



**HAL**  
open science

## Etude comparative des interactions Vibrio - phagocytes dans l'environnement marin

Aurore Poirier

► **To cite this version:**

Aurore Poirier. Etude comparative des interactions Vibrio - phagocytes dans l'environnement marin. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTTS062 . tel-01260355v2

**HAL Id: tel-01260355**

**<https://hal.science/tel-01260355v2>**

Submitted on 26 Sep 2017

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

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

Et de l'unité de recherche  
UMR 5244, Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE)  
Montpellier

Spécialité : Microbiologie, Parasitologie

Présentée par Aurore POIRIER

Etude comparative des interactions  
Vibrio - phagocytes dans  
l'environnement marin

Soutenue le 15/ 12/ 2015 devant le jury composé de

Mme Marylène POIRIE, Professeur , Université de Nice Sophia Antipolis  
M. Yann HECHARD, Professeur, Université de Poitiers  
M. Georges LUTFALLA, Directeur de Recherche, CNRS

Mme Véronique LE-CABEC, Chargée de Recherche, CNRS  
M. Marc BOUVY, Directeur de Recherche, IRD  
M. Guillaume CHARRIERE, Maître de conférences, Université de Montpellier

Mme Delphine DESTOUMIEUX- GARZÓN, Chargée de Recherche, CNRS

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur,  
Président du  
jury  
Examineur  
Examineur  
Co- directeur  
de thèse  
Directrice de  
thèse, Invitée



# Remerciements

En premier lieu, un grand merci à Jean-Charles Mignon, mon amour, qui m'a soutenue et encouragée pendant ces trois ans malgré la distance, ce qui n'a pas toujours été simple. Je n'aurai pas pu aller aussi loin sans ta présence et ton soutien.

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

Je remercie Madame Marylène Poirié et Monsieur Yann Héchard qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Je tiens également à remercier Madame Véronique Le-Cabec et Messieurs Marc Bouvy, Georges Lutfalla et Guillaume Charrière pour avoir accepté d'être membres de ce jury.

Je remercie Messieurs Guillaume Mitta et Yannick Gueguen pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire « Interactions Hôtes – Pathogènes - Environnement » (UMR5244), ainsi que Messieurs Marc Trousselier et Marc Bouvy qui dirigeaient l'UMR « Ecologie des systèmes marins côtiers » dans laquelle j'ai débuté cette thèse.

Je remercie l'Université de Montpellier de m'avoir accordé un financement pour ce travail. Je remercie également le programme National Ecosphère Continentale et Côtière pour le financement attribué au projet Intervibrio dans lequel s'est largement inscrite cette thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadrants de thèse, Madame Delphine Destoumieux-Garzòn et Monsieur Guillaume Charrière pour leurs conseils, leur disponibilité et leur soutien au cours de ces trois années. Merci de m'avoir encouragée et soutenue tant sur le plan personnel que professionnel. Cette expérience avec vous aura été très enrichissante et me permet aujourd'hui d'envisager la suite avec sérénité. Delphine, ton humanité et ta capacité d'écoute font de toi une encadrante et une personne exceptionnelle. Guillaume, tu as toujours été de bon conseil et a réussi à faire ressortir le meilleur de moi-même, même dans les moments difficiles.

Je remercie Messieurs Ascel Régis Samba-Louaka, Vincent Delafont, Charles Van der Henst et Madame Melanie Bloesch pour leur collaboration. Je suis également reconnaissante à Vicky Diakou de la plateforme Montpellier RIO Imaging, ainsi qu'à Yohan Noël, Lucie Fontaine, Florence Bernex et Nelly Prot de la plateforme "Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier" (RHEM) et à Sylvie Kieffer-Jacquiod du CEA de Grenoble.

Je tiens à remercier Agnès Vergnes pour la relecture de ce manuscrit et à Tristan Rubio pour son aide précieuse pour la mise en page et l'impression de cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe MIMM pour leur accueil chaleureux et les moments agréables passés ensemble : Julien de Lorgeril, Marc Leroy, Jean-Luc Rolland, Evelyne Bachère, Caroline Montagnani, Guillaume Charrière, Thierry Noël, Yannick Gueguen, Rodolfo Rondon, Kelly Brenner, Guillaume Mitta et plus particulièrement à Tristan Rubio, Céline Abi-Khalil, Audrey Vanhove, Agnès Vergnes, Maxime Lafont, Aude Lucassonet Dalila Henni, qui plus que des collègues sont devenus des amis et qui m'ont beaucoup soutenue tant sur le plan professionnel que personnel. Je tiens aussi à remercier ceux qui ne sont plus au laboratoire Carmen Lopez Joven, Julie Nicod, Danielle FerrazMello et Pascal Alonso. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire IHPE et du laboratoire MARBEC, en particulier Audrey Caro qui a permis mes travaux sur le sédiment de l'étang de Thau et Cécile Roques avec qui j'ai beaucoup échangé pendant cette thèse.

Je remercie mon père Jean- Marie et ma sœur Elodie qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenue, quoi que je fasse. Je tiens également à remercier mes amis et plus particulièrement Yannick Eyraud, Thomas Fichon, Thomas Nicolas, Margaux Smon et Sophie Kypraios pour leur présence et leur soutien moral tout au long de ma thèse. J'ai également une pensée pour mes grands-parents et mes oncles qui m'ont toujours encouragée.

Je dédie cette thèse à mon petit frère Gaëtan et à ma mère Corinne, qui nous ont quitté pendant ces 3 ans et qui j'en suis sûre me regardent de là-haut avec fierté.

« Dans la vie, rien n'est à craindre tout est à comprendre »

Marie Curie

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	7
CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	11
I. LES PHAGOCYTES.....	12
I.1 LES AMIBES LIBRES, DES PHAGOCYTES ENVIRONNEMENTAUX.....	12
I.1.1. Organisation cellulaire des amibes libres.....	12
I.1.2 Cycle vital des amibes libres.....	13
I.1.3 Diversité des amibes libres.....	14
I.2 LES HEMOCYTES, CELLULES IMMUNITAIRES DE CRASSOSTREA GIGAS.....	17
I.2.1 L'hémolymphe et les hémocytes.....	17
I.2.2 Diversité des hémocytes de l'huître creuse Crassostrea gigas.....	18
I.3. LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES ET MACROPHAGES CHEZ L'HOMME.....	19
I.1.3.1 Les polynudéaires neutrophiles.....	19
I.1.3.2 Les macrophages.....	21
II. LA PHAGOCYTOSE.....	23
II.1 LA RECONNAISSANCE.....	25
II.1.1 Les récepteurs de reconnaissance directe des métazoaires.....	25
II.1.2 La reconnaissance indirecte chez les métazoaires: opsonines et récepteurs.....	28
II.1.3 La reconnaissance chez les amibes.....	30
II.1.4 La synapse phagocytaire.....	31
II.2 L'INTERNALISATION.....	32
II.2.1. Les voies de signalisation activées par les récepteurs.....	33
II.2.2 L'importance des petites protéines G.....	33
II.2.3 La polymérisation de l'actine.....	34
II.2.4 Le rôle des myosines.....	35
II.3 LA MATURATION DU PHAGOSOME.....	36
II.3.1 La maturation du phagosome chez les métazoaires.....	36
II.3.2 La maturation du phagosome chez les amibes.....	40
III. LES EFFECTEURS MICROBIQUES DES PHAGOCYTES.....	41
III.1 LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE.....	41
III.2 LES METAUX DANS LE PHAGOSOME.....	45
III.2.1 L'influx de métaux dans le phagosome.....	45

III.2.2. L'efflux de métaux du phagosome .....	49
III.3 LES ENZYMES HYDROLYTIQUES.....	50
III.3.1 Les lysozymes .....	50
III.3.2 Les protéases et les inhibiteurs de protéases .....	51
III.3.3 Les hydrolases amibiennes.....	51
III.4 LES PROTEINES ET PEPTIDES ANTIMICROBIENS .....	51
III.4.1 Les AMPs conventionnels des métazoaires.....	52
III.4.2 Les AMPs non conventionnels des métazoaires .....	53
III.4.3 Les peptides antimicrobiens chez les amibes.....	54
IV. LES PIÈGES D'ADN EXTRACELLULAIRES.....	57
IV.1 LA COMPOSITION DES NETS.....	58
IV.2 LA FORMATION DE NETS OU NETOSE.....	58
IV.2.1 Implication de la citrullination des histones .....	59
IV.2.2 Implication de la production des espèces réactives de l'oxygène.....	60
IV.2.3 Rôle de l'autophagie.....	60
IV.3 LE RÔLE ANTIMICROBIEN DES NETS.....	61
IV.4 LES NETS, UN DERNIER RECOURS.....	61
V. LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE AUX PHAGOCYTES.....	62
V.1 RÉSISTANCE AUX NETS DE VERTÈBRES.....	62
V.2 RÉSISTANCE À LA PHAGOCYTOSE DES MACROPHAGES.....	63
V.2.1 Echappement à l'internalisation .....	63
V.2.2 Résistance à la digestion intracellulaire.....	64
V.3 RÉSISTANCE DES VIBRIO PATHOGÈNES AUX HÉMOCYTES D'HUITRE.....	70
V.3.1 Internalisation du pathogène <i>V. tasmaniensis</i> LGP32.....	71
V.3.2 Survie et multiplication dans les cellules de l'hôte .....	72
V.4 RÉSISTANCE À LA PHAGOCYTOSE DES AMIBES.....	73
CHAPITRE II : RESULTATS.....	76
Section A. Les hémocytes de <i>C. gigas</i> peuvent former des pièges d'ADN extracellulaire, contenant des histones antimicrobiennes.....	77
Principaux résultats .....	79
Publication 1 : Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrates immunity: evidences in <i>Crassostrea gigas</i> .....	80
Section B. <i>V. tasmaniensis</i> LGP32 résiste à la phagocytose des protistes hétérotrophes présents dans l'environnement des huîtres. ....	93

Principaux résultats .....	95
Publication 2 : Phagocytosis resistance against marine grazers by the facultative intracellular pathogen <i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32 .....	96
CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	119
CONCLUSION GENERALE.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	137
ANNEXES.....	178
Annexe I : Publication 3 "Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics" .....	179
Annexe II : Publication 4 "The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view.....	208

