercher les points communs et les spécificités.

2. ROLE DES FACTEURS DE VIRULENCE DANS LA PATHOGENICITE DES VIBRIO.

S'agit-il de la conjonction de plusieurs facteurs ou de la prédominance d'un seul facteur?

Les bactéries ont la capacité de sécréter plusieurs types de facteur de virulence avec des fonctions différentes. Au moyen de ces déterminants, les bactéries pathogènes sont capables

d'être transmises à un hôte, de se fixer et de coloniser cet hôte, de se multiplier et d'échapper à ses mécanismes de défenses immunitaires. Chez les bactéries du genre *Vibrio*, plusieurs facteurs de virulence ont été décrits incluant les protéases, les entérotoxines, les cytolysines, les sidérophores, les facteurs d'adhésion et les hémagglutinines (Shinoda, 2005).

L'importance des produits extracellulaires dans le cycle de la virulence d'une bactérie pathogène font toujours l'objet d'une attention accrue, comme l'atteste le nombre important de publications sur le sujet. Dans l'objectif de comprendre les interactions entre hôte et pathogène, les approches ont souvent consisté à simplifier le système infectieux en: i) commençant par la validation de la virulence de la souche et l'examen de potentielles cibles sur l'hôte (infection expérimentale, microscopie, histologie...), ii) passant par la mesure de la toxicité des produits de sécrétion et iii) finissant par caractériser le facteur majeur responsable de la toxicité de l'ECPs sous sa forme pure après avoir vérifié par mutagenèse son importance dans la virulence de l'agent pathogène (Binesse *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2008, 2009; Labreuche *et al.*, 2006a,b, 2010). Dans notre étude, une démarche expérimentale proche a été mise en place. Après avoir démontré la virulence de notre souche française modèle sur des juvéniles de *C. gigas*, la toxicité de ses produits de sécrétion, produits *in vitro*, a été prouvée à travers plusieurs modèles d'infection comprenant des larves, des naissains et des juvéniles d'huître creuse (Article 1, Article 3 et Article 4). Les ECPs ont également montré un effet inhibiteur sur la capacité d'adhésion et le pouvoir phagocytaire des hémocytes issus d'huître creuse (Article 2). Cette dérégulation de quelques fonctions immunitaires, sous-entend des modifications morphologiques des hémocytes (arrondissement des cellules), a été renforcée par la capacité des ECPs de la souche française *V. tubiashii* à dégrader des protéines structurales de l'hôte notamment le collagène. Le même processus de digestion a également pu être démontré pour d'autres protéines structurales d'origine bovine telles que l'actine et la fibronectine (Article 2).

Ces résultats expérimentaux nous amènent à discuter du rôle des protéases et notamment de celui des métalloprotéases dans la toxicité des surnageants bactériens. En effet, plusieurs travaux ont décrit l'impact pathologique des métalloprotéases au cours du processus de l'infection (Shinoda *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 2002). Pour la souche de *V. tubiashii* française, l'activité métalloprotéasique a été caractérisée dans les ECPs obtenus par culture *in vitro* de notre souche modèle (Article 2) mais également dans les surnageants d'infection (larves + *V. tubiashii*) (Article 4). Le séquençage du gène de cette métalloprotéase bactérienne

ainsi que l'analyse comparative avec d'autres séquences décrites de métalloprotéases ont validé son appartenance à la famille des thermolysines (Article 2).

Cependant, l'ajout de l'EDTA, dans le bain d'infection des larves de *C. gigas*, comme indicateur de la présence de métalloprotéases, n'a pas permis de réduire les mortalités larvaires. Ce résultat important pose désormais la question du rôle de métalloprotéases actives dans l'expression d'une toxicité par ces ECPs, jusqu'à présent documentées comme facteurs de virulence majeurs (Binesse *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2008). Le fractionnement par chromatographie des ECPs bruts produits *in vitro* par la souche française *V. tubiashii* a permis d'obtenir deux fractions. Une première fraction se compose majoritairement de porine, de protéines de la membrane externe (OMPs) et de protéines hypothétiques alors que la deuxième fraction se trouve enrichie en métalloprotéases actives (Article 4). Ce qui est étonnant dans ce résultat, c'est que les deux fractions se sont révélées toxiques pour les larves d'huître creuse (Article 4) alors que nous nous attendions à une corrélation étroite entre la présence exclusive de métalloprotéases actives dans une fraction et leur toxicité. Cela renforce l'hypothèse que la toxicité des ECPs n'est pas seulement due à un facteur unique, mais plutôt à la conjonction d'un ensemble de facteurs.

L'analyse protéomique des ECPs montre clairement que les métalloprotéases sont les protéines les plus abondantes. Cette abondance relative pourrait masquer d'autres protéines présentes en plus faibles concentrations mais tout aussi importantes dans l'expression de phénotypes de virulence (Valiente *et al.*, 2008). Pour tester cette hypothèse, il serait bon de développer un certain nombre d'outils complémentaires, comme la production de plusieurs métalloprotéases recombinantes afin de tester la robustesse de ce facteur dans la toxicité des sécrétomes bactériens.

La deuxième question qu'on peut poser est:

Pour induire une infection chez l'hôte, les facteurs de virulence agissent d'une manière séquentielle régulée ou d'une façon conjointe?

L'étude menée par Hasegawa et Häse (2009a) a montré que l'activité hémolytique et l'activité métalloprotéasique étaient produites de façon ordonnée au cours de la croissance de la souche américaine *V. tubiashii*. Nous avons observé le même phénomène lorsque nous avons suivi les activités hémolytiques et métalloprotéasiques des surnageants d'infection de

larves par notre souche modèle. En effet, nous avons pu montrer que les gènes codants pour une métalloprotéase et une exochitinase étaient sous-exprimés pendant les premières heures de l'infection puis surexprimés au-delà de 16 h d'infection alors que le gène codant pour une hémolysine thermostable était sur-exprimé tout au long de l'infection (Article 4). Ces résultats suggèrent que la sécrétion de certains facteurs de virulence par la souche française *V. tubiashii* pourrait être régulée pour assurer leur action séquentielle pendant l'infection, à la lumière de ce que les auteurs décrivent déjà pour les vibrions pathogènes pour l'Homme. En effet, Shinoda et Miyoshi (2011) suggèrent que les entérotoxines et les cytotoxines agissent directement sur l'hôte et sont responsables des premiers symptômes, les sidérophores et les facteurs d'adhésions agissent indirectement et sont impliqués dans l'établissement de l'infection et enfin les protéases sont reconnues pour jouer un rôle important dans le développement de l'infection. Il ne faut pas nier aussi le rôle important du Quorum Sensing dans la régulation de l'expression de plusieurs facteurs de virulence (De Decker *et al.*, 2013).

Le suivi de l'expression d'autres déterminants de la virulence au cours de l'infection par cette souche française est donc nécessaire afin de mettre en évidence le rôle de chaque facteur dans le déclenchement et l'installation de la pathologie chez les organismes marins. En plus, il paraîtrait intéressant d'analyser le surnageant d'infection (larve + *V. tubiashii*) obtenu dans les conditions *in vivo* à différents temps par spectrométrie de masse afin de chercher la corrélation entre expression, sécrétion de facteurs de virulence et phénotype induit.

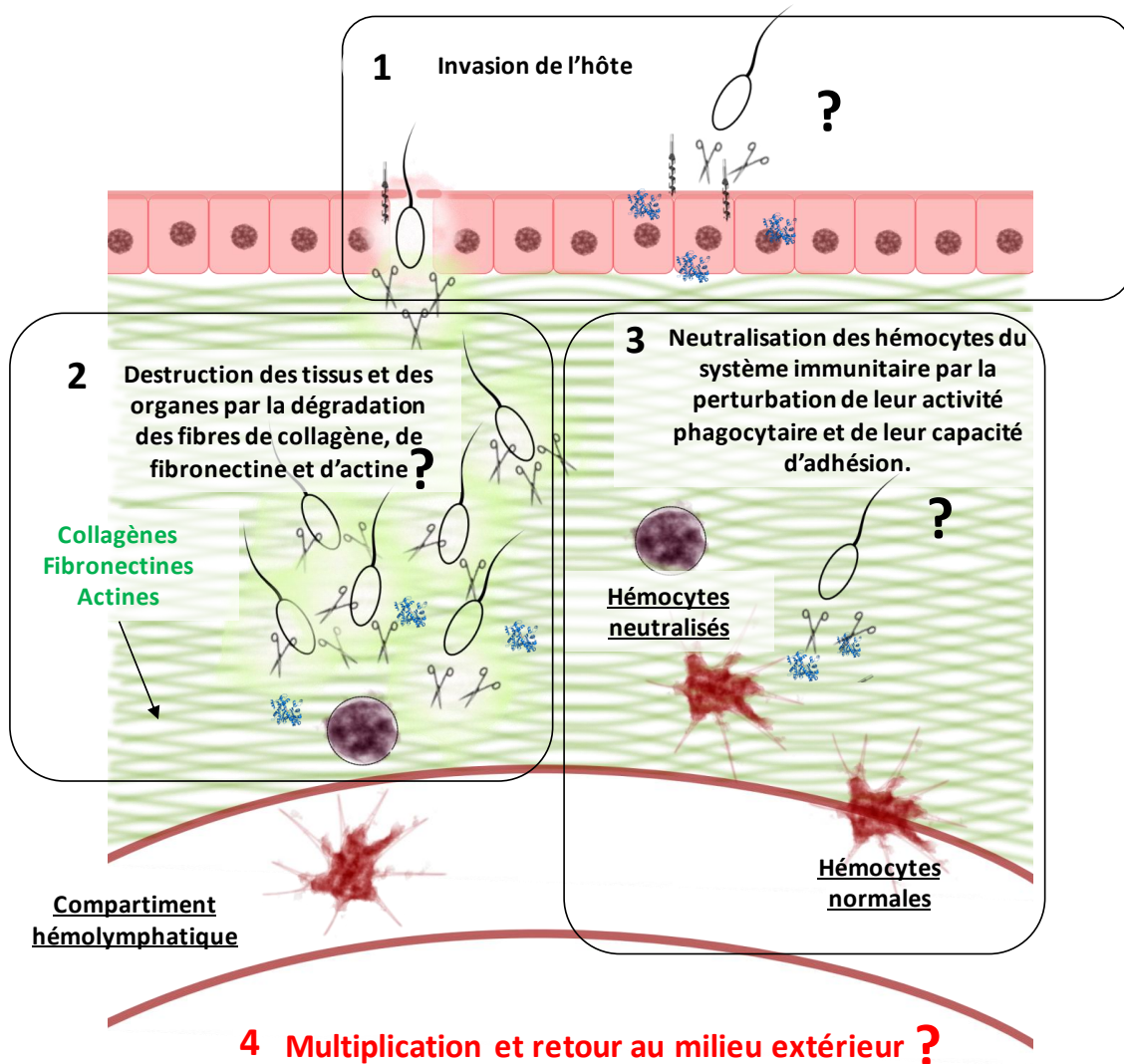
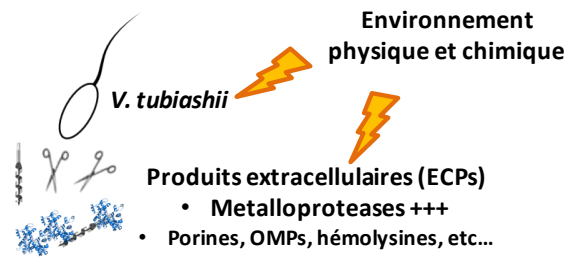
L'utilisation du terme «majeur» employé par plusieurs auteurs pour décrire le rôle d'un facteur de virulence est à prendre avec beaucoup de précautions. Comme nous avons démontré précédemment, un agent pathogène est capable de sécréter plusieurs facteurs de virulence de façon séquentielle et à chaque étape de l'infection.