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN / ARN	Acide désoxyribonucléique / ribonucléique
AMP	Antimicrobial peptides
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
CLRs	C-Type Lectin Receptors
CSF	Colony stimulating factor
ETs	Extracellular traps
FAO	Food and Agriculture organisation
GFP	Green fluorescent protein
LBP	LPSbinding protein
LPS	Lipopolysaccharides
KDa	Kilo Dalton
MAMP	Microbe-associated molecular pattern
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide
NETs	Neutrophil extracellular traps
NOS	Nitric oxide synthase
NRAMP	Naturally resistance associated macrophage protein
OMP	Outer membrane protein
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus type 1
PAD4	Peptidylarginine déiminase 4
PCR	Polymerase chain reaction
PMA	Phorbol myristate acétate
PRP	Pattern recognition protein
Prp	Proline rich peptide
PRR	Pattern recognition receptor
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitritogen species
SOD	Superoxyde dismutase
SRs	Scavenger Receptors



# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Organisation cellulaire générale d'une amibe libre.....	13
Figure 2. Classification phylogénétique des Amoebozoa.....	15
Figure 3. Système circulatoire semi-ouvert de l'huître.....	18
Figure 4. Les hémocytes de l'huître <i>C. gigas</i> .....	19
Figure 5. Polynucléaire neutrophile observé en microscopie électronique.....	20
Figure 6. Monocyte sanguin et macrophage activé.....	22
Figure 7. Les PRRs potentiels identifiés chez <i>A. castellanii</i> .....	31
Figure 8. Maturation du phagosome.....	40
Figure 9. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mammifères.....	43
Figure 10. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites chez les hémocytes de bivalve.....	44
Figure 11. Schéma représentatif de l'homéostasie des métaux dans l'activité microbicide du phagosome.....	47
Figure 12. Observation par microscopie électronique à balayage de <i>Shigella flexneri</i> piégée dans un NET.....	57
Figure 13. Analyse par microscopie à balayage haute résolution des NETs.....	58
Figure 14. Les étapes de la formation des pièges d'ADN extracellulaires.....	59
Figure 15. Les pathogènes intracellulaires.....	64
Figure 16. Modèle d'invasion des hémocytes de <i>C. gigas</i> par <i>V. tasmaniensis</i> LGP32.....	72
Figure 17. Localisation intracellulaire de <i>V. mimicus</i> CS-5 dans les amibes <i>A. castellanii</i> .....	75
Figure 18. Infiltration hémocytaire dans des branchies d'huîtres infectées avec <i>V. tasmaniensis</i> LGP32.....	78
Figure 19. Modèle d'invasion des hémocytes de <i>C. gigas</i> par <i>V. tasmaniensis</i> LGP32.....	94

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les récepteurs de phagocytoses au travers du règne vivant.....	32
Tableau 2. AMPs exprimés par les phagocytes.....	56

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

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

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

Depuis la dernière décennie, dans les écosystèmes marins côtiers, les élevages d'huîtres *C. gigas* subissent des épisodes de mortalités estivales affectant les huîtres juvéniles. Ces mortalités touchent de façon significative les productions françaises avec des pertes variables selon les années. Ces mortalités récurrentes ont pour conséquence d'importantes pertes économiques au sein de la filière ostréicole. Un programme de recherche national multidisciplinaire dénommé MOREST (MORTalités ESTivales) a donc été mis en place en 2005 pour identifier les causes de ces mortalités. Les conclusions de ce programme ont révélé que ces mortalités ont une étiologie multifactorielle impliquant les conditions environnementales, le statut physiologique et/ou génétique de l'huître et la présence de microorganismes pathogènes (Samain and McCombie 2008).

Depuis 2008, les phénomènes de mortalités estivales des juvéniles se sont intensifiés. En effet, à cause de ces mortalités, la production annuelle est passée, au cours des 10 dernières années, de 150 000 à 80 000 tonnes. Ces épisodes de mortalités apparaissent également plus tôt dans l'année, dès que la température de l'eau atteint 16°C. De plus, l'origine infectieuse de ces mortalités récurrentes est aujourd'hui avérée (IFREMER, 2009). Un virus de type Herpes nommé OsHV-1 (Segarra et al. 2010) ainsi que des souches de *Vibrio* du clade *Splendidus* (IFREMER, 2009) (Lacoste et al. 2001, Gay et al. 2004b, Gay, Berthe and Le Roux 2004a, Saulnier et al. 2010) ont été systématiquement retrouvés chez les huîtres moribondes depuis 2008. Un nouveau variant du virus OsHV-1 :  $\mu$ var,

apparu depuis 2008, pourrait contribuer à l'aggravation des mortalités (Segarra et al. 2010 , Schikorski et al. 2011 , Segarra et al. 2014). Les bactéries du genre *Vibrio*, considérées comme faisant partie de la microflore naturelle de l'huître, ont donc été associées à divers épisodes de mortalités des juvéniles (clade *Splendidus*) mais aussi à des mortalités d'huîtres adultes. En effet, des souches de *V. aestuarianus* ont pu être isolées (Labreuche et al. 2006b , Labreuche et al. 2006a , Garnier, Labreuche and Nicolas 2008 , Saulnier, De Decker and Haffner 2009 , Labreuche et al. 2010) lors de mortalités d'huîtres adultes. Le caractère infectieux de ces souches et leur virulence ont pu être démontrés expérimentalement (Waechter et al. 2002 , Garnier et al. 2007 , Saulnier et al. 2010). Malgré les travaux consacrés à ce phénomène, on ignore encore à l'heure actuelle le poids relatif des agents pathogènes, de la génétique des huîtres et des facteurs environnementaux dans l'expression de pathogénèse. Notamment, les bases cellulaires et moléculaires de ces maladies multifactorielles restent encore méconnues. On ignore aussi très largement les interactions environnementales qui favorisent la transmission des pathogènes et leur émergence.

Des travaux récents réalisés dans notre équipe ont montré que la souche pathogène d'huître *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (clade *Splendidus*), isolée par Le Roux et collaborateurs en 2004 (Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b), envahit les cellules immunitaires de l'huître (Duperthuy et al. 2011). L'internalisation de *V. tasmaniensis* LGP32 se fait par opsonisation de la bactérie par la Cg-EcSOD (superoxyde dismutase extracellulaire) puis par reconnaissance par de la bactérie opsonisée par des intégrines (Duperthuy et al. 2011). Les *V. tasmaniensis* LGP32 sont alors capables de survivre dans des vacuoles de phagocytose hémocytaires.

Les interactions phagocytes/*V. tasmaniensis* LGP32 sont au cœur de mon sujet de thèse. Nous les avons étudiées à diverses échelles (moléculaire, cellulaire et environnementale) dans des approches de biologie comparative. L'objectif de ma thèse était (1) de caractériser à l'échelle cellulaire les interactions de *V. tasmaniensis* LGP32 / hémocytes d'huîtres et (2) de déterminer si l'interaction de *V. tasmaniensis* LGP32 avec des phagocytes de l'environnement aurait pu favoriser la sélection de traits de survie intracellulaire et de virulence explicatifs de la cytotoxicité de LGP32 sur les hémocytes d'huître. Les travaux exposés dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe MIMM "Mécanismes d'Interaction et d'Adaptation en Milieu Marin" de l'UMR5244 IHPE "Interactions Hôtes – Pathogènes - Environnement " sous la tutelle de l'Université de Montpellier, de l'Université de Perpignan Via Domitia, du CNRS et de l'Ifremer.

Le premier chapitre de ma thèse présente une revue bibliographique sur (1) les cellules phagocytaires au travers du vivant des amibes, jusqu'aux hémocytes d'huître puis aux polynucléaires et macrophages humains ; (2) la phagocytose, ses mécanismes moléculaires et cellulaires ; (3) les

effecteurs microbicides des phagocytes, (4) les pièges d'ADN extracellulaires, et (5) la résistance bactérienne aux phagocytes.

Le deuxième chapitre concerne les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse :

La section A décrit la mise en évidence d'une réponse des phagocytes connue chez les vertébrés mais jusque-là inconnue chez les invertébrés : la formation de pièges extracellulaires d'ADN (ou ETs pour « extracellular traps ») par un phénomène de lyse des hémocytes, inducible par une infection ou une blessure, appelé ETose. Cette section décrit les mécanismes de formation d'ETs par les hémocytes d'huître et met en évidence la conservation de ces mécanismes dans les interactions bactéries/phagocytes chez les métazoaires.

La section B s'intéresse à la notion d'émergence de vibrios pathogènes adaptés à la vie intraphagocytaire, un phénomène corrélé à la virulence de LGP32 (Duperthuy et al. 2011) et nécessaire à la lyse des hémocytes (Vanhove et al. 2015b). Nous avons supposé que la pression environnementale exercée par le grazing des phagocytes environnementaux aurait pu favoriser la sélection chez les vibrios de traits adaptatifs comme la résistance à la dégradation intracellulaire de *V. tasmaniensis* LGP32. Pour étayer cette hypothèse, nous avons caractérisé la nature des interactions entre vibrios et protistes hétérotrophes : ciliés et amibes (survie intracellulaire, effets cytotoxiques), notamment en utilisant des amibes que nous avons isolées des zones conchylicoles de Thau, dont nous avons décrit la diversité.

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

CHAPITRE I :  
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

# CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

## I. LES PHAGOCYTES

Les cellules capables de phagocytose ou phagocytes sont nombreuses et diverses au sein des eucaryotes. En effet, de nombreux protistes hétérotrophes, tels que les amibes sont capables de phagocyter des micro-organismes, pour s'en nourrir. Chez les animaux métazoaires, les phagocytes sont principalement impliqués dans les défenses immunitaires mais aussi l'homéostasie de nombreux tissus au cours du développement et à l'âge adulte. Chez les invertébrés, les phagocytes font partie des hémocytes qui sont les cellules circulantes de l'hémolymphe. Nous nous intéresserons ici aux hémocytes de l'huître creuse *C. gigas*. Chez les vertébrés, les principaux phagocytes sont les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules dendritiques qui sont impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Nous nous intéresserons ici aux macrophages et neutrophiles humains.

### I.1 Les amibes libres, des phagocytes environnementaux

Les amibes libres sont nommées ainsi en opposition aux amibes parasitaires telles que les amibes du genre *Entamoeba* ou encore les amibes sociales du genre *Dictyostelium*, car elles ont un mode de vie unicellulaire totalement autonome dans l'environnement. Ce sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires, de taille variable et ubiquitaires. Elles sont majoritairement isolées de milieux aquatiques (eaux douces, eaux saumâtres et en milieu marin), mais peuvent aussi être retrouvées dans le sol (au niveau de la rhizosphère et en surface) ou encore dans l'air (Rivera et al. 1987 , Rodriguez-Zaragoza 1994). Ces protistes sont particulièrement présents aux interfaces entre différents biotopes (Lienard and Greub 2011).

#### I.1.1. Organisation cellulaire des amibes libres

La majorité des amibes libres partagent une organisation cellulaire générale commune, correspondant à celle d'une cellule eucaryote (Figure 1), malgré une morphologie très variable (Curea-Van Saanen 1981 , Page 1983). Leur cytoplasme est généralement composé de 2 parties : un ectoplasme périphérique hyalin, visqueux et un endoplasme central vacuolaire et granuleux.

L'endoplasme contient :

- ☐ des organites tels que l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, les ribosomes et de nombreuses mitochondries (les amibes libres étant des organismes aérobies)
- ☐ le noyau avec un nucléole volumineux pouvant être multilobé selon les espèces et parfois même avec plusieurs nucléoles comme chez *Amoeba proteus* (Page)



- ☐ un grand nombre de vacuoles comprenant des vacuoles digestives et une vacuole pulsatile. Cette dernière vacuole a une fonction de régulation osmotique (évacuation de l'excès d'eau absorbé par le cytoplasme) et est toujours présente chez les amibes d'eau douce mais pas toujours dans les espèces marines.
- ☐ des inclusions cytoplasmiques, généralement constituées de substances cristallisées

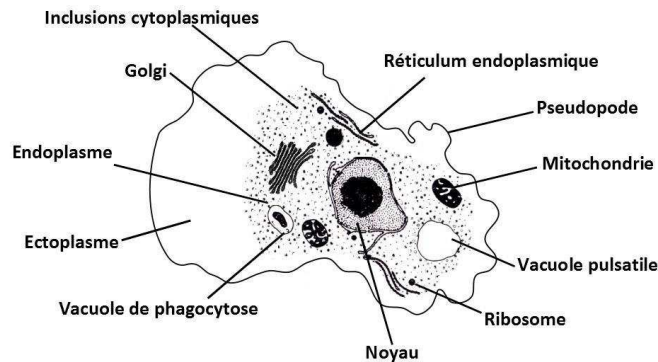


Figure 1. Organisation cellulaire générale d'une amibe libre

### I.1.2 Cycle vital des amibes libres

Le cycle vital de ces protozoaires comprend généralement deux formes distinctes : les trophozoïtes (forme végétative) et les kystes (Tomlinson and Jones 1962 , Page 1983 , Murti and Shukla 1984 , Smirnov and Michel 1999 , Fouque et al. 2012). Certaines amibes, notamment des genres *Naegleria* et *Willakeria*, présentent un stade intermédiaire entre la forme végétative et enkystée : la flagellation. Pour d'autres amibes libres, notamment des genres *Vannella* et *Thecamoeba*, il n'y a pas de forme kystique connue (Smirnov et al. 2007 , Houssay and Prenant 1970). Les trophozoïtes sont métaboliquement actifs, mobiles et se multiplient par ortho-mitose. Les trophozoïtes sont capables de se déplacer par des mouvements amiboïdes. Les mouvements amiboïdes sont généralement influencés par des phénomènes de chimiotactisme, les médiateurs chimiques permettant la reconnaissance de proies dont elles se nourrissent par phagocytose. Les amibes libres sont en effet des prédatrices de bactéries, de cyanobactéries, d'algues, de levures, de virus, de champignons filamenteux et même de nématodes, comme *Arachnula impatiens* présente dans le sol (Davet 1996 , Greub and Raoult 2004). En laboratoire, les amibes du genre *Acanthamoeba* spp. peuvent être cultivées dans des milieux liquides axéniques où elles ingèrent les nutriments par pinocytose (Bowers and Olszewski 1972).

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (température trop basse ou trop élevée, diminution de pH, stress osmotique, présence de pathogènes intracellulaires ou assèchement), certaines amibes libres peuvent s'enkyster. Lors de l'enkystement, les cellules

arrêtent progressivement de se déplacer, se déshydratent, s'arrondissent et s'entourent d'une enveloppe protectrice ou paroi kystique. Les kystes d'amibes libres peuvent être de forme et de taille très variables selon les genres. La paroi kystique peut être formée d'1 ou 2 couches et a une composition très différente en fonction des genres, les composants sont par exemple de la cellulose pour les kystes d'*Acanthamoeba* sp., de la chitine pour les kystes de *Naegleria* sp. et des polymères de glucose pour les kystes d'*Hartmannella* spp. (Fouque et al. 2012). Notamment grâce à cette paroi kystique, les kystes ont des capacités de résistance plus importantes que les trophozoïtes aux biocides, à la chloration, aux antibiotiques et aux hautes températures (jusqu'à 60°C) (Bouyer et al. 2007a , Marciano-Cabral and Cabral 2003). Les kystes peuvent alors permettre aux amibes de survivre longtemps en état de latence et de se disséminer dans l'air et/ou l'eau et ainsi de s'implanter dans de nouveaux biotopes. Des kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont restés viables après avoir passé 24 ans dans de l'eau à 4°C (Mazur, Hadas and Iwanicka 1995). Quand les conditions de vie redeviennent favorables, les kystes peuvent redonner naissance à des trophozoïtes.

### I.1.3 Diversité des amibes libres

La première phylogénie des amibes fut proposée en 1926 par Schaeffer : elle s'est basée sur la morphologie cellulaire en microscopie optique (Schaeffer). Depuis, d'autres classifications basées sur des critères morphologiques (Page 1974), sur le mode de division du noyau (Singh 1951 , Page 1976) ou sur le mode de locomotion en suivant des mouvements du cytoplasme (Jahn and Bovee) ont été proposées. Le perfectionnement et l'essor de la microscopie électronique dans les années 80 ont permis l'étude des caractéristiques ultra-structurales des amibes. De nouvelles taxonomies ont alors été développées en combinant caractéristiques ultra-structurales et physiologiques, notamment par Page (Page 1983 , Page 1987 , Page 1988 , Smirnov and Goodkov 1999).

#### I.1.3.1 Classification phylogénétique

L'avènement de la biologie moléculaire a ensuite permis de revisiter régulièrement la classification des amibes. En 1988, Clark et Cross ont confirmé l'origine polyploïdique des amibes libres en comparant la séquence du gène SSU 18S rRNA de *Naegleria gruberi* avec celles d'*Acanthamoeba castellanii* (Gunderson and Sogin 1986), de *Dictyostelium discoideum* (McCarroll et al. 1983) et d'autres eucaryotes (Clark and Cross 1988). Le nombre de séquences du gène SSU 18S rRNA identifiées pour différentes espèces d'amibes et d'analyses comparatives n'a cessé d'augmenter (Silberman et al. 1999 , Bolivar et al. 2001 , Cavalier-Smith 2003 , Smirnov et al. 2005 , Ptáčková et al. 2013). Des analyses comparatives ont également été basées sur l'actine et les gènes ribosomiaux (Fahrni et al. 2003), ainsi que sur des gènes codant des protéines nucléaires (Baldauf et al. 2000) et mitochondriales (Forget et al. 2002). Selon la classification publiée en 2005 par un consortium de 28

biologistes (Adl et al. 2005), les amibes libres appartiennent au règne des Amoebozoa et au sous-règne des Lobosea (également nommée Gymnamoebae). Les Lobosea sont divisées en 2 principales classes: les Tubulinea et Flabellinea. Les Tubulinea sont elles-mêmes divisées en Tubulinida, Leptomyxida, Testacealobosia et Echinamoeba. Les Flabellinea sont divisées en Dactylopodida, Vannellida (comprend le genre Vannella et Platyamoeba) et Thecamoebida. Les Amoebozoa comprennent également les Acanthamoebida (comprend le genre Acanthamoeba), Entamoebida, Eumycetozoa (comprend le genre Dictyostelium), Sereomyxida, et Mastigamoebida. Plus récemment, une nouvelle classification des Amoebozoa (Figure 2) a été proposée intégrant les caractéristiques morphologiques et locomotrices des amibes avec les données moléculaires obtenues à partir d'un seul génome (gène codant l'ARN ribosomique 18S) (Cavalier-Smith, Chao and Oates 2004, Cavalier-Smith 2013, Cavalier-Smith et al. 2015, Smirnov et al. 2005, Smirnov et al. 2011). Cette classification a été confirmée par des analyses phylogénétiques multigéniques menées par Cavalier-Smith et ses collaborateurs en 2015 (Cavalier-Smith et al. 2015). Ces analyses ont été réalisées à partir de l'alignement de 188 gènes pour 17 Amoebozoa. Selon cette classification, les Amoebozoa se divisent en 2 sous-règnes: les Lobosa et les Conosa. Le sous-règne des Lobosa se divise en 2 classes: Discosea comprenant elle-même 2 sous-classes et 9 ordres, et Tubulinea comprenant 5 sous-classes (Figure 2). Le sous-règne des Conosa se divise en 3 classes: les Variosea et les Mycetozoa comprenant toutes les deux 3 sous-classes ainsi que les Archamoeba comprenant 2 sous-classes (Figure 2).