Ainsi, le rôle d'un facteur peut être majeur dans une étape bien déterminée de l'infection comme au moment de la colonisation ou pendant l'invasion par exemple mais pas dans toutes les étapes de l'infection. L'illustration de ce point de vue est la démonstration dans notre étude de l'inhibition, par les ECPs de la souche française *V. tubiashii*, de la capacité d'adhésion et du pouvoir phagocytaire des hémocytes d'huîtres sans affecter les activités lysosomales et estérases (Article 2).

Ainsi, il semble que la virulence bactérienne résulte d'une conjonction de plusieurs facteurs agissant d'une manière régulée et séquentielle pour installer une infection chez l'hôte. Cependant, des expérimentations complémentaires devront donc être entreprises afin de

mieux comprendre et définir le rôle accordé à chaque potentielle toxine (hémolysines, toxines RTX, OMPs, les métalloprotéases...) dans la virulence de la souche française de *V. tubiashii* ou n'importe quelle autre espèce de *Vibrio* impliquées dans les épisodes de mortalités de mollusques bivalves. Le schéma 23 illustre globalement, en se basant sur les résultats de ce projet de thèse, le mécanisme de pathogénicité mis en œuvre par la souche française de *V. tubiashii* 07/118 T2.

Milieu extérieur



A l'intérieur de l'hôte

Figure 23: Représentation générale des mécanismes hypothétiques de pathogénicité mis en œuvre par la souche française *V. tubiashii* 07/118 T2 basés sur différentes expériences menées *in vitro*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Actis, L. A., Fish, W., Crosa, J. H., Kellerman, K., Ellenberger, S. R., Hauser, F. M. & Sanders-Loehr, J. (1986).** Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *Vibrio anguillarum* 775(pJM1). *J Bacteriol* **167**, 57–65.
- Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. & Saulnier, D. (2005).** Pathogenicity of *Vibrio penaeicida* for white shrimp *Litopenaeus vannamei*: a cysteine protease-like exotoxin as a virulence factor. *Dis Aquat Organ* **67**, 201–207.
- Ahmad, I., Hoessli, D.C., Gupta, R., Walker-Nasir, E., Rafik, S.M., Choudhary, M.I., Shakoori, A.R., Nasir-ud-Din. (2007).** *In silico* determination of intracellular glycosylation and phosphorylation sites in human selectins: Implications for biological function. *J. Cell. Biochem.* **100**, 1558–1572.
- Alapide-Tendencia, E. V. & Dureza, L. A. (1997).** Isolation of *Vibrio spp.* from *Penaeus monodon* (Fabricius) with red disease syndrome. *Aquaculture* **154**, 107–114.
- Alavandi, S. V., Babu, T. D., Abhilash, K. S., Vijayan, K. K., Kalaimani, N. & Santiago, T. C. (2008).** Loose shell syndrome of farmed *Penaeus monodon* in India is caused by a filterable agent. *Dis Aquat Organ* **81**, 163–171.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002).** Programmed Cell Death (Apoptosis). Text, .
- Alcaide, E., Amaro, C., Todol, R. & Oltra, R. (1999).** Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *Aphanius iberus*. *Dis Aquat Organ* **35**, 77–80.
- Allam, B., Ashton-Alcox, K. A. & Ford, S. E. (2002).** Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol* **13**, 141–158.
- Allam, B., Ford, S.E. (2006).** Effects of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following *in vitro* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **20**, 374–383.
- Alsina, M. & Blanch, A. R. (1994a).** A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol* **76**, 79–85.
- Alsina, M. & Blanch, A. R. (1994b).** Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J Appl Bacteriol* **77**, 719–721.
- Amaro, C. & Biosca, E. G. (1996).** *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1454–1457.

- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quiñones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215–237.
- Andrus, C. R., Walter, M., Crosa, J. H. & Payne, S. M. (1983).** Synthesis of siderophores by pathogenic *Vibrio* species. *Curr Microbiol* **9**, 209–214.
- Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C. & Finlay, B. B. (2010).** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* **156**, 2271–2282.
- Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D.R., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., (2009).** Morphological and Molecular Effects of *Vibrio splendidus* on Hemocytes of Softshell Clams, *Mya arenaria*. *J. Shellfish Res.* **28**, 751–758.
- Ashton-Alcox, K. A. & Ford, S. E. (1998).** Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue Cell* **30**, 195–204.
- Asplund, M. E., Baden, S. P., Russ, S., Ellis, R. P., Gong, N. & Hernroth, B. E. (2013).** Ocean acidification and host-pathogen interactions: blue mussels, *Mytilus edulis*, encountering *Vibrio tubiashii*. *Environ Microbiol.*
- Attridge, S. R., Manning, P. A., Holmgren, J. & Jonson, G. (1996).** Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect Immun* **64**, 3369–3373.
- Austin, B. (2010).** *Vibrios* as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* **140**, 310–317.

-B-

- Bacca, H. (2007).** Etude des voies métaboliques des sucres chez l’huitre creuse *crassostrea gigas*. Implication dans les mortalités estivales. Thèse de doctorat, Université de RENNES I.
- Bachère, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morvan, A. & Rodriguez, J. (1995).** Knowledge and research prospects in marine mollusc and crustacean immunology. *Aquaculture* **132**, 17–32.
- Bai, F., Sun, B., Woo, N. Y. S. & Zhang, X.-H. (2010).** *Vibrio harveyi* hemolysin induces ultrastructural changes and apoptosis in flounder (*Paralichthys olivaceus*) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **395**, 70–75.
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R. J. & Rosenberg, E. (2003).** Superoxide Dismutase Is a Virulence Factor Produced by the Coral Bleaching Pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* **46**, 0418–0422.

- Bardy, S. L., Ng, S. Y. M. & Jarrell, K. F. (2003).** Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295–304.
- Bari, S. M. N., Roky, M. K., Mohiuddin, M., Kamruzzaman, M., Mekalanos, J. J. & Faruque, S. M. (2013).** Quorum-sensing autoinducers resuscitate dormant *Vibrio cholerae* in environmental water samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9926–9931.
- Baud, L., Fouqueray, B., Bellocq, A. & Peltier, J. (2003).** Les calpaïnes participent au développement de la réaction inflammatoire. *MS Médecine Sci* **19**, 71–76.
- Beaubrun, J. J.-G., Kothary, M. H., Curtis, S. K., Flores, N. C., Eribo, B. E. & Tall, B. D. (2008).** Isolation and Characterization of *Vibrio tubiashii* Outer Membrane Proteins and Determination of a toxR Homolog. *Appl Environ Microbiol* **74**, 907–911.
- Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J. L. & Figueras, M. J. (2010).** Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environ Microbiol Rep* **2**, 34–43.
- Ben-Haim, Y. & Rosenberg, E. (2002).** A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar Biol* **141**, 47–55.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F. L., Thompson, C. C., Cnockaert, M. C., Hoste, B., Swings, J. & Rosenberg, E. (2003).** *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 309–315
- Berthe, F. (2005).** Diseases in mollusc hatcheries and their paraedox in health management. Presented at the Diseases in Asian Aquaculture.
- Bi, S., Wang, W., Zhao, Y., Ru, S. & Liu, Y. (2011).** Studies on hemolysis of hemolysin produced by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Ocean Univ China* **10**, 362–368.
- Bina, X. R., Provenzano, D., Nguyen, N. & Bina, J. E. (2008).** *Vibrio cholerae* RND Family Efflux Systems Are Required for Antimicrobial Resistance, Optimal Virulence Factor Production, and Colonization of the Infant Mouse Small Intestine. *Infect Immun* **76**, 3595–3605.
- Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., Mazel, D., Roux, F.L., 2008).** Metalloprotease Vsm Is the Major Determinant of Toxicity for Extracellular Products of *Vibrio splendidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7108–7117.
- Biosca, E. G., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. & Garay, E. (1991).** First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis* **14**, 103–109.

- Birkbeck, T. H. & Treasurer, J. W. (2014).** *Vibrio splendidus*, *Vibrio ichthyoenteri* and *Vibrio pacinii* isolated from the digestive tract microflora of larval ballan wrasse, *Labrus bergylta* Ascanius, and goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* (L.). *J Fish Dis* **37**, 69–74.
- Black, P. N. (1988).** The *fadL* gene product of *Escherichia coli* is an outer membrane protein required for uptake of long-chain fatty acids and involved in sensitivity to bacteriophage T2. *J Bacteriol* **170**, 2850–2854.
- Blake, P. A., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. & Heublein, P. C. (1979).** Disease Caused by a Marine *Vibrio*. *N Engl J Med* **300**, 1–5.
- Blanchet, X. (2010).** Des gènes impliqués dans la variabilité de la tendreté des viandes bovines : étude structure-fonction de l’anti-protéase codée par le gène bovin SERPINA3-3. Thèse de doctorat, Université de Limoges.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X. & Stöckler, W. (1993).** Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett* **331**, 134–140.
- Borrego, J. J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., Garcia, M. T. & Ventosa, A. (1996).** *Vibrio tapetis* sp. nov., the Causative Agent of the Brown Ring Disease Affecting Cultured Clams. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 480–484.
- Bower, S., Hervio, D. & Meyer, G. (1997).** Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Dis Aquat Organ* **29**, 111–116.
- Brackney, D. E. (2007).** The Role of Midgut Serine Proteases in *Aedes Aegypti* Vector Competence. ProQuest.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Braun, P., de Groot, A., Bitter, W. & Tommassen, J. (1998).** Secretion of Elastinolytic Enzymes and Their Propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 3467–3469.
- Brauns, L. A., Hudson, M. C. & Oliver, J. D. (1991).** Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2651–2655.