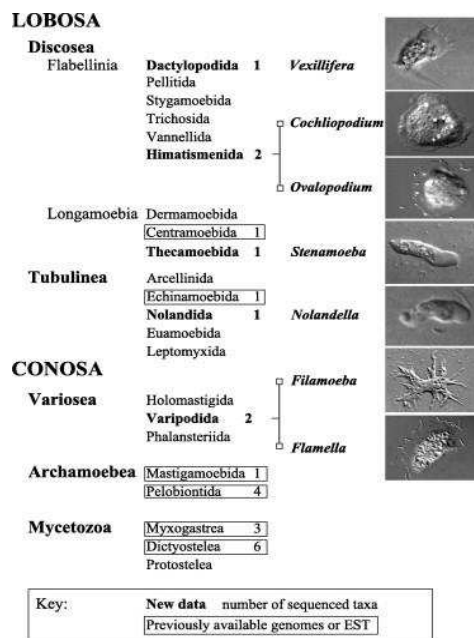


Figure 2. Classification phylogénétique des Amoebozoa, selon (Cavalier-Smith 2013) et (Smirnov et al. 2011); de droite à gauche: les sous-règnes (ex: Lobosa), les classes (ex: Discosea), sous-classes (ex: Flabellinia), les ordres (ex: Himatismenida) et enfin les genres (ex: Cochliopodium). Les genres sont uniquement décrits pour les amibes nouvellement séquencées pour l'étude (Cavalier-Smith et al. 2015). Des photographies en microscopie optique de ces amibes sont

également présentées sur la figure, origine de ces photographies : A. Kudryavtsev, A. Smirnov, and I. Dyková. D'après Cavalier-Smith et al., 2015

### I.1.3.1 Les amibes libres d'origine marine

L'ouvrage de référence sur les amibes marines a été réalisé par Page en 1983. Il a défini 22 genres d'amibes marines en se basant sur la taille, la structure nucléaire, l'apparence de la forme locomotive (trophozoïte), les inclusions cytoplasmiques, le cycle de vie, l'ultra-structure et les caractères physiologiques de chacun de ces protistes (Page 1983). Les genres identifiés étaient : Gruberella, Nolandella, Vahlkampfia, Heteramoeba, Paratetramitus, Hartmanella, Saccamoeba, Rhizamoeba, Thecamoeba, Platyamoeba, Vannella, Flabellula, Paraflabellula, Paramoeba, Mayorella, Dactylamoeba, Vexillifera, Pseudoparamoeba, Acanthamoeba, Protcanthamoeba, Corallomyxa et Stereomyxa. Depuis l'ouvrage de Page, les données moléculaires ont permis de confirmer la présence d'amibes des genres Vannella (Nassonova et al. 2010) et Platyamoeba (Moran et al. 2007) et d'identifier d'autres genres : Neoparamoeba, Vermistella (Moran et al. 2007) Squamamoeba (Kudryavtsev and Pawlowski 2013) et Qunea (Kudryavtsev and Pawlowski 2015) dans l'environnement marin (eau et/ou sédiment) dans différentes régions du globe (Atlantique, Antarctique, mer rouge, mer du Japon) et de les classer phylogénétiquement. Des amibes n'appartenant pas au règne des Amoebozoa comme les Vampyrellids et Heterolobosea ont également été identifiées dans l'environnement marin (Panek et al. 2012, Berney et al. 2013). Des amibes du genre Paramoeba ont été identifiées à partir de gonades des huîtres *Crassostrea gasar* et *C. rhizophorae* (Suhnel et al. 2014). L'ensemble de ces études ont permis d'identifier divers genres amibiens marins mais n'ont pas permis de décrire leur diversité totale, ni de leur abondance relative.

De 2009 à 2013, une importante collecte d'échantillons de plancton a été réalisée par un consortium international nommé Tara Océans grâce à une goélette de recherche, afin de mieux connaître le plancton océanique (Brum et al. 2015, Villar et al. 2015, Lima-Mendez et al. 2015, Sunagawa et al. 2015, de Vargas et al. 2015). Cette collecte a été faite au niveau de 210 sites, dans diverses régions océaniques tropicales et tempérées, à des profondeurs allant jusqu'à 2000 m. Pour chaque prélèvement, la diversité morphologique et génétique du zooplancton, ayant une taille allant de 0,02 µm à quelques millimètres (des virus aux protistes), a été étudiée en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement. La diversité des eucaryotes (de Vargas et al. 2015) a été étudiée dans un premier temps sur 334 fractions planctoniques prélevées dans la zone photique (jusqu'à 200m de profondeur). Une région hypervariable de la boucle V9 de l'ADN ribosomal 18S a été séquencée pour le plancton intermédiaire, comprenant le pico-nanoplancton (de 0.8 à 5 µm), le nanoplancton (de 5 à 20 µm), le microplancton (de 20 à 180 µm), et le méso-plancton (de 180 à 2000 µm). La synthèse de l'ensemble des études antérieures réalisées sur le plancton (150

ans de données morphologiques et moléculaires) ont permis de décrire environ 11 200 espèces d'eucaryotes: environ 4350 espèces phytoplanctoniques (microalgues), environ 1350 espèces protozooplanctoniques (protistes hétérotrophes), et environ 5500 espèces métazooplanctoniques (animaux holoplanctoniques). En revanche les données de l'expédition Tara Océans révèlent que la diversité des protozoaires serait 5 à 10 fois supérieure à celle anticipée jusque là, avec la prédiction que la diversité totale comprendrait environ 150 000 espèces. Parmi le protozooplancton, des amibes des classes Discosea et Tubulinea, d'autres amibes du sous-règne des Lobosa ainsi que des amibes des classes Variosea et Myxogastrea (sous règne des Conosa) ont été identifiées (de Vargas et al. 2015). Ces amibes ont principalement été retrouvées dans le pico-nanoplancton, le nanoplancton et le méso-plancton (de Vargas et al. 2015). Ainsi, si la diversité phylogénétique des amibes marines est de mieux en mieux connue grâce aux nouvelles techniques de séquençage haut-débit, leur biologie reste encore peu connue contrairement à celle des amibes d'eau douce.

## 1.2 Les hémocytes, cellules immunitaires de *Crassostrea gigas*

### 1.2.1 L'hémolymphe et les hémocytes

Les huîtres possèdent un système circulatoire semi-ouvert composé du cœur, d'artères et de veines. Le fluide contenu dans les vaisseaux est l'hémolymphe, qui circule du cœur vers les organes périphériques. L'hémolymphe est composée de plasma et de cellules circulantes, nommées hémocytes qui sont les cellules principales de l'immunité (Figure 3). Les fonctions principales de l'hémolymphe sont le transport d'oxygène sous forme dissoute, la distribution de nutriments, l'évacuation des déchets métaboliques et la défense contre les infections (Bachere et al. 2004). L'hémolymphe étant en contact direct avec les tissus de l'huître, les hémocytes peuvent s'infiltrer dans les tissus, en particulier dans les branchies et le manteau, par diapédèse (Galtsoff 1964, Cheng 1996, Schmitt P. 2011) (Figure 3). Les hémocytes jouent un rôle fondamental dans la réparation de lésions, la recalcification de la coquille, le transport et la digestion de nutriments et dans la réponse immunitaire (Sminia and van der Knaap 1987, Cheng 1996, Schmitt P. 2011). Ces cellules immunocompétentes ont une capacité de reconnaissance du non-soi et possèdent des capacités de chimiotactisme, de phagocytose et de sécrétion d'agents microbicides (Figure 3). Certaines populations d'hémocytes (voir paragraphe suivant) sont considérées comme des « phagocytes professionnels », pouvant migrer par chimiotactisme vers les tissus en cas de blessure ou d'infection.

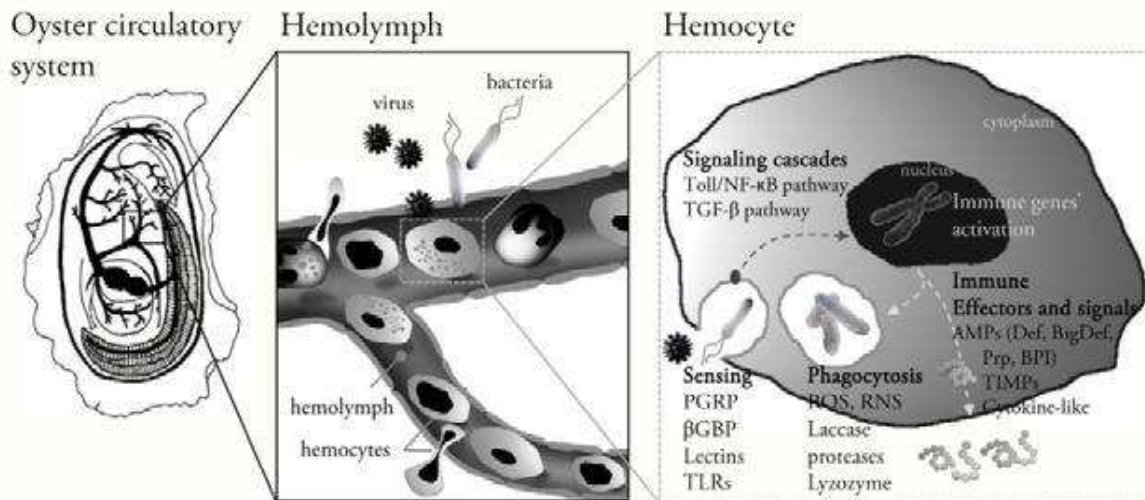


Figure 3. Système circulatoire semi-ouvert de l'huître où l'hémolymph circule du cœur vers les organes périphériques de l'huître. L'hémolymph est composée de plasma fluide et d'hémocytes qui sont les cellules principales de l'immunité des mollusques. Ces cellules sont capables de reconnaître l'invasion de pathogènes au travers de la reconnaissance du non-soi et d'activer une série de réactions de défense telles que la phagocytose, la production de ROS et de RNS, la sécrétion de protéases, de lysozymes, les activités de la phénol oxydase (D'après Schmitt et al., 2011).