- Brew, K., Dinakarpanthian, D. & Nagase, H. (2000).** Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 267–283.
- Broberg, C.A., Calder, T.J., Orth, K. (2011).** *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.* **13**, 992–1001.
- Brown, C. & Losee, E. (1978).** Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *J Invertebr Pathol* **31**, 41–47.
- Brown, C. & Roland, G. (1984).** Characterization of exotoxin produced by a shellfish-pathogenic *Vibrio* sp. *J Fish Dis* **7**, 117–126.
- Bruno Gomez-Gil, S. S.-R. (2004).** Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiol Read Engl* **150**, 1769–77.
- Burge, C. A., Mark Eakin, C., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., Petes, L. E., Prager, K. C., Weil, E. & other authors. (2014).** Climate Change Influences on Marine Infectious Diseases: Implications for Management and Society. *Annu Rev Mar Sci* **6**, 249–277.
- Butler, A. & Theisen, R. M. (2010).** Iron(III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coord Chem Rev* **254**, 288–296.

-C-

- Cahill, M. M. (1990).** Bacterial flora of fishes: A review. *Microb Ecol* **19**, 21–41.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. & Pruzzo, C. (2002).** Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc Res Tech* **57**, 469–476.
- Cano-Gómez, A., Goulden, E. F., Owens, L. & Høj, L. (2010).** *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. *FEMS Microbiol Lett* **302**, 175–181.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (1999).** Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect Immun* **67**, 3703–3713.
- Casadevall, A. & Pirofski, L. (2003).** Microbial virulence results from the interaction between host and microorganism. *Trends Microbiol* **11**, 157–158.
- Casadevall, A. & Pirofski, L.-A. (2009).** Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J Water Health* **7 Suppl 1**, S2–S18.
- Ceccarelli, D., Spagnoletti, M., Cappuccinelli, P., Burrus, V. & Colombo, M. M. (2011).** Origin of *Vibrio cholerae* in Haiti. *Lancet Infect Dis* **11**, 262.

- Chen, C.-Y., Wu, K.-M., Chang, Y.-C., Chang, C.-H., Tsai, H.-C., Liao, T.-L., Liu, Y.-M., Chen, H.-J., Shen, A. B.-T. & other authors. (2003).** Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res* **13**, 2577–2587.
- Chen, F. R., Liu, P. C. & Lee, K. K. (1999).** Purification and partial characterization of a toxic serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*. *Microbios* **98**, 95–111.
- Chen, Y.-C., Chang, M.-C., Chuang, Y.-C. & Jeang, C.-L. (2004).** Characterization and Virulence of Hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol* **49**, 175–179.
- Cheng, T. C. (1984).** A Classification of Molluscan Hemocytes Based on Functional Evidences. In *Invertebr Blood, Comparative Pathobiology*, pp. 111–146. Edited by T. C. Cheng. Springer US.
- Cheng, T. C. & Sullivan, J. T. (1984).** Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. *Mar Environ Res* **14**, 305–315.
- Cheung, A. L. & Fischetti, V. A. (1988).** Variation in the expression of cell wall proteins of *Staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. *Infect Immun* **56**, 1061–1065.
- Chopp, D. L., Kirisits, M. J., Moran, B. & Parsek, M. R. (2003).** The dependence of quorum sensing on the depth of a growing biofilm. *Bull Math Biol* **65**, 1053–1079.
- Choquet, G., Soudant, P., Lambert, C., Nicolas, J., Paillard, C. (2003).** Reduction of adhesion properties of *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* **57**, 109–116.
- Chowdhury, M. A., Miyoshi, S. & Shinoda, S. (1990).** Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. *Infect Immun* **58**, 4159–4162.
- Chu, F.-L. E. (2000).** *Defense mechanisms of marine bivalves In Recent Advances in Marine Biotechnology. Immunobiology and Pathology. Publishers., M. Fingerman and R. Nagabhushanam. Enfield, NH, Plymouth, UK: Science.*
- Chu, F.-L. E. & Webb, K. L. (1984).** Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids* **19**, 815–820.
- Chuang, Y. C., Chang, T. M. & Chang, M. C. (1997).** Cloning and characterization of the gene (empV) encoding extracellular metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. *Gene* **189**, 163–168.
- Cobaxin, M., Martínez, H., Ayala, G., Holmgren, J., Sjöling, Å. & Sánchez, J. (2014).** Cholera toxin expression by El Tor *Vibrio cholerae* in shallow culture growth conditions. *Microb Pathog* **66**, 5–13.

- Cohen, N. & Karib, H. (2007).** *Vibrio* spp. dans les produits de la pêche: Risques et prévention.
- Colman, P. M., Jansonius, J. N. & Matthews, B. W. (1972).** The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol* **70**, 701–724.
- Coloni, A., Paperna, I. & Gordin, H. (1981).** Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture* **23**, 257–267.
- Colwell, R. R. & Liston, J. (1960).** Microbiology of Shellfish. Bacteriological Study of the Natural Flora of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl Microbiol* **8**, 104–109.
- Colwell, R. R. & Sparks, A. K. (1967).** Properties of *Pseudomonas* enalia, a Marine Bacterium Pathogenic for the Invertebrate *Crassostrea gigas* (Thunberg)1. *Appl Microbiol* **15**, 980–986.
- Comps, M., Bonami, J.-R., Vago, C. & Razet, D. (1976).** La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Sci Pêche* **256**, 13–15.
- Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legroumellec, M. & Grimont, P. (1998).** Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**, 297–309.
- Coulis, G. (2007).** Interactions moléculaires des calpaines 1 et 3 avec la région N1 de la titine humaine. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
- Crowther, R. S., Roomi, N. W., Fahim, R. E. & Forstner, J. F. (1987).** *Vibrio cholerae* metalloproteinase degrades intestinal mucin and facilitates enterotoxin-induced secretion from rat intestine. *Biochim Biophys Acta* **924**, 393–402.

-D-

- Daily, O. P., Debell, R. M. & Joseph, S. W. (1978).** Superoxide dismutase and catalase levels in halophilic vibrios. *J Bacteriol* **134**, 375–380.
- Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Heinrichs, D. E. (2004).** Role of Siderophore Biosynthesis in Virulence of *Staphylococcus aureus*: Identification and Characterization of Genes Involved in Production of a Siderophore. *Infect Immun* **72**, 29–37.

- David, V. A., Deutch, A. H., Sloma, A., Pawlyk, D. & Durham, D. R. (1992).** Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* **112**, 107–112.
- Davis, G. H. G. & Park, R. W. A. (1962).** A Taxonomic Study of Certain Bacteria Currently Classified as *Vibrio* Species. *J Gen Microbiol* **27**, 101–119.
- De Decker, S., Normand, J., Saulnier, D., Pernet, F., Castagnet, S. & Boudry, P. (2011).** Responses of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* to *Vibrio* infection in relation to their reproductive status. *J Invertebr Pathol* **106**, 179–191.
- De Decker, S. & Saulnier, D. (2011).** Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol* **30**, 691–699.
- De Decker, S., Reynaud, Y. & Saulnier, D. (2013).** First molecular evidence of cross-species induction of metalloprotease gene expression in *Vibrio* strains pathogenic for Pacific oyster *Crassostrea gigas* involving a quorum sensing system. *Aquaculture* **392–395**, 1–7.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. & Verstraete, W. (2004).** Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**, 69–88.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. & Bossier, P. (2008).** Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from *in vivo* work. *ISME J* **2**, 19–26.
- Dégremont, L., Bédier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F. & Boudry, P. (2005).** Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **249**, 213–229.
- Delston, R.B., Kothary, M.H., Shangraw, K.A., Tall, B.D. (2003).** Isolation and characterization of a zinc-containing metalloprotease expressed by *Vibrio tubiashii*. *Can. J. Microbiol.* **49**, 525–529.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E. & Destoumieux-Garzón, D. (2010).** The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* **12**, 951–963.

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R. D., Roux, F. L., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B. & other authors. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci* 201015326.

-E-

Elgaml, A., Higaki, K. & Miyoshi, S. (2013). Regulation system of serine protease production in *Vibrio vulnificus* strain NCIMB 2137, a metalloprotease-gene negative strain isolated from a diseased eel. *Aquaculture* **416–417**, 315–321.

Ellinger, G.M., Boyne, E.B.(1965). Amino acid composition of some fish products and casein. *Br. J. Nutr.* 19, 587–592.

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

Elston, R. A. (1999). *Health Management, Development and Histology of Seed Oysters*. World Aquaculture Society.

Erz, W., Carrle, D. & Klessen, C. (1993). Proteases of polymorphonuclear neutrophils: Influence of different salts and buffers on pericellular lysis. *Acta Histochem* **94**, 46–53.

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

Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989). Fluorometric Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Hybridization in Microdilution Wells as an Alternative to Membrane Filter Hybridization in which Radioisotopes Are Used To Determine Genetic Relatedness among Bacterial Strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224–229.