### 1.2.2 Diversité des hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Depuis le début des années 70, de nombreuses études ont porté sur la classification des hémocytes de l'huître, en considérant des critères morphologiques, de structures internes, de signatures physico-chimiques et de fonctions biologiques (Cheng 1981, Bachere, Chagot and Grizel 1988, Ashton-Alcox and Ford 1998, Hine 1999, Aladaileh et al. 2007). En 1981, Cheng proposa de distinguer les hémocytes en deux catégories : les cellules agranuleuses et les granuleuses capables de phagocytose (Cheng 1981, Bachere et al. 2004). Cette classification fut complétée par Hine en 1999 qui proposa de diviser les cellules granuleuses en basophiles, avec des granules claires (Figure 4.D) et en éosinophiles, avec des granules denses aux électrons (Figure 4.E) (Hine 1999, Bachere et al. 2004). Les cellules agranuleuses ont été subdivisées en trois groupes : les « blast-like » (Figure 4.A), les « macrophage-like » (Figure 4.B) et les hyalinocytes (Figure 4.C), en fonction de leur rapport noyau/cytoplasme et de la présence ou l'absence de granules cytoplasmiques (Hine 1999, Bachere et al. 2004, Schmitt P. 2011). Notre équipe (Bachere et al. 2004, Schmitt P. 2011) a émis l'hypothèse que les cellules blast-like seraient des précurseurs des granulocytes et des hyalinocytes. De même, les granulocytes éosinophiles pourraient être le résultat de la maturation des granulocytes basophiles.

Chez l'huître, le processus d'hématopoïèse reste peu exploré mais des travaux récents (Jemaa et al. 2014) ont montré la présence d'une population de cellules précurseurs présentes à la base des branchies, grâce à des marqueurs cellulaires spécifiques de cellules précurseurs (Sox2). Il a été proposé que ces cellules se différencieraient ensuite en hémocytes dans les branchies.

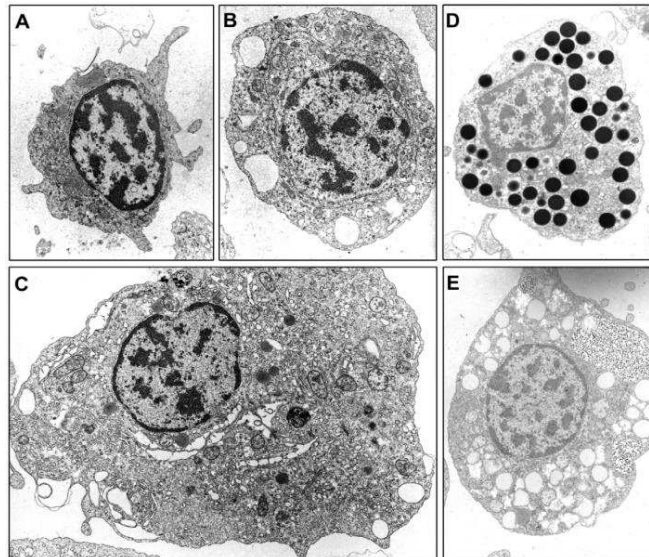


Figure 4. Les hémocytes de l'acarien *C. gigas*. Les hémocytes ont été classés en 2 populations : cellules agranuleuses (A, B et C) et granulocytes (D et E). Les cellules agranuleuses ont été divisées en 3 groupes : les cellules « blast-like » (A), les cellules "macrophages-like" (B) et les hyalinocytes (C). Les granulocytes ont été divisés en 2 groupes en fonction du contenu des granules, soit clairs aux électrons (D) soit denses aux électrons (E). Microscopie électronique à transmission x15000. D'après Bachère et al, 2004

### I.3. Les polynucléaires neutrophiles et macrophages chez l'homme

#### I.1.3.1 Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes humains circulants les plus abondants (50 à 70%) et les premières cellules recrutées au niveau d'un site d'infection. Ces cellules ont une durée de vie courte et leur homéostasie est maintenue par une libération continue de neutrophiles par la moelle osseuse. Les polynucléaires neutrophiles ont un rôle essentiel dans l'immunité innée. (Klebanoff and Clark 1978, Mary 1985).

##### a) Organisation cellulaire

Les polynucléaires neutrophiles sont caractérisés par leur noyau multilobé (2 à 5 lobes nucléaires), les lobes étant reliés par des fils de chromatine (Figure 5). Leur diamètre est d'environ 15  $\mu\text{m}$ , avec un rapport noyau/cytoplasme compris entre 0,3 et 0,4. Le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles est riche en granules qui peuvent être divisés en deux populations principales : les granules azurophiles ou primaires et les granules spécifiques ou secondaires (Figure 5). Les granules azurophiles contiennent des hydrolases acides (principalement des glycosidases et protéases telles que les cathepsines A-D), des protéases neutres (cathepsines G, élastases et collagénases), des protéines et peptides cationiques (défensines alpha dans les granules azurophiles et cathélicidine LL37 dans les granules spécifiques, des myéloperoxydases, des lysozymes et des glycosaminoglycanes). Ces granules peuvent alors être colorés avec de la diaminobenzidine qui réagit avec la myéloperoxydase (Figure 5). Les granules spécifiques contiennent des lysozymes, des

lactoferrines, des collagénases, des phosphatases alcalines et des protéines liant la vitamine B12. Cet arsenal lytique va permettre aux neutrophiles de jouer un rôle important de l'immunité innée. Les polynucléaires neutrophiles peuvent également contenir des granulations contenant des gélatinases ou tertiaires et des vésicules sécrétoires (Klebanoff and Clark 1978 , Chatenoud and Bach 2012).

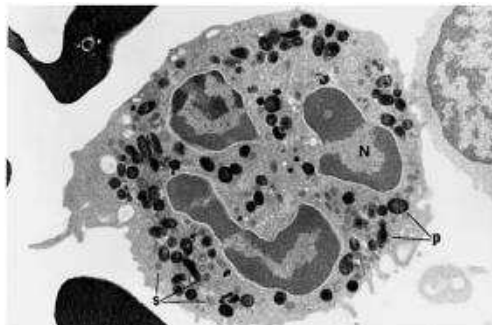


Figure 5. Polynucléaire neutrophile observé en microscopie électronique. L'extrême diversité des granules cytoplasmiques du neutrophile est ici mise en évidence. Les granules azurophiles ou granules primaires, annotées p, sont très abondantes. Ces granules sont larges et sombres, marqués par une coloration à la diaminobenzidine qui réagit avec la myéloperoxydase. Les granules secondaires, annotés s, sont de plus petite taille et moins denses. Le noyau annoté N est multilobé. Le grossissement est de X13 200 (Chatenoud and Bach 2012).

#### b) Origine, cycle de vie et migration

Les polynucléaires neutrophiles proviennent de la moelle osseuse, à partir de la maturation de progéniteurs (Klebanoff and Clark 1978 , Mary 1985, Mitsiadis et al. 2007, Tak et al. 2013). Les premiers progéniteurs de la lignée granulocytaire sont les myéloblastes, qui peuvent encore à ce stade se différencier pour donner les trois lignées de granulocytes : neutrophiles, éosinophiles ou basophiles. Les myéloblastes proviennent de la différenciation de précurseurs granulocytaires/monocytaires, provenant eux même de précurseurs myéloïdes communs, dérivés de cellules souches. Le précurseur myéloïde granulocytaire/monocytaire s'engage dans la voie de différenciation granulocytaire sous l'influence du facteur de croissance G-CSF (colony stimulating factor). Les myéloblastes vont se différencier en promyélocytes, qui ne peuvent plus donner que des neutrophiles. Les promyélocytes vont ensuite se différencier en myélocytes. Les myéloblastes, promyélocytes et myélocytes sont encore capables de se diviser par mitose, ce qui aboutit à l'obtention de 2 cellules identiques pouvant à nouveau se diviser ou se différencier. La différenciation des myélocytes donne des métamyélocytes, qui n'ont plus la capacité de se diviser. Les métamyélocytes vont alors se différencier en neutrophiles juvéniles ou « banded cells » qui donnent ensuite des neutrophiles matures capables de passer dans la circulation (Klebanoff and Clark 1978, Mary 1985, Mitsiadis et al. 2007, Tak et al. 2013). Le passage de la moelle osseuse vers la circulation sanguine se fait grâce à des chimiokines, exprimées dans les vaisseaux de la moelle osseuse, qui sont reconnues par les récepteurs portés par les neutrophiles. A l'inverse, une autre chimiokine, exprimée par les ostéoblastes retient les neutrophiles dans la moelle osseuse (Day and Link 2012).



Une fois dans le sang, la demi-vie des neutrophiles est courte. En absence de challenge immunologique, ils meurent en effet par apoptose 6 à 10 heures après leur passage de la moelle épinière vers le sang. Les neutrophiles qui ont migré vers les tissus ont une durée de vie plus longue, pouvant aller jusqu'à 48h après leur sortie de la moelle osseuse (Maianski et al. 2004 , Mitsiadis et al. 2007). Après apoptose, les restes cellulaires vont être éliminés notamment grâce à la phagocytose par des macrophages, principalement dans la rate, le foie et la moelle osseuse (Tak et al. 2013).

En cas d'infection ou d'inflammation, les neutrophiles vont migrer rapidement et massivement vers le site inflammatoire, comme cela a été décrit pour les hémocytes de *C. gigas* (chapitre précédent). Ce sont les premières cellules à migrer du sang vers le foyer inflammatoire. La durée de vie des neutrophiles peut alors être raccourcie ou rallongée grâce à des facteurs modulant l'apoptose, afin qu'ils puissent exercer leur rôle (Maianski et al. 2004). La migration des neutrophiles se fait sous l'influence de différents stimuli provenant de foyers inflammatoires. Les neutrophiles vont tout d'abord adhérer aux cellules endothéliales des capillaires ou des veinules post-capillaires. Cette adhésion est possible grâce à des molécules d'adhésion notamment les sélectines, exprimées d'une part par les neutrophiles (L-sélectine) et d'autre part par les cellules endothéliales (E-et P-sélectines) (Nourshargh and Alon 2014 , Lyck and Enzmann 2015). Ceci induit une phase de roulement des neutrophiles se déplaçant sur les cellules endothéliales activées. Cette phase de roulement va induire l'activation d'intégrines à la surface des neutrophiles. Une fois activées, les intégrines se lient aux molécules d'adhérence ICAM (Intercellular Adhesion Molecules) exprimées à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction intégrines - ICAM induit alors une fixation non réversible qui ancre le polynucléaire à l'endothélium inflammatoire. Les neutrophiles vont alors rejoindre par diapédèse le foyer inflammatoire (Lyck and Enzmann 2015).