-F-

Fabbri, A., Falzano, L., Frank, C., Donelli, G., Matarrese, P., Raimondi, F., Fasano, A. & Fiorentini, C. (1999). *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin

- Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells. *Infect Immun* **67**, 1139–1148.
- Farto, R., Pérez, M. ., Fernández-Briera, A. & Nieto, T. . (2002).** Purification and partial characterisation of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius*. *Vet Microbiol* **89**, 181–194.
- Farto, R., Armada, S. P., Montes, M., Guisande, J. A., Pérez, M. J. & Nieto, T. P. (2003).** *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). *J Invertebr Pathol* **83**, 149–156.
- Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F. L., Gay, M., Swings, J. & Le Roux, F. (2004).** *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2137–2140.
- Felsenstein, J. (1985).** Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **39**, 783.
- Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K. & Olsvik, O. (1992).** Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol* **30**, 2118–2121.
- Finlay, B. B. & Falkow, S. (1997).** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **61**, 136–169.
- Fisher, W. S. (1986).** Structure and Functions of Oyster Hemocytes. In *Immun Invertebr*, Proceedings in Life Sciences, pp. 25–35. Edited by D. M. Brehélin. Springer Berlin Heidelberg.
- Fontana, A. (1988).** Structure and stability of thermophilic enzymes Studies on thermolysin. *Biophys Chem* **29**, 181–193.
- Foster, J. S., Apicella, M. A. & McFall-Ngai, M. J. (2000).** *Vibrio fischeri* Lipopolysaccharide Induces Developmental Apoptosis, but Not Complete Morphogenesis, of the Euprymna scolopes Symbiotic Light Organ. *Dev Biol* **226**, 242–254.
- Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1992).** Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis Aquat Organ* **12**, 155–166.
- Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B. & Rediers, H. (2011).** *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *J Fish Dis* **34**, 643–661.

Fullner Satchell, K. J. (2003). Activation and suppression of the proinflammatory immune response by *Vibrio cholerae* toxins. *Microbes Infect* **5**, 1241–1247.

-G-

Gadwal, S., Korotkov, K. V., Delarosa, J. R., Hol, W. G. J. & Sandkvist, M. (2014). Functional and structural characterization of *Vibrio cholerae* extracellular serine protease B, VesB. *J Biol Chem* jbc.M113.525261.

Gagnaire, B., Renault, T., Bouilly, K., Lapegue, S., Thomas-Guyon, H. (2003). Study of atrazine effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, haemocytes. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 193–199.

Gagnaire, B. (2005). Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle.

Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J. & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J Sea Res* **75**, 135–141.

Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M. & Nicolas, J.-L. (2007). Evidence for the Involvement of Pathogenic Bacteria in Summer Mortalities of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Microb Ecol* **53**, 187–196.

Garnier, M., Labreuche Y., Nicolas, J.-L. (2008). Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**, 358–365.

Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M. & Le Roux, F. (2004). Two *vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ* **62**, 65–74.

Gentschev, I., Dietrich, G. & Goebel, W. (2002). The E. coli alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* **10**, 39–45.

Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launey, S., Heurtebise, S., Ledu, C. & Phelipot, P. (1995). Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations 'reproduction' et 'génétique'. Presented at the Groupe de travail sur la Reproduction des Mollusques. Bivalves Aquaculture Marine.

- Gharaibeh, D. N., Hasegawa, H. & Häse, C. C. (2009).** Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Vibrio tubiashii* targeting the metalloprotease gene. *J Microbiol Methods* **76**, 262–268.
- Gharaibeh, D. N., Biel, F. M. & Häse, C. C. (2013).** Development of monoclonal antibody-based assays for the detection of *Vibrio tubiashii* zinc-metalloprotease (VtpA). *J Microbiol Methods* **94**, 125–132.
- Giraudier, S. (2004).** Remodelage dynamique de gels de protéines : études de transitions de gélification catalysées par des enzymes à activités antagonistes. Thèse de doctorat, Cergy-Pontoise.
- Glaser, L., Melo, A. & Paul, R. (1967).** Uridine Diphosphate Sugar Hydrolase purification of enzyme and protein inhibitor. *J Biol Chem* **242**, 1944–1954.
- Goebel, W., Chakraborty, T. & Kreft, J. (1988).** Bacterial hemolysins as virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek* **54**, 453–463.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., Novoa, B. & 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.
- Gomez-Leon, J., Villamil, L., Salger, S. A., Sallum, R. H., RemachaTrivio, A., Leavitt, D. F. & Gomez-Chiarri, M. (2008).** Survival of eastern oysters *Crassostrea virginica* from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. *Dis Aquat Organ* **79**, 95–105.
- Gomis-Rüth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K. & other authors. (1997).** Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* **389**, 77–81.
- Gonzalez, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., Goot, F. G. van der & Frêche, B. (2008).** Bacterial pore-forming toxins: The whole story? *Cell Mol Life Sci* **65**, 493–507.
- Goo, S. Y., Lee, H.-J., Kim, W. H., Han, K.-L., Park, D.-K., Lee, H.-J., Kim, S. M., Kim, K.-S., Lee, K.-H. & Park, S.-J. (2006).** Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a Fibronectin-Binding Protein and Its Role in Bacterial Pathogenesis. *Infect Immun* **74**, 5586–5594.
- Gray, L. D. & Kreger, A. S. (1985).** Purification and characterization of an extracellular cytotoxin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **48**, 62–72.
- Griffiths, G. L., Sigel, S. P., Payne, S. M. & Neilands, J. B. (1984).** Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **259**, 383–385.

- Grizel, H. (2003).** Atlas d'histologie et de cytologie des mollusques bivalves marins. Editions Quae.
- Grizel, H. & Héral, M. (1991).** Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J Cons ICES J Mar Sci* **47**, 399–403.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wicz, W., Wieczerek, E., Ciarkowski, J., Drabik, P. & other authors. (2001).** Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim Pol* **48**, 1–20.
- Guan, L. L., Kanoh, K. & Kamino, K. (2001).** Effect of Exogenous Siderophores on Iron Uptake Activity of Marine Bacteria under Iron-Limited Conditions. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1710–1717.
- Gubala, A. J. & Proll, D. F. (2006).** Molecular-Beacon Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6424–6428.
- Guentzel, M. N. & Berry, L. J. (1975).** Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **11**, 890–897.
- Cyrille Goarant, D. A. (2006).** ‘Summer Syndrome’ in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* **253**, 105–113.

-H-

- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J., Colwell, R.R. (1984).** *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 1–4.
- Ham, H. & Orth, K. (2012).** The role of type III secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity. *J Microbiol Seoul Korea* **50**, 719–725.
- Hammer, B. K. & Bassler, B. L. (2003).** Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **50**, 101–104.
- Han, Y., Mo, Z., Xiao, P., Hao, B., Li, J. & Yang, G. (2011).** Characterization of EmpA protease in *Vibrio anguillarum* M3. *J Ocean Univ China* **10**, 379–384.
- Hare, P., Scott-Burden, T. & Woods, D. R. (1983).** Characterization of Extracellular Alkaline Proteases and Collagenase Induction in *Vibrio alginolyticus*. *J Gen Microbiol* **129**, 1141–1147.

- Hase, C. C. & Finkelstein, R. A. (1991).** Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J Bacteriol* **173**, 3311–3317.
- Häse, C. C. & Finkelstein, R. A. (1993).** Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* **57**, 823–837.
- Hasegawa, H., Häse, C.C., (2009a).** The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* directly inhibits its extracellular haemolysin. *Microbiology* **155**, 2296–2305.
- Hasegawa, H. & Häse, C. C. (2009b).** TetR-Type Transcriptional Regulator VtpR Functions as a Global Regulator in *Vibrio tubiashii*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7602–7609.
- Hasegawa, H., Lind, E.J., Boin, M.A., Häse, C.C.(2008).** The Extracellular Metalloprotease of *Vibrio tubiashii* Is a Major Virulence Factor for Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4101–4110.
- Hasegawa, H., Gharaibeh, D. N., Lind, E. J. & Häse, C. C. (2009).** Virulence of metalloproteases produced by *Vibrio* species on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **85**, 123–131.
- Hashem, M. & El-Barbary, M. (2013).** *Vibrio harveyi* infection in Arabian Surgeon fish (*Acanthurus sohal*) of Red Sea at Hurghada, Egypt. *Egypt J Aquat Res* **39**, 199–203.
- Hedstrom, L. (2002).** Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem Rev* **102**, 4501–4524.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P. (2003).** Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **293**, 249–265.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D. & other authors. (2000).** DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**, 477–483.
- Henke, J. M. & Bassler, B. L. (2004).** Quorum Sensing Regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **186**, 3794–3805.
- Hine, P. . (1999).** The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **9**, 367–385.
- Hoffmann, M., Monday, S. r., Fischer, M. & Brown, E. w. (2012).** Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the *Harveyi* clade. *Lett Appl Microbiol* **54**, 160–165.

- Hooper, N. M. (1990).** Proteolytic enzymes: A practical approach Edited by R J Beynon and J S Bond. pp 259. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 1989. £29 (spiral bound)/£19 (paper) ISBN 0-19-963058-5/963059-3. *Biochem Educ* **18**, 55–55.
- Hooper, N. M. (1994).** Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1–6.
- Horseman, M. A. & Surani, S. (2011).** A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis* **15**, 157–166.
- Hossain, M. T., Kim, Y.-O. & Kong, I.-S. (2013).** Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the groEL, tdh and trh genes. *Mol Cell Probes* **27**, 171–175.

-I-

- Igbinosa, E. O. & Okoh, A. I. (2008).** Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Res Microbiol* **159**, 495–506.
- Iii, J. J. F. & Hickman-Brenner, F. W. (2006).** The Genera *Vibrio* and Photobacterium. In *The Prokaryotes*, pp. 508–563. Edited by M. D. P. Dr, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. Springer New York.
- Ishihara, M., Kawanishi, A., Watanabe, H., Tomochika, K., Miyoshi, S. & Shinoda, S. (2002).** Purification of a serine protease of *Vibrio parahaemolyticus* and its characterization. *Microbiol Immunol* **46**, 298–303.

-J-

- Jacobsen, J., Visse, R., Sørensen, H. P., Enghild, J. J., Brew, K., Wewer, U. M. & Nagase, H. (2008).** Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants. *Biochemistry (Mosc)* **47**, 537–547.
- Jacques, M. (2004).** Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res* **68**, 81–85.
- Jeffries, V.E.(1982).** Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* **29**, 201–226.
- Jiang, Q., Shi, L., Ke, C., You, W. & Zhao, J. (2013).** Identification and characterization of *Vibrio harveyi* associated with diseased abalone *Haliotis diversicolor*. *Dis Aquat Organ* **103**, 133–139.

- Johnson, J. A., Panigrahi, P. & Morris, J. G. (1992).** Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. *Infect Immun* **60**, 864–869.
- Jones, M. K. & Oliver, J. D. (2009).** *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infect Immun* **77**, 1723–1733.
- Kabir, S. (1982).** Characterization of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* 395 (Ogawa). *Infect Immun* **38**, 1263–1272.

-K-

- Kadi, N. & Challis, G. L. (2009).** Chapter 17. Siderophore biosynthesis a substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. *Methods Enzymol* **458**, 431–457.
- Karlsen, C., Paulsen, S. M., Tunsjø, H. S., Krinner, S., Sørum, H., Haugen, P. & Willassen, N.-P. (2008).** Motility and flagellin gene expression in the fish pathogen *Vibrio salmonicida*: Effects of salinity and temperature. *Microb Pathog* **45**, 258–264.
- Kavitha, S., Adish Kumar, S., Yogalakshmi, K. N., Kaliappan, S. & Rajesh Banu, J. (2013).** Effect of enzyme secreting bacterial pretreatment on enhancement of aerobic digestion potential of waste activated sludge interceded through EDTA. *Bioresour Technol* **150**, 210–219.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. & Gibson, L. (2009).** Two pathogens of GreenshellTM mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *J Fish Dis* **32**, 499–507.
- Kiiyukia, C., Nakajima, A., Nakai, T., Muroga, K., Kawakami, H. & Hashimoto, H. (1992).** *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3078–3082.
- Kim, M. S. & Jeong, H. D. (2001).** Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. *Aquaculture* **193**, 199–211.
- Kim, S. K., Yang, J. Y. & Cha, J. (2002).** Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* **283**, 277–286.
- Kim, Y. B., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. & Nishibuchi, M. (1999).** Identification of *Vibrio parahaemolyticus* Strains at the Species Level by PCR Targeted to the *toxR* Gene. *J Clin Microbiol* **37**, 1173–1177.

- Kochut, A. & Dersch, P. (2013).** Bacterial invasion factors: Tools for crossing biological barriers and drug delivery? *Eur J Pharm Biopharm* **84**, 242–250.
- Kothary, M.H., Delston, R.B., Curtis, S.K., McCardell, B.A., Tall, B.D. (2001).** Purification and Characterization of a Vulnificolysin-Like Cytolysin Produced by *Vibrio tubiashii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3707–3711.
- Koutsogiannaki, S., Kaloyianni, M. (2011).** Effect of 17 β -estradiol on adhesion of *Mytilus galloprovincialis* hemocytes to selected substrates. Role of alpha2 integrin subunit. *Fish Shellfish Immunol.* **31**, 73–80.
- Krukonis, E. S. & DiRita, V. J. (2003).** From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol* **6**, 186–190.
- Kudryashova, E. V., Mozhaev, V. V. & Balny, C. (1998).** Catalytic activity of thermolysin under extremes of pressure and temperature: modulation by metal ions. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* **1386**, 199–210.
- Kushmaro, A., Banin, E., Loya, Y., Stackebrandt, E. & Rosenberg, E. (2001).** *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1383–1388.
- Kwon, Y. T., Kim, J. O., Moon, S. Y., Yoo, Y. D. & Rho, H. M. (1995).** Cloning and characterization of the gene encoding an extracellular alkaline serine protease from *Vibrio metschnikovii* strain RH530. *Gene* **152**, 59–63.

-L-

- Labreuche, Y. (2006).** Caractérisation de la virulence d'une souche de *Vibrio aestuarianus*, pathogène de l'huître *Crassostrea gigas*. Thesis, Université de Bretagne occidentale - BREST.
- Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J. (2006 a).** Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 367–379.
- Labreuche, Yannick., Lambert, C., Soudant, P., Boulo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L. (2006b).** Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* **8**, 2715–2724.

- Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., Soudant, P., Mazel, D., Nicolas, J.-L. (2010).** *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol.* **29**, 753–758.
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. & Poulet, S. A. (2001).** A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Organ* **46**, 139–145.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Publ Online* **227**, 680–685.
- Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V. & Corre, S. (1998).** *Vibrio pectenecida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**, 481–487.
- Lambert, C., Nicolas, J. L. & Cilia, V. (1999).** *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **19**, 102–106.
- Lane, E. & Birkbeck, T. H. (2000).** Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J Fish Dis* **23**, 275–279.
- Lane, E., Birkbeck, T.H. (1999).** Toxicity of bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat. Living Resour.* **12**, 343–350.
- Larsen, K. S. & Auld, D. S. (1991).** Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry (Mosc)* **30**, 2613–2618.
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R. & de la Pena, L. D. (1990).** Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* **91**, 1–13.
- Leclerc, M. (1996).** Humoral Factors in Marine Invertebrates. In *Invertebr Immunol*, Progress in Molecular and Subcellular Biology, pp. 1–9. Edited by P. D. B. Rinkevich & P. D. W. E. G. Müller. Springer Berlin Heidelberg.
- Le Deuff Rose-marie., Renault, T., Gerard, A (1996).** Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org Inter-Res.* **24** 149-157.
- Lee, B. C., Choi, S. H. & Kim, T. S. (2008).** *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect* **10**, 1504–1513.

- Lee, C. Y., Su, S. C. & Liaw, R. B. (1995). Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Read Engl* **141**, 2569–2576.
- Lee, C.-Y., Cheng, M.-F., Yu, M.-S. & Pan, M.-J. (2002). Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 31–37.
- Lee, H.-J., Kim, J.-A., Lee, M.-A., Park, S.-J. & Lee, K.-H. (2013). Regulation of haemolysin (VvhA) production by ferric uptake regulator (Fur) in *Vibrio vulnificus*: repression of *vvhA* transcription by Fur and proteolysis of VvhA by Fur-repressive exoproteases. *Mol Microbiol* **88**, 813–826.
- Lee, J.-H., Kim, G.-T., Lee, J.-Y., Jun, H.-K., Yu, J.-H. & Kong, I.-S. (1998a). Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol* **1384**, 1–6.
- Lee, J.-H., Ahn, S.-H., Lee, E.-M., Kim, Y.-O., Lee, S.-J., Kong, I.-S., (2003). Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 293–300.
- Lee, K. K., Yu, S. R. & Liu, P. C. (1997). Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr Microbiol* **34**, 110–117.
- Lee, K. K., Liu, P. C. & Chuang, W. H. (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Mar Biotechnol N Y N* **4**, 267–277.
- Lee, K.-K., Chen, Y.-L. & Liu, P.-C. (1999). Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* Affected by *Vibrio harveyi*, Extracellular Products, and a Toxic Cysteine Protease. *Blood Cells Mol Dis* **25**, 180–192.
- Lee, S. E., Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, H. S., Shin, J. H., Choi, S. H., Chung, S. S. & Rhee, J. H. (1998b). Direct Identification of *Vibrio vulnificus* in Clinical Specimens by Nested PCR. *J Clin Microbiol* **36**, 2887–2892.
- Lemos, M. L., Balado, M. & Osorio, C. R. (2010). Anguibactin- versus vanchrobactin-mediated iron uptake in *Vibrio anguillarum*: evolution and ecology of a fish pathogen. *Environ Microbiol Rep* **2**, 19–26.
- Le Roux, F. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* **15**, 251–258.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., Gouy, M. & Berthe, F. (2004). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Dis Aquat Organ* **58**, 143–150.

- Le Roux, F., Labreuche, Y., Davis, B. M., Iqbal, N., Mangenot, S., Goarant, C., Mazel, D. & Waldor, M. K. (2011).** Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ Microbiol* **13**, 296–306.
- Li, J., Lim, M. S., Li, S., Brock, M., Pique, M. E., Woods Jr., V. L. & Craig, L. (2008).** *Vibrio cholerae* Toxin-Coregulated Pilus Structure Analyzed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Structure* **16**, 137–148.
- 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. & Vora, G. J. (2010a).** Comparative genomic analyses identify the *Vibrio harveyi* genome sequenced strains BAA-1116 and HY01 as *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol Rep* **2**, 81–89.
- Lin, J. E., Valentino, M., Marszalowicz, G., Magee, M. S., Li, P., Snook, A. E., Stoecker, B. A., Chang, C. & Waldman, S. A. (2010b).** Bacterial Heat-Stable Enterotoxins: Translation of Pathogenic Peptides into Novel Targeted Diagnostics and Therapeutics. *Toxins* **2**, 2028–2054.
- Lin, J., Huang, S. & Zhang, Q. (2002).** Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect Inst Pasteur* **4**, 325–331.
- Lin, W., Fullner, K. J., Clayton, R., Sexton, J. A., Rogers, M. B., Calia, K. E., Calderwood, S. B., Fraser, C. & Mekalanos, J. J. (1999).** Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1071–1076.
- Litwin, C. M., Rayback, T. W. & Skinner, J. (1996).** Role of catechol siderophore synthesis in *Vibrio vulnificus* virulence. *Infect Immun* **64**, 2834–2838.
- Liu, C.-H., Cheng, W., Hsu, J.-P. & Chen, J.-C. (2004).** *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Dis Aquat Organ* **61**, 169–174.
- Liu, P. C., Chen, Y. C. & Lee, K. K. (2001).** Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* **104**, 71–77.
- Liu, P.-C. & Lee, K.-K. (1999).** Cysteine protease is a major exotoxin of pathogenic luminous *Vibrio harveyi* in the tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* **28**, 428–430.
- Liu, P.-C., Lee, K.-K., Tu, C.-C. & Chen, S.-N. (1997).** Purification and Characterization of a Cysteine Protease Produced by Pathogenic Luminous *Vibrio harveyi*. *Curr Microbiol* **35**, 32–39.

- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C. P. & Toranzo, A. E. (1987).** Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* **65**, 15–29.
- Lorian, V. (1989).** *In vitro* simulation of *in vivo* conditions: physical state of the culture medium. *J Clin Microbiol* **27**, 2403–2406.
- Lorian, V. (1988).** Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* **32**, 1600–1601.
- Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J. E., Farmer, J. J., 3rd, Hickman, F. W. & Fanning, G. R. (1981).** *Vibrio damsela*, a Marine Bacterium, Causes Skin Ulcers on the Damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* **214**, 1139–1140.
- Luan, X., Chen, J., Zhang, X., Li, Y. & Hu, G. (2007).** Expression and characterization of a metalloprotease from a *Vibrio parahaemolyticus* isolate. *Can J Microbiol* **53**, 1168–1173.