### 1.1.3.2 Les macrophages

Les macrophages proviennent de la différenciation des monocytes. Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse comme les polynucléaires neutrophiles. Ils sont ensuite libérés dans le sang puis vont pouvoir se différencier dans les tissus soit en macrophages soit en cellules dendritiques, qui migreront ensuite vers les ganglions lymphatiques (Chatenoud and Bach 2012).

#### a) Organisation cellulaire des monocytes et macrophages

Les monocytes sont les plus grands des leucocytes circulants (12 à 20 µm de diamètre). Ils sont peu abondants dans le sang (2 à 10% des leucocytes). Leur noyau est volumineux, central ou périphérique, plutôt en forme de fer à cheval ou de rein ([Figure 6.A](#)). Les organites se trouvent dans la partie creuse du noyau. Leur cytoplasme est caractérisé par la présence de lysosomes primaires qui apparaissent comme des grains azurophiles en microscopie optique ([Figure 6.A](#)) (Chatenoud and Bach 2012). Les monocytes ne restent dans le sang que 2 à 3 jours et, lorsque les monocytes migrent

dans les tissus, ils se différencient en macrophages. La différenciation en macrophages peut aussi se faire en cas d'inflammation, à partir de monocytes circulants (Figure 6.B). Les macrophages sont plus gros que les monocytes, le rapport noyau/cytoplasme a diminué, leur contour est irrégulier et leur cytoplasme contient d'abondants lysosomes (Figure 6.B). La morphologie des macrophages varie selon le tissu dans lequel ils se trouvent (Kierszenbaum, Validire-Charpy and Validire 2006).

Les macrophages du foie sont les cellules de Kupffer, ces cellules ont alors une forme allongée et sont contre la paroi des sinusoides veineux. Les macrophages peuvent également se situer dans la rate où ce sont de grandes cellules irrégulières. Dans les poumons, les macrophages alvéolaires peuvent être également appelés cellules à poussières et sont accolés aux alvéoles pulmonaires (au niveau de l'épithélium ou dans la lumière). Dans le chorion de la villosité intestinale, les macrophages sont très nombreux et tassés les uns contre les autres. Dans la moelle osseuse des macrophages participant au remodelage de la matrice osseuse sont appelés ostéoclastes (Kierszenbaum et al. 2006).

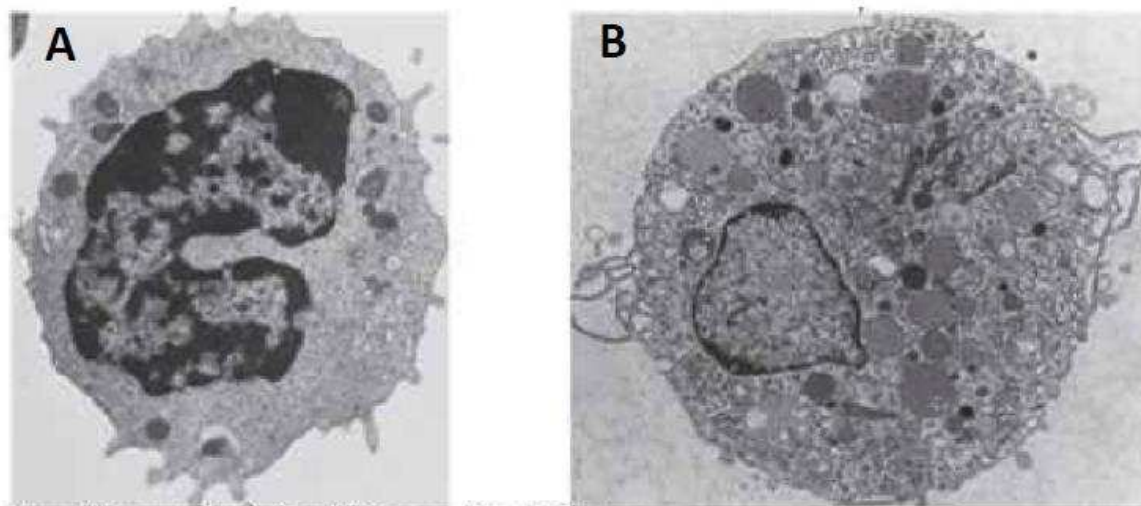


Figure 6. Monocyte sanguin et macrophage activé. (A) Monocyte sanguin circulant, non différencié photographié en microscopie électronique. Le noyau est en forme de fer à cheval et le cytoplasme contient des lysosomes primaires. (B) Macrophage activé provenant de la différenciation d'un monocyte. Il s'agit ici d'un macrophage inflammatoire. La cellule est plus grosse que le monocyte, le rapport noyau/cytoplasme a diminué. Le cytoplasme contient de nombreuses granules, dont de nombreux lysosomes. D'après (Kumar et al. 2007)

#### b) Origine, cycle de vie et migration

Comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes proviennent de la moelle osseuse, à partir de la maturation de progéniteurs. Les premiers progéniteurs de la lignée monocyttaire sont les monoblastes. Les monoblastes proviennent comme les myéloblastes de la différenciation de précurseurs myéloïdes granulocytaires/monocytaires, provenant eux-mêmes de précurseurs myéloïdes communs, dérivés de cellules souches. Le précurseur myéloïde

granulocytaire/ monocytaire s'engage dans la voie de différenciation monocytaire sous l'influence du facteur de croissance M-CSF (colony stimulating factor). Les monoblastes vont alors se différencier en promonocytes qui vont eux-mêmes se différencier en monocytes (Chatenoud and Bach 2012).

Les monocytes sont libérés vers le sang sous l'influence de chimiokines spécifiques. Sous l'influence d'autres facteurs chimio-attractants, les monocytes circulants migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages. Selon leur localisation tissulaire, les macrophages peuvent avoir une demi-vie de plusieurs jours à plusieurs mois et certains peuvent se multiplier. Les monocytes sanguins peuvent également rapidement se différencier en macrophages dans un contexte inflammatoire. Au cours d'une réponse inflammatoire, les macrophages différenciés à partir des monocytes circulants gagnent les tissus quelques heures après les polynucléaires neutrophiles. Les mécanismes de migration par diapédèse qu'ils utilisent sont similaires à ceux employés par les polynucléaires neutrophiles (Kierszenbaum et al. 2006 , Chatenoud and Bach 2012).

## II. LA PHAGOCYTOSE

La phagocytose est un processus par lequel de multiples types cellulaires eucaryotes internalisent des particules supérieures à 0,5  $\mu\text{m}$  à partir du milieu extérieur. Ce processus de phagocytose et les phagocytes, qui en sont les effecteurs cellulaires, ont été découverts en 1882 par le professeur Elie Metchnikoff de l'institut Pasteur de Paris qui reçut le Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1908 pour ses travaux sur l'immunité. Les travaux du professeur Metchnikoff ont montré que les phagocytes de larves d'étoile de mer étaient capables de migrer rapidement et de se regrouper autour d'épines de roses piquées dans le corps transparent de ces larves (Tan and Dee 2009 , Desjardins, Houde and Gagnon 2005 , Abd et al. 2007b). Il a également montré que les phagocytes de *Daphnia* sp. et de mammifères étaient capables de migrer, de s'agréger autour de micro-organismes pathogènes et de les internaliser (Tan and Dee 2009). Ces observations sont à la base de la théorie de l'immunité cellulaire.

Les fonctions assurées par la phagocytose varient selon les organismes. Les protistes hétérotrophes, tels que les amibes, utilisent la phagocytose pour se nourrir de bactéries par broutage (phagotrophie). Chez les métazoaires, ce processus fait partie de la réponse immunitaire et est utilisé pour notamment pour éviter les infections, éliminer les corps apoptotiques, maintenir l'homéostasie tissulaire ainsi que l'homéostasie du fer et peut être impliquée dans de nombreux autres processus (Desjardins et al. 2005). D'une manière générale, la phagocytose se déroule en trois étapes (Flanagan, Jaumouille and Grinstein 2012) :

1) la reconnaissance des particules étrangères, qui peut se faire de manière directe ou indirecte, on parle alors respectivement de phagocytose non-opsonique ou opsonique.

- l'internalisation où les particules à phagocyter sont entourées par des pseudopodes grâce à des remaniements du cytosquelette d'actine, puis la fusion de la membrane plasmique au sommet de ces protrusions cellulaires entraînant la formation d'une vésicule intracellulaire : le phagosome.
- la maturation du phagosome qui se fait par échanges de composants membranaires et luminaux avec d'autres compartiments vésiculaires comme les endosomes (précoces et tardifs) et les lysosomes, ce qui aboutit à la formation d'un phagolysosome. La maturation du phagosome va permettre de produire un environnement microbicide, obtenu grâce à une acidification progressive du milieu intra-vacuolaire, à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), à la libération et l'activation de protéases et de peptides antimicrobiens ainsi qu'à l'accumulation de métaux tels que le cuivre et le zinc.

La grande conservation de ce processus à travers le règne vivant a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents en travaillant sur des organismes modèles, comme par exemple le nématode *C. elegans* (Elis, Jacobson and Horvitz 1991 , Moynault, Luciani and Chimini 1998 , Wu and Horvitz 1998 , Liu and Hengartner 1999 , Smits et al. 1999 , Gumienny and Hengartner 2001 , Zhou et al. 2001 , Reddien and Horvitz 2004), la mouche *Drosophila melanogaster* (Rizki and Rizki 1959 , Rizki and Rizki 1980 , Tepass et al. 1994, Zhou et al. 1995, Pearson, Lux and Krieger 1995, Franc et al. 1996, Franc et al. 1999, Hoffmann et al. 1999 , Erod-Erickson, Mishra and Schneider 2000, Franc 2002, Stuart and Ezekowitz 2008) et l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* (Vogel et al. 1980 , Buczynski et al. 1997 , Eichinger, Lee and Schleicher 1999 , Seastone et al. 1999 , Seastone et al. 2001 , Cardelli 2001, Chen, Zhuchenko and Kuspa 2007a, Stuart and Ezekowitz 2008). Ce processus cellulaire est depuis bien décrit chez les vertébrés et les invertébrés. En ce qui concerne les amibes, un certain nombre d'études ont permis de mieux comprendre ce processus, principalement chez l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*, cependant la machinerie cellulaire n'a pas été aussi bien décrite que chez les hôtes supérieurs. Les limitations sont notamment dues au fait que les amibes modèles utilisées en laboratoire se développent généralement en milieu axénique, utilisant alors plus des mécanismes de micro-pinocytose que de phagocytose pour se nourrir, limitant ainsi les recherches possibles sur la phagocytose.