-M-

- Maeda, H. & Molla, A. (1989).** Pathogenic potentials of bacterial proteases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **185**, 357–367.
- Majumder, R., Sengupta, S., Khetawat, G., Bhadra, R. K., Roychoudhury, S. & Das, J. (1996).** Physical map of the genome of *Vibrio cholerae* 569B and localization of genetic markers. *J Bacteriol* **178**, 1105–1112.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M. & other authors. (2003).** Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V cholerae*. *The Lancet* **361**, 743–749.
- Marvin, H. J., ter Beest, M. B. & Witholt, B. (1989).** Release of outer membrane fragments from wild-type *Escherichia coli* and from several *E. coli* lipopolysaccharide mutants by EDTA and heat shock treatments. *J Bacteriol* **171**, 5262–5267.
- Massé, E. & Arguin, M. (2005).** Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* **30**, 462–468.
- Mateo, D.R., Siah, A., Araya, M.T., Berthe, F.C.J., Johnson, G.R., Greenwood, S.J. (2009).** Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: Changes in cell structure, numbers and adherence. *J. Invertebr. Pathol.* **102**, 50–56.

- Matozzo, V., Rova, G. & Marin, M. G. (2007).** Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol* **23**, 732–746.
- May, R. C. & Machesky, L. M. (2001).** Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **114**, 1061–1077.
- McCarter, L. & Silverman, M. (1990).** Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol Microbiol* **4**, 1057–1062.
- McGwire, B.S., Chang, K.-P. (1996).** Posttranslational Regulation of a Leishmania HEXXH Metalloprotease (gp63). *J. Biol. Chem.* **271**, 7903–7909. *J. Biol. Chem.* **271**, 7903–7909.
- McIver, K. S., Kessler, E., Olson, J. C. & Ohman, D. E. (1995).** The elastase propeptide functions as an intramolecular chaperone required for elastase activity and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **18**, 877–889.
- Mersni Achour, R., Doghri, I., Pichereau, V., Ben Cheikh, Y., Haffner, P., Sablé, S., Saulnier, D., Travers, M.-A. & Fruitier-Arnaudin, I. (unpublished).** Toxicity and proteases composition of extracellular products from the french *Vibrio tubiashii* are modulated by physical and chemical characteristics of growth media. *Microbiology*.
- Mersni Achour, R., Imbert, N., Huet, V., Ben Cheikh, Y., Faury, N., Doghri, I., Rouatbi, S., Bordenave, S., Travers, M.-A. & other authors. (under review).** First description of french *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: II. Characterization of properties of the proteolytic fraction of extracellular products. *J Invertebr Pathol*.
- Meyers, J. ., Burreson, E. ., Barber, B. . & Mann, R. (1981).** Susceptibility of diploid and triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*.
- Miethke, M. & Marahiel, M. A. (2007).** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **71**, 413–451.
- Milton, D. L., O’Toole, R., Horstedt, P. & Wolf-Watz, H. (1996).** Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **178**, 1310–1319.
- Milton, D. L., Norqvist, A. & Wolf-Watz, H. (1992).** Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol* **174**, 7235–7244.
- Miossec, L. (2002).** Les vibrions pathogènes pour l’homme : le risque associé au milieu marin en France - Vibrions et risque sanitaire.

- Miyoshi, N., Shimizu, C., Miyoshi, S.-I. & Shinoda, S. (1987). Purification and Characterization of *Vibrio vulnificus* Protease. *Microbiol Immunol* **31**, 13–25.
- Miyoshi, S. & Shinoda, S. (1992). Activation mechanism of human Hageman factor-plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* metalloprotease. *FEBS Lett* **308**, 315–319.
- Miyoshi, S., Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91–98.
- Miyoshi, S., Sonoda, Y., Wakiyama, H., Rahman, M.M., Tomochika, K., Shinoda, S., Yamamoto, S., Tobe, K. (2002). An exocellular thermolysin-like metalloprotease produced by *Vibrio fluvialis*: purification, characterization, and gene cloning. *Microb. Pathog.* **33**, 127–134.
- Mizuta, S., Miyagi, T., Yoshinaka, R. (2005). Characterization of the quantitatively major collagen in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* **71**, 229–235.
- Mohedano, A. f., Fernández, J., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1997). Effect of pH, temperature and culture medium composition on the production of an extracellular cysteine proteinase by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J Appl Microbiol* **82**, 81–86.
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F. & Escoubas, J. M. (2001). Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett* **500**, 64–70.
- Moore, C.A., Beckmann, N., Patricia Morse, M. (1992). Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* **60**, 141–147.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Chollet, B., Arzul, I., 2011. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during *in vitro* infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *Int. J. Parasitol.* **41**, 755–764.

-N-

- Nagamune, K., Yamamoto, K., Naka, A., Matsuyama, J., Miwatani, T. & Honda, T. (1996). *In vitro* proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytotoxin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V. cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect Immun* **64**, 4655–4658.
- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y. & Sack, D. A. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* **20**, 39–48.

- Nandi, B., Nandy, R. K., Sarkar, A. & Ghose, A. C. (2005).** Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **151**, 2975–2986.
- Natrah, F. M. I., Ruwandeepika, H. A. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P. & Defoirdt, T. (2011).** Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Vet Microbiol* **154**, 124–129.
- Neilands, J. B. (1995).** Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J Biol Chem* **270**, 26723–26726.
- Nelson, E. J., Chowdhury, A., Flynn, J., Schild, S., Bourassa, L., Shao, Y., LaRocque, R. C., Calderwood, S. B., Qadri, F. & Camilli, A. (2008).** Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment. *PLoS Pathog* **4**, e1000187.
- Nicolas, J. L., Basuyaux, O., Mazurié, J. & Thébault, A. (2002a).** *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis Aquat Organ* **50**, 35–43.
- Nicolas, J.-L., Garnier, M., Gay, M. & Le Roux, F. (2002b).** *Vibrio* associated with juvenile oyster during summer mortality in France. *J Shellfish Res* **21**.
- Nicolas, J., Corre, S., Gauthier, G., Robert, R. & Ansquer, D. (1996).** Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis Aquat Organ* **27**, 67–76.
- Niemann, H. H., Schubert, W.-D. & Heinz, D. W. (2004).** Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect* **6**, 101–112.
- Nishibuchi, M. & Kaper, J. B. (1995).** Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun* **63**, 2093–2099.
- Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y. & Hashimoto, K. (1987).** *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar Biol* **94**, 625–630.
- Norqvist, A., Norrman, B. & Wolf-Watz, H. (1990).** Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* **58**, 3731–3736.
- Nottage, A. S., Sinclair, P. D. & Birkbeck, T. H. (1989).** Role of Low-Molecular-Weight Ciliostatic Toxins in Vibriosis of Bivalve Mollusks. *J Aquat Anim Health* **1**, 180–186.

-O-

- Ochoa-Campuzano, C., Real, M. D., Martínez-Ramírez, A. C., Bravo, A. & Rausell, C. (2007).** An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 437–442.
- Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K. & Honda, T. (2005).** Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes. *J Bacteriol* **187**, 752–757.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Abbott, S. L., Janda, J. M. & Nishibuchi, M. (1997).** Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J Clin Microbiol* **35**, 1965–1971.
- Okujo, N. & Yamamoto, S. (1994).** Identification of the siderophores from *Vibrio hollisae* and *Vibrio mimicus* as aerobactin. *FEMS Microbiol Lett* **118**, 187–192.
- Okujo, N., Saito, M., Yamamoto, S., Yoshida, T., Miyoshi, S. & Shinoda, S. (1994).** Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **7**, 109–116.
- Olafsen, J. A., Fletcher, T. C. & Grant, P. T. (1992).** Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev Comp Immunol* **16**, 123–138.
- Olafsen, J. A. (1995).** Role of Lectins (C-Reactive Protein) in Defense of Marine Bivalves Against Bacteria. In *Adv Mucosal Immunol*, Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 343–348. Edited by J. Mestecky, M. W. Russell, S. Jackson, S. M. Michalek, H. Tlaskalová-Hogenová & J. Šterzl. Springer US.
- Oliver, J. D., Wear, J. E., Thomas, M. B., Warner, M. & Linder, K. (1986).** Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **5**, 99–111.
- Olivier, V., Haines, G. K., Tan, Y. & Satchell, K. J. F. (2007).** Hemolysin and the Multifunctional Autoprocessing RTX Toxin Are Virulence Factors during Intestinal Infection of Mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 Strains. *Infect Immun* **75**, 5035–5042.
- Opal, S. M., Cross, A. S., Gemski, P. & Lyhte, L. W. (1990).** Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. *J Infect Dis* **161**, 794–796.

- Orlenko, A. N. (1994).** The acclimatization of giant oyster *Crassostrea gigas* (*Bivalvia*, *Mytiliformes*, *Crassostreidae*) and the principal stages of its introduction in the Black Sea. *Zool Ž* **73**, 51–54.
- Paillard, C. & Maes, P. (1995).** The Brown Ring Disease in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*: I. Ultrastructural Alterations of the Periostracal Lamina. *J Invertebr Pathol* 91–100.
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M. & Le Picard, D. (1989).** Origine pathogène de «l'anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *Comptes Rendus Académie Sci Sér 3 Sci Vie* **309**, 235–241.
- Paillard, C., Le Roux, F. & Borrego, J. J. (2004a).** Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat Living Resour* **17**, 477–498.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R. (2004b).** Effect of temperature on defense parameters in manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* **59**, 249–262.
- Panicker, G., Call, D. R., Krug, M. J. & Bej, A. K. (2004).** Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7436–7444.
- Paranjpye, R. N., Myers, M. S., Yount, E. C. & Thompson, J. L. (2013).** Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence. *Microbiol Read Engl* **159**, 2605–2615.
- Park, J. Y., Park, J. E., Park, J. W., Yoon, S. M. & Lee, J. S. (2012).** Purification and characterization of a novel alkaline serine protease secreted by *Vibrio metschnikovii*. *Int J Mol Med* **29**, 263–268.
- Park, K.-S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.-H., Okada, K., Iida, T. & Honda, T. (2004).** Functional Characterization of Two Type III Secretion Systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* **72**, 6659–6665.
- Park, S., Lee, J. & Lee, W. (2000).** Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *J Microbiol* **38**, 224–229.
- Parker, M. W. & Feil, S. C. (2005).** Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**, 91–142.
- Pass, D. A., Dybdahl, R. & Mannion, M. M. (1987).** Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. *Aquaculture* **65**, 149–169.