Etant donné les objectifs d'immunologie comparée de cette étude, nous avons pris le parti dans cette revue bibliographique de documenter les effecteurs de phagocytose de l'huître ainsi que ceux connus chez l'humain et chez les amibes modèles *Acanthamoeba castellanii* et *Dictyostelium discoideum* qui sont des espèces pour lesquelles les mécanismes de la phagocytose ont très bien été décrits. Ces dans ce esprit que sont écrits les chapitres qui suivent.

## II.1 La reconnaissance

Le processus de phagocytose est déclenché par la reconnaissance de ligands spécifiques par les récepteurs présents à la surface des phagocytes. Le système de reconnaissance le plus répandu à travers le règne vivant est celui de la liaison de carbohydrates à des récepteurs membranaires des phagocytes (Desjardins et al. 2005 , McGreal et al. 2006) . Ce type de liaison contribue notamment à la reconnaissance des bactéries par les amibes, les hémocytes d'invertébrés (tels que l'huître creuse *C. gigas*) et les cellules immunitaires des mammifères. Les invertébrés possèdent dans leurs génomes de nombreux gènes codant des PRRs homologues de ceux identifiés chez les vertébrés. Cependant, si ces gènes sont homologues, contrairement aux vertébrés, il a été montré que chez un certain nombre d'invertébrés différentes familles de récepteurs présentent un polymorphisme très important (Messier-Solek, Buckley and Rast 2010). Ce polymorphisme a été mis en évidence récemment chez l'huître *C. gigas* suite à l'étude du génome (Zhang et al. 2015).

### II.1.1 Les récepteurs de reconnaissance directe des mézozoaires

Dans le cas de la reconnaissance directe, le ligand reconnu par les récepteurs est présent à la surface de la particule à internaliser. Les ligands sont alors appelés MAMPs (microbe-associated molecular patterns) et sont reconnus par les PRRs (pattern recognition receptors) présents à la surface des cellules immunitaires. Les MAMPs incluent les carbohydrates bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif et le mannose ; le peptidoglycane (PG) des bactéries à Gram positif et négatif ; les acides lipotéichoïques (LTA) des bactéries à Gram positif ; les flagellines des bactéries à Gram négatif et les  $\beta$ -1,3-glucanes des champignons (Mogensen 2009). Chez les macrophages humains, les principaux types de récepteurs de phagocytose impliqués dans la reconnaissance directe des micro-organismes sont les lectines de type C également appelées CLR (C-Type Lectin Receptors), les récepteurs Scavenger (SRs) et les intégrines.

#### II.1.1.1 Les lectines de type C ou CLR

Les lectines de type C des macrophages humains permettent la reconnaissance des carbohydrates portés par les pathogènes, de manière dépendante du calcium grâce à leurs domaines CRDs (carbohydrate-recognition domain). Les CLR les plus étudiés sont le récepteur au mannose (MR pour mannose receptor) et les dectines (DeFranco et al. 2009, Dambuzza and Brown 2015).

Le MMR (macrophage mannose receptor) est le premier récepteur de la phagocytose identifié en 1990 (Ezekowitz et al. 1990 , Taylor et al. 1990). Le MR se lie au mannose, au fucose, au N-acétylglucosamine et aux sucres sulfatés. Ce récepteur peut reconnaître des bactéries à Gram-positif et négatif, des champignons, des virus et des parasites tels que *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus*

neoformans, le virus HIV, le virus de la grippe, le virus de la dengue et des espèces de *Leishmania* (Azad, Rajaram and Schlesinger 2014). Cependant son rôle en tant que véritable récepteur de phagocytose reste discuté (Le Cabec et al. 2002).

Les dectines les plus étudiées sont Dectin-1 et Dectin-2 (Dambuza and Brown 2015). Dectin-1 reconnaît les  $\beta$ -glucanes exprimées par la majorité des champignons, dont les espèces pathogènes des genres *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* et *Coccidioides* (Hardison and Brown 2012). Dectin-2 permet également la reconnaissance de nombreuses levures telles que *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium audouinii*, *Trichophyton rubrum* et *Malassezia* sp., grâce à leurs structures riches en mannose (McGreal et al. 2006 , Dambuza and Brown 2015). De plus, il a été démontré que Dectin-1 et Dectin-2 ont un rôle important dans la reconnaissance des bactéries du genre *Mycobacterium* (Marakalala, Graham and Brown 2010 , Yonekawa et al. 2014).

Chez l'humain, cette famille de récepteurs comprend aussi DC-SIGN, L-SIGN, DEC-205, Endo-180, Langerin, DCAL-1 et BDCA-2 (Stuart and Ezekowitz 2005).

Chez l'humain, des études transcriptomiques ont permis d'identifier un gène codant des protéines de liaison aux  $\beta$ -1,3-glucanes (CBP), exprimé dans les hémocytes et les branchies (Tanguy, Guo and Ford 2004) et un gène codant pour une lectine de type C (Yamaura, Takahashi and Suzuki 2008). Un gène codant pour une lectine liant les beta-galactosides a été identifiée chez *C. virginica* (Tanguy et al. 2004). Cependant, ces protéines restent des récepteurs de phagocytose putatifs, leur implication fonctionnelle dans le processus de phagocytose n'ayant pas été démontrée.

#### II.1.1.2 Les récepteurs Scavenger

Chez l'humain, les récepteurs Scavenger (SRs) sont des récepteurs impliqués dans la phagocytose non-opsonique et permettent l'élimination de micro-organismes mais aussi de cellules apoptotiques et des molécules de l'hôte ayant subi des modifications (oxydations principalement), devenant alors des DAMPs (motifs moléculaires associés aux dommages) (Sarrias et al. 2004 , Greaves and Gordon 2009). Les SRs sont des protéines transmembranaires à plusieurs domaines et sont classées en 8 familles très variées reconnaissant un grand nombre de ligands. Un domaine de ces protéines a particulièrement été étudié, pour son rôle clé dans l'immunité de l'hôte, le domaine receptor cysteine-rich (SRCR) partagé par un grand nombre de SRs de classe A. Les SRs contenant ce domaine SRCR sont trimériques et possèdent un domaine extracellulaire collagèneux ainsi que le domaine SRCR en C-terminal (Peiser et al. 2000 , Flannagan et al. 2012 , Thomas et al. 2000). Grâce au domaine collagèneux ou au domaine SRCR, les SRs lient les protéines d'enveloppe de certains rétrovirus, l'ADN bactérien, le LPS des bactéries à Gram-négatif et les acides lipotéichoïques des

bactéries à Gram positif, l'ARN double brin, les cellules apoptotiques et des particules environnementales (Gough and Gordon 2000 , Murphy et al. 2005 , Limmon et al. 2008 , Liu et al. 2011).

Des récepteurs Scavenger (SRs) ont été identifiés et caractérisés chez les mollusques, notamment chez le pétoncle *Chlamys farreri* (Liu et al. 2011). Chez le pétoncle, les auteurs ont montré (i) la présence de gènes codant des récepteurs contenant des domaines SRCR, caractéristiques des SRs, (ii) une augmentation des ARNm codés par ces gènes dans les tissus en réponse à des PAMPs (LPS, PG, PGN, glucanes) (iii) la localisation de ces récepteurs à la surface des hémocytes et leur capacité à lier le LPS. Une étude transcriptomique a également mis en évidence la présence de gènes codant pour ces récepteurs SRs putatifs chez l'huître perlière *Pinctada martensii* (Wang et al. 2012c), mais pas à ce jour chez l'huître creuse *C. gigas*.

### II.1.1.3 Les intégrines

Les intégrines constituent une grande famille de protéines hétérodimériques qui agissent comme des récepteurs et ont un rôle central dans l'adhésion cellulaire et notamment dans l'adhésion des cellules immunitaires aux micro-organismes. Les intégrines sont divisées en sous familles en fonction de leurs sous-unités. Il existe 8 types de sous-unités  $\alpha$  1 à 8 et 18 types de sous-unités  $\beta$  1 à 11 puis M, L, V, E, X, D, et IIb. Les sous unités  $\alpha$  peuvent s'associer avec les sous unités  $\beta$  numérotées de 1 à 11 et  $\beta$  V, les  $\alpha$  2 avec les sous-unités alpha L, M, D et X, les  $\alpha$  3 avec alpha V et IIb, les  $\alpha$  4 avec les  $\beta$  6, les  $\alpha$  5, 6 et 8 avec  $\beta$  V et les  $\alpha$  7 avec les  $\beta$  4 et E (Hynes 2002). Les intégrines de la sous famille  $\alpha$  1 sont présentes sur les cellules non phagocytaires et peuvent servir de récepteurs d'internalisation pour des pathogènes tels que *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* et même des virus comme l'herpès virus (Tran Van Nhieu and Isberg 1993, Snha et al. 1999 , Fowler et al. 2000 , Nemerow and Cheresch 2002 , Wong and Isberg 2005, Heise and Dersch 2006, Dupuy and Caron 2008).