- Paydar, M., Teh, C. S. J. & Thong, K. L. (2013).** Prevalence and characterisation of potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in Malaysia using conventional methods, PCR and REP-PCR. *Food Control* **32**, 13–18.
- Pedersen, K., Dalsgaard, I. & Larsen, J. L. (1997).** *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3711–3715.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pfrimmer, D. M. (2010).** Cholera in Haiti. *J Contin Educ Nurs* **41**, 536–537.
- Pham, C. T. N. (2006).** Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* **6**, 541–550.
- Polgár, L. (2005).** The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci CMLS* **62**, 2161–2172.
- Potvin, E., Sanschagrin, F. & Levesque, R. C. (2008).** Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 38–55.
- Prado, S., Romalde, J. L., Montes, J. & Barja, J. L. (2005).** Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Dis Aquat Organ* **67**, 209–215.
- Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A. (2012).** Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* **32**, 69–78.
- Proctor, R.A., Textor, J.A., Vanin, J.M., Mosher, D.F. (1985).** Role of Fibronectin in Human Monocyte and Macrophage Bactericidal Activity. *Infect. Immun.* **47**, 629–637.

-R-

- Rajamani, S. & Sayre, R. T. (2011).** A sensitive fluorescence reporter for monitoring quorum sensing regulated protease production in *Vibrio harveyi*. *J Microbiol Methods* **84**, 189–193.
- Ransom, D. P., Lannan, C. N., Rohovec, J. S. & Fryer, J. L. (1984).** Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon*. *J Fish Dis* **7**, 107–115.

- Reidl, J. & Klose, K. E. (2002).** *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 125–139.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N. & Maffart, P. (1994).** Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Rev Médicale Vét* **145**, 735–742.
- Richardson, K. (1991).** Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun* **59**, 2727–2736.
- Riquelme, C., Hayashida, G., H., Toranzo, A. E., Vilches, J., Chavez P. (1995).** Pathogenicity studies on a *Vibrio anguillarum*-related (VAR) strain causing an epizootic in *Argopecten purpuratus* larvae cultured in Chile. *Dis Aquat Org* **22**, 135–141
- Riquelme, C., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Vergara, N. & Araya, R. (1996).** Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with Larval Mortalities of Scallop (*Argopecten purpuratus*). *J Invertebr Pathol* **67**, 213–218.
- Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.-M. & Quilici, M.-L. (2004).** Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int J Food Microbiol* **91**, 319–325.
- Roch, P. (1999).** Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* **172**, 125–145.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J. H. & Aoki, T. (2005).** Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microb Pathog* **39**, 109–119.
- Romalde, J. L. & Barja, J. L. (2010).** Bacteria in molluscs: good and bad guys. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol* **1**, 136–147.
- Romalde, J. L., Dieguez, A. L., Lasa, A. & Balboa, S. (2014).** New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Front Microbiol* **4**, 413.
- Rossignol, G. (2007).** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens*: activité hémolytique et variation phénotypique. Thesis Université de Rouen.
- Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J. & other authors. (2005).** Complete genome sequence of

Vibrio fischeri: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3004–3009.

Rugel, A.R. & Klose, K.E. (2012). *Vibrio cholerae* Flagellar Synthesis and Virulence. In *Cholera*. Edited by S. Gowder. InTech.

Rzychon, M., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J. (2004). Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* **51**, 861–873.

-S-

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.

Sakata, T., Matsuura, M. & Shimokawa, Y. (1989). Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Bull Jpn Soc Sci Fish Jpn*.

Samain, J. F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H. & other authors. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* **268**, 227–243.

Sanchez, J. & Holmgren, J. (2011). Cholera toxin - A foe & a friend. *Indian J Med Res* **133**, 153–163.

Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**, 219.

Saulnier, D., De Decker, S. & Haffner, P. (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods* **77**, 191–197.

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

Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **53**, 841–853.

Schaechter, M., Medoff, G. & Eisenstein, B. I. (1999). Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Supérieur.

- Schiewe, M. H., Trust, T. J. & Crosa, J. H. (1981).** *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Curr Microbiol* **6**, 343–348.
- Schmitt, P., Lorgeril, J. de, Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D. & Bachère, E. (2012).** Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **37**, 363–370.
- Schoolnik, G. K. & Yildiz, F. H. (2000).** The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biol* **1**, REVIEWS1016.
- Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N. & Renault, T. (2010).** Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* **153**, 92–99.
- Shao, C.-P. & Hor, L.-I. (2001).** Regulation of Metalloprotease Gene Expression in *Vibrio vulnificus* by a *Vibrio harveyi* LuxR Homologue. *J Bacteriol* **183**, 1369–1375.
- Shapiro-Ilan, D. I., Fuxa, J. R., Lacey, L. A., Onstad, D. W. & Kaya, H. K. (2005).** Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol* **88**, 1–7.
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.-S., Kodama, T. & Honda, T. (2006).** Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **264**, 89–97.
- Shinoda, S. & Okamoto, K. (1977).** Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. *J Bacteriol* **129**, 1266–1271.
- Shinoda, S. (2005).** Pathogenic Factors of *Vibrios* with Special Emphasis on *Vibrio vulnificus*. *Yakugaku Zasshi* **125**, 531–547.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I. (2011).** Proteases Produced by *Vibrios*. *Biocontrol Sci.* **16**, 1–11.
- Shinoda, S., Miyoshi, S.-I., Wakae, H., Rahman, M., Tomochika, K.-I. (1996).** Bacterial Proteases as Pathogenic Factors, with Special Emphasis on *Vibrio* Proteases. *Toxin Rev.* **15**, 327–339.
- Sigel, S. P., Stoebner, J. A. & Payne, S. M. (1985).** Iron-vibriobactin transport system is not required for virulence of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **47**, 360–362.
- Simpson, L. M. & Oliver, J. D. (1983).** Siderophore production by *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun* **41**, 644–649.
- Smith, H. (1977).** Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol Rev* **41**, 475–500.

- Soffientino, B., Gwaltney, T., Nelson, D. R., Specker, J. L., Mauel, M. & Gómez-Chiarri, M. (1999).** Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis Aquat Organ* **38**, 201–210.
- Soletchnik, P., Lemoine, O., Faury, N., Razet, D., Geairon, P. & Gouletquer, P. (1999).** Mortalité de l’huître dans le bassin de Marennes-Oléron: étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d’informations géographiques (SIG). *Aquat Living Resour* **12**, 131–143.
- Sonnen, A. F.-P. & Henneke, P. (2013).** Role of Pore-Forming Toxins in Neonatal Sepsis. *J Immunol Res* **2013**. 608456.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B. & Lozano, R. (2010).** ‘Bright-red’ syndrome in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is caused by *Vibrio harveyi*. *Dis Aquat Organ* **92**, 11–19.
- Soto-Rodriguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano, R., del Rio-Rodríguez, R., Diéguez, A. L. & Romalde, J. L. (2012).** Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the ‘Bright-red’ Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol* **109**, 307–317.
- Sousa, F., Jus, S., Erbel, A., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A. & Gubitz, G. M. (2007).** A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1772–1781.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994).** Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846–849.
- Stoebner, J. A. & Payne, S. M. (1988).** Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **56**, 2891–2895.
- Stork, M., Lorenzo, M. D., Mouriño, S., Osorio, C. R., Lemos, M. L. & Crosa, J. H. (2004).** Two tonB Systems Function in Iron Transport in *Vibrio anguillarum*, but Only One Is Essential for Virulence. *Infect Immun* **72**, 7326–7329.
- Sudha, S., Divya, P. S., Francis, B. & Hatha, A. A. M. (2012).** Prevalence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in finfish from Cochin (south India). *Vet Ital* **48**, 269–281.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D. & Muroga, K. (1998).** *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ* **33**, 111–118.

Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Clare, B. W. (2002). Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev* **22**, 329–372.

Syngkon, A., Elluri, S., Koley, H., Rompikuntal, P. K., Saha, D. R., Chakrabarti, M. K., Bhadra, R. K., Wai, S. N. & Pal, A. (2010). Studies on a novel serine protease of a Δ hapA Δ pvtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PloS One* **5**.

-T-

T. Honda, T. I. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Rev Med Microbiol* **4**.

Takahashi, K. G., Nakamura, A. & Mori, K. (2000). Inhibitory Effects of Ovoglobulins on Bacillary Necrosis in Larvae of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* **75**, 212–217.

Takeuchi, H., Shibano, Y., Morihara, K., Fukushima, J., Inami, S., Keil, B., Gilles, A. M., Kawamoto, S. & Okuda, K. (1992). Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochem J* **281** (Pt 3), 703–708.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* mst197.

Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M. & Siah, A. (2013). Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **39**, 419–429.

Tantillo, G. m., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. & Musti, M. (2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Lett Appl Microbiol* **39**, 117–126.

Tappero, J. & Tauxe, R. (2011). Lessons Learned during Public Health Response to Cholera Epidemic in Haiti and the Dominican Republic. *Emerg Infect Dis* **17**.

Taris, N., Lang, R. P., Reno, P. W. & Camara, M. D. (2009). Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display. *Anim Genet* **40**, 663–677.

Temperton, B., Thomas, S., Tait, K., Parry, H., Emery, M., Allen, M., Quinn, J., MacGrath, J. & Gilbert, J. (2011). Permanent draft genome sequence of *Vibrio tubiashii* strain NCIMB 1337 (ATCC19106). *Stand Genomic Sci* **4**, 183–190.

Teo, J. W. P., Zhang, L.-H. & Poh, C. L. (2003a). Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **312**, 181–188.

- Teo, J.W., Zhang, L.-H., Poh, C.L. (2003b).** Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **303**, 147–156.
- Thelin, K. H. & Taylor, R. K. (1996).** Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect Immun* **64**, 2853–2856.
- Thomas, S. R. & Elkinton, J. S. (2004).** Pathogenicity and virulence. *J Invertebr Pathol* **85**, 146–151.
- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P. & Swings, J. (2004a).** Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 919–924.
- Thompson, C. C., Vicente, A. C. P., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T. R., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D. W., Iida, T. & Thompson, F. L. (2009).** Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evol Biol* **9**, 258.
- Thompson, F. L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G. S., Pereira, A., De Bem, M. M. & other authors. (2003a).** *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 245–252.
- Thompson, F. L., Thompson, C. C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M. & Swings, J. (2003b).** *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1495–1501.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C. B. & Swings, J. (2005).** Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5107–5115.
- Thompson, F. L., Iida, T. & Swings, J. (2004b).** Biodiversity of Vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 403–431.
- Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T. R. & Sawabe, T. (2007).** Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *Vibrio campbellii* Are Distinct Species. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4279–4285.
- Thomson, J. (1952).** The Acclimatization and Growth of the Pacific Oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Mar Freshw Res* **3**, 64–73.
- Thomson, J. (1959).** The Naturalization of the Pacific Oyster in Australia. *Mar Freshw Res* **10**, 144–149.

- Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J. C., Andrew, P. W. & Saibil, H. R. (2005).** Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell* **121**, 247–256.
- Tiscar, P. G. & Mosca, F. (2004).** Defense Mechanisms in Farmed Marine Molluscs. *Vet Res Commun* **28**, 57–62.
- Tison, D. L., Nishibuchi, M., Greenwood, J. D. & Seidler, R. J. (1982).** *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. *Appl Environ Microbiol* **44**, 640–646.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. & Paillard, C. (2008).** Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol* **25**, 800–808.
- Travers, M.-A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A.-L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T. & other authors. (In press).** First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *J Invertebr Pathol*.
- Travis, J., Potempa, J. & Maeda, H. (1995).** Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* **3**, 405–407.
- Trigiani-Fernandez, E. R. (2001).** The capsular polysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal: Induction and modulation of host-cell mediated immune responses. dissertation, .
- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y. K. & Kaper, J. B. (1998).** The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14464–14469.
- Tubiash, H. S., Chanley, P. E. & Leifson, E. (1965).** Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks I. Etiology and Epizootiology. *J Bacteriol* **90**, 1036–1044.
- Tubiash, H. S., Colwell, R. R. & Sakazaki, R. (1970).** Marine Vibrios Associated with Bacillary Necrosis, a Disease of Larval and Juvenile Bivalve Mollusks. *J Bacteriol* **103**, 271–272.
- Tun, K. L., Itoh, N., Shimizu, Y., Yamanoi, H., Yoshinaga, T. & Ogawa, K. (2008).** Pathogenicity of the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Int J Parasitol* **38**, 211–217.

-U-

Urdaci, M. ., Marchand, M. & Grimont, P. A. . (1988). Espèces du genre *Vibrio* associées aux produits marins du bassin d'arcachon. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **139**, 351–362.

-V-

Vaitkevicius, K., Rompikuntal, P. K., Lindmark, B., Vaitkevicius, R., Song, T. & Wai, S. N. (2008). The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae* Purification and properties. *Febs J* **275**, 3167–3177.

Valiente, E., Padrós, F., Lamas, J., Llorens, A. & Amaro, C. (2008). Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. *Microb Pathog* **45**, 386–393.

Vandenbergh, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. & Swings, J. (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* **219**, 9–20.

Voss, E., Manning, P. A. & Attridge, S. R. (1996). The toxin-coregulated pilus is a colonization factor and protective antigen of *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb Pathog* **20**, 141–153.

Voss, E. & Attridge, S. R. (1993). In vitro production of toxin-coregulated pili by *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb Pathog* **15**, 255–268.

-W-

Wang, J., Sasaki, T., Maehara, Y., Nakao, H., Tsuchiya, T. & Miyoshi, S. (2008). Variation of extracellular proteases produced by *Vibrio vulnificus* clinical isolates: Genetic diversity of the metalloprotease gene (vvp), and serine protease secretion by vvp-negative strains. *Microb Pathog* **44**, 494–500.

- Wang, S.-Y., Moyne, A.-L., Thottappilly, G., Wu, S.-J., Locy, R. D. & Singh, N. K. (2001).** Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microb Technol* **28**, 492–498.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. a. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors. (1987).** Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463–464.
- Weil, E., Smith, G. & Gil-Agudelo, D. L. (2006).** Status and progress in coral reef disease research. *Dis Aquat Organ* **69**, 1–7.
- West, P. A., Lee, J. V. & Bryant, T. N. (1983).** A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *J Appl Bacteriol* **55**, 263–282.
- Wilson, K. (2001).** Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In *Curr Protoc Mol Biol*. John Wiley & Sons, Inc.
- Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M. D., Hancock, R. E. W. & Brinkman, F. S. L. (2009).** *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**, D483–488.
- Wondrak, E. M., Louis, J. M. & Oroszlan, S. (1991).** The effect of salt on the Michaelis Menten constant of the HIV-1 protease correlates with the Hofmeister series. *FEBS Lett* **280**, 344–346.
- Wong, S. K., Zhang, X.-H. & Woo, N. Y. S. (2012).** *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture* **330–333**, 29–36.
- Wu, J.-W. & Chen, X.-L. (2011).** Extracellular metalloproteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**, 253–262.
- Wu, Z., Milton, D., Nybom, P., Sjö, A. & Magnusson, K.-E. (1996).** *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) causes morphological changes in cultured epithelial cells and perturbs their paracellular barrier function. *Microb Pathog* **21**, 111–123.
- X-
- Xie, B.-B., Bian, F., Chen, X.-L., He, H.-L., Guo, J., Gao, X., Zeng, Y.-X., Chen, B., Zhou, B.-C. & Zhang, Y.-Z. (2009).** Cold adaptation of zinc metalloproteases in the

thermolysin family from deep sea and arctic sea ice bacteria revealed by catalytic and structural properties and molecular dynamics: new insights into relationship between conformational flexibility and hydrogen bonding. *J Biol Chem* **284**, 9257–9269.

Xu, S.-L., Qiu, C.-G., Zhou, W., Wang, D.-L., Jia, C.-Y. & Wang, C.-L. (2013). Pathological analysis of hemolymphs of *Charybdis japonica* infected with *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* **35**, 1577–1584.

-Y-

Yamamoto, S., Okujo, N., Fujita, Y., Saito, M., Yoshida, T. & Shinoda, S. (1993). Structures of two polyamine-containing catecholate siderophores from *Vibrio fluvialis*. *J Biochem (Tokyo)* **113**, 538–544.

Yeterian, E. (2010). Bases moléculaires de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.

Yii, K. C., Yang, T. I. & Lee, K. K. (1997). Isolation and characterization of *Vibrio carchariae*, a causative agent of gastroenteritis in the groupers, *Epinephelus coioides*. *Curr Microbiol* **35**, 109–115.

Yoh, M., Honda, T. & Miwatani, T. (1986). Purification and partial characterization of a *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Can J Microbiol* **32**, 632–636.

Yorimitsu, T. & Homma, M. (2001). Na⁺-driven flagellar motor of *Vibrio*. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* **1505**, 82–93.

Yu, M. S. & Lee, C. Y. (1999). Expression and characterization of the prtV gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*. *Microbiol Read Engl* **145 (Pt 1)**, 143–150.

-Z-

Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R. & Song, L. (2014). The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **45**, 141–150.

- Zhang, X.-H. & Austin, B. (2005).** Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* **98**, 1011–1019.
- Zhang, X.-J., Qin, G.-M., Bing, X.-W., Yan, B.-L. & Liang, L.-G. (2011).** Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus*, a pathogen of the cultured tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* Günther. *J Fish Dis* **34**, 57–64.
- Zhong, Y., Zhang, X.-H., Chen, J., Chi, Z., Sun, B., Li, Y. & Austin, B. (2006).** Overexpression, Purification, Characterization, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* Hemolysin VHH. *Infect Immun* **74**, 6001–6005.
- Zhu, J. & Mekalanos, J. J. (2003).** Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell* **5**, 647–656.

***Vibrio tubiashii* en France: description d'isolats pathogènes affectant des mollusques et étude de leurs mécanismes de virulence**

Résumé

L'ostréiculture constitue l'une des principales composantes de l'aquaculture. Cependant, ce secteur est confronté à des épisodes de mortalités anormales survenant aussi bien en écloséries que dans le milieu naturel, affectant les huîtres diploïdes et triploïdes et à différents stades de leur vie. Pendant les épisodes de mortalité des mollusques bivalves en France, des bactéries, initialement classées dans le groupe de *V. harveyi*, ont été régulièrement isolées à côté des virus de type herpes, *V. splendidus* ou de *V. aestuarianus*.

Afin d'affiner l'affiliation taxonomique de ces isolats, une caractérisation génotypique et phénotypique a été réalisée. Les isolats bactériens, initialement classés dans le groupe de *V. harveyi*, se sont révélés génétiquement plus proches de souches du groupe *V. tubiashii*, reconnues comme agents pathogènes affectant larves et juvéniles de mollusques aux Etats-Unis et en Angleterre. Des outils de diagnostic ont été élaborés pour évaluer la propagation de cette espèce lors des périodes de mortalité depuis 2007, supportant cette première description de *V. tubiashii* en France. La virulence des isolats et la toxicité de leurs produits extracellulaires (ECPs) ont été confirmés par infections expérimentales sur des larves et des juvéniles de *C. gigas*. Les essais *in vitro* ont révélé la capacité des ECPs de *V. tubiashii* à perturber des fonctions immunitaires hémocytaires probablement via la dégradation de certaines protéines structurales. Finalement, des analyses protéomiques et transcriptomiques ont révélé la conjonction de multiples facteurs de virulence, y compris les métalloprotéases dans la virulence des souches françaises de *V. tubiashii*.

Mots clés: *Crassostrea gigas*, Isolats français, *Vibrio tubiashii*, Hémocytes, Pathogénicité, Infection expérimentale, Produits extracellulaires, Facteurs de virulence, Métalloprotéases

***Vibrio tubiashii* in France: description of pathogenic isolates affecting molluscs and study of their virulence mechanisms**

Abstract

The oyster farming constitutes one of the major components of the global aquaculture. However, this sector is facing abnormal mortalities outbreaks that affect diploid and triploid oyster at their different life stages, in the hatcheries and in the field. During bivalve molluscs mortality events in France, bacteria initially classified into *Harveyi* group, were regularly isolated along with herpes virus, *V. splendidus* or *V. aestuarianus*.

In order to fine tune the taxonomic affiliation of those isolates, a genotypic and phenotypic approach was used. The bacterial isolates, initially misclassified into the *Harveyi* clade, were shown to be genetically closed to *V. tubiashii* strains already recognized as the main causative agents of larvae and juvenile mollusc mortalities in America and in England. A diagnostic tool was developed to evaluate its spread in mortality events since 2007, supporting this first description of *V. tubiashii* in France. Moreover, the virulence of isolates and the toxicity of their extracellular products (ECPs) were confirmed on *C. gigas* larvae and juveniles by experimental infections. Using *in vitro* assays, French *V. tubiashii* ECPs revealed their ability to alter some hemocytes immune defense probably through the degradation of matrix structural proteins. Finally, proteomic and transcriptomic analyses revealed the conjunction of multiples virulence factors including metalloproteases in the virulence of the French *V. tubiashii* strains.

Keywords: *Crassostrea gigas*, French isolates, *Vibrio tubiashii*, Hemocytes, Pathogenicity, Experimental infection, Extracellular products