Les intégrines  $\alpha$ V $\beta$ 3 et  $\alpha$ V $\beta$ 5 peuvent être impliquées dans la phagocytose des cellules apoptotiques (Reynolds et al. 2002 , Dupuy and Caron 2008) et les intégrines  $\alpha$ M $\beta$ 2 dans la phagocytose de microorganismes (Melcher and Chan 1981 , Virji 1996 , Machesky and Hall 1997 , Price et al. 1998, Dupuy and Caron 2008). Les intégrines  $\alpha$ M $\beta$ 2 sont les mieux décrites, appelées aussi CD11b/CD18 ou encore CR<sub>3</sub> (récepteur du complément), qui ont un rôle clé dans l'adhésion des cellules immunitaires, la phagocytose et la migration. Les intégrines CD11b/CD18, reconnaissent le mannose et les glucanes grâce à un domaine « lectin-like » localisé en C-terminal de la sous-unité CD11b (Forsyth, Flow and Zhang 1998, Brown and Gordon 2005 , Netea et al. 2008). Grâce à ces domaines, CD11b/CD18 va pouvoir lier les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*;

ainsi que le Zymosan (Forsyth et al. 1998 , Le Cabec et al. 2002 , Brown and Gordon 2005 , Netea et al. 2008).

#### II.1.1.4 Les récepteurs Nimrod chez les invertébrés

Le premier récepteur de la famille Nimrod a été identifié en 2005 chez *Drosophila* par Kocks et ses collaborateurs (Kocks et al. 2005). Le rôle prépondérant de ce récepteur, nommé Eater, dans le processus de phagocytose a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Kocks et al. 2005). Eater est une protéine transmembranaire contenant des domaines EGF (epithelial growth factor)-like répétés dans sa partie extracellulaire avec une extrémité N-terminale permettant la reconnaissance des bactéries. D'autres récepteurs de la famille Nimrod ont également été décrit pour leurs implications dans l'immunité d'invertébrés tels que *Drosophila* (Kurucz et al. 2007 , Bretscher et al. 2015), *Anopheles gambiae* (Midega et al. 2013) et *C. gigas* (Wang et al. 2015). Ces récepteurs sont classés en 3 catégories : Nimrod A, B et C, en fonction de la structure des domaines EGF-like également appelés domaines NIM (Wang et al. 2015). Chez l'huître creuse *C. gigas*, un récepteur phagocytaire de la famille Nimrod liant le LPS des bactéries à Gram négatif a récemment été mis en évidence par une étude transcriptomique (Wang et al. 2015). Ce récepteur a été nommé CgNimC et est principalement exprimé dans les hémocytes et le manteau.

### II.1.2 La reconnaissance indirecte chez les métazoaires: opsonines et récepteurs

Chez les métazoaires, la phagocytose peut être médiée par des opsonines se liant à des motifs moléculaires présents à la surface de la particule à internaliser et reconnues par des récepteurs présents à la surface des phagocytes professionnels (polynucléaires neutrophiles et macrophages principalement chez les vertébrés, hémocytes chez les invertébrés). On parle alors de phagocytose opsonique.

#### II.1.2.1 Les opsonines

Les principales opsonines humaines sont les immunoglobulines, les collectines, les ficolines, les protéines liant le LPS (LBP) et les fragments du complément (DeFranco et al. 2009). Les immunoglobulines vont reconnaître spécifiquement un antigène porté par les micro-organismes grâce à leurs paratopes (site de reconnaissance spécifique) constitués des domaines variables de la chaîne légère et de la chaîne lourde (1 paratope au bout de chaque bras) (Padlan 1994). Les collectines, dont font parties les mannose-binding lectines (MBLs), possèdent des domaines C-terminaux appelés carbohydrate-recognition domain (CRDs) qui sont similaires à ceux des lectines de type C et qui lient également les carbohydrates de manière dépendante du calcium (DeFranco et al. 2009). Les ficolines reconnaissent les carbohydrates grâce à un domaine fibrinogène (DeFranco et al.



2009). Les fragments du complément C3bi peuvent également se lier de à la surface des micro-organismes pathogènes (DeFranco et al. 2009). Chez l'humain, les LBPs sont des protéines sécrétées capables de lier le LPS appartenant à la famille protéique Plunc (palate, lung and nasal epithelium clone). Les protéines "bactericidal/permeability-increasing" BPI font partie de la même famille des protéines Plunc et sont également des protéines sécrétées capables de lier le LPS. Les LBPs vont opsoniser les LPS bactériens pour se lier à des récepteurs membranaires et déclencher la phagocytose, alors que les BPI vont plutôt neutraliser le LPS et ont une activité bactéricide (Eckert et al. 2013).

Chez l'huître *C. gigas* différentes molécules sécrétées conduisant à l'opsonisation des micro-organismes ont été identifiées : des PGRPs (Itoh and Takahashi 2008, Itoh and Takahashi 2009, Zhang et al. 2013), une BPI homologue à celle identifiée chez l'humain (Gonzalez et al. 2007b) et des fibrinogen-related proteins putatives (FREPs, contenant des domaines fibrinogen-like) (Huang et al. 2015). Les opsonines décrites chez *C. gigas* sont : les gicalines (qui sont des agglutinines) (Olafsen, Fletcher and Grant 1992), les galectines, les lectines de type C (Yamaura et al. 2008) et enfin une superoxide dismutase extracellulaire à cuivre/zinc (Cg-EcSOD), qui est la protéine majoritaire du plasma (Duperthuy et al. 2011).

#### II.1.2.2 Les récepteurs de phagocytose opsonique

Les immunoglobulines humaines sont reconnues par les récepteurs au fragment Fc de ces protéines (FcRs) (Swanson and Hoppe). Les collectines et ficolines sont reconnues par les sérines protéases MASPs qui couplent ces opsonines avec la voie du complément, aboutissant à la formation de C3bi. Les fragments du complément C3bi sont reconnus par les récepteurs aux fragments du complément (CRs) (Desjardins et al. 2005), dont CR3 et CR4 qui sont des intégrines.

En plus du domaine lectine-like précédemment cité, la sous-unité CD11b du récepteur CR3 contient un domaine I qui est responsable de la reconnaissance du fragment de complément C3bi, mais aussi les molécules d'adhésion intracellulaires ICAMs et les protéines de la matrice extracellulaire (Le Cabec et al. 2002, Netea et al. 2008). Les intégrines ont donc un rôle clé dans la reconnaissance des micro-organismes à phagocyter par les cellules immunitaires des vertébrés.

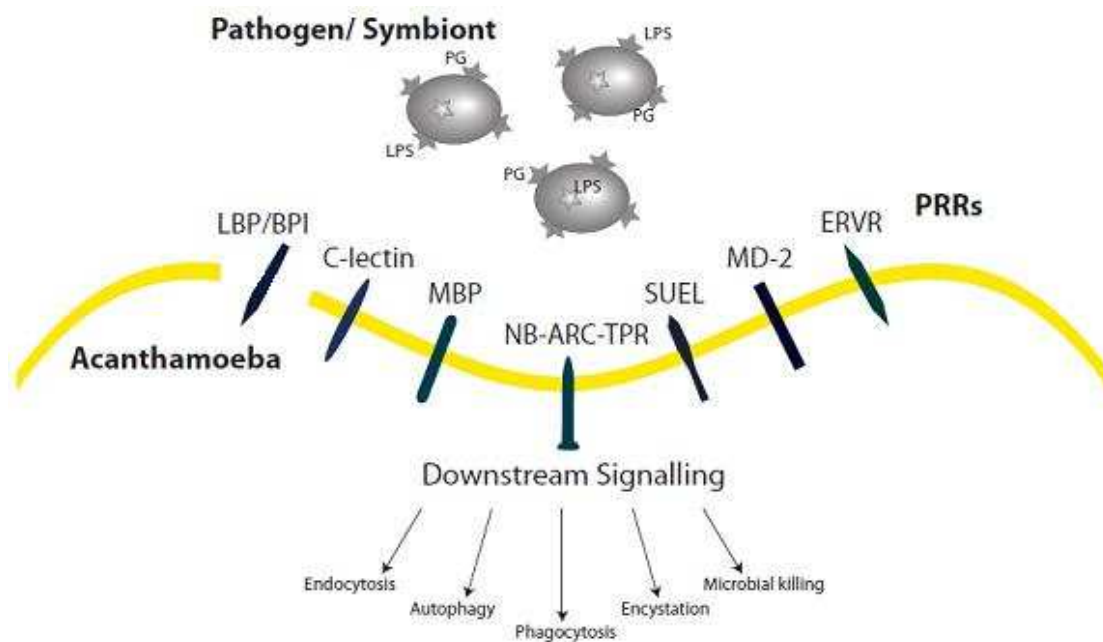
Des intégrines ont également été identifiées dans différentes sous-populations d'hémocytes de l'huître creuse *C. gigas* et ont été décrites comme des récepteurs de la phagocytose de bactéries opsonisées par la Cg-EcSOD, grâce au motif RGD (Arg-Gly-Asp) de cette opsonine (Gonzalez et al. 2005, Duperthuy et al. 2011). Dans leurs travaux, Terahara et al. ont suggéré que les intégrines seraient impliquées dans la phagocytose des hyalinocytes alors que la phagocytose des granulocytes impliquerait d'autres récepteurs fonctionnels (Terahara et al. 2006).

### II.1.3 La reconnaissance chez les amibes

Les premières études réalisées sur les amibes du genre *Dictyostelium* ont permis de mettre en évidence divers systèmes de reconnaissance. Le premier modèle proposé est celui de la reconnaissance de résidus de glucose par un récepteur amibien (non décrit) et le second est celui de la reconnaissance d'une grande variété de particules (incluant des billes de latex) par un récepteur glycoprotéique, grâce à des interactions hydrophobes (Cardelli 2001). Une étude transcriptomique a également permis d'identifier un récepteur à neuf domaines transmembranaires nommé Phg1 impliqué dans la reconnaissance et la phagocytose de certaines bactéries. En effet, les mutants délétés de PHG1 ne sont plus capables de phagocyter ni *Escherichia coli* ni les billes latex, par défaut d'adhésion, mais peuvent toujours internaliser *Klebsiella aerogenes*. Les auteurs suggèrent que Phg1 permet la reconnaissance de particules très hydrophiles, comme *E. coli* et les billes de latex, mais pas *K. aerogenes* (Cornillon et al. 2000). Une protéine integrine-like a également été décrite chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*. Cette protéine membranaire SbA (Similar to Integrin [1]) dépendante du calcium, semble jouer un rôle clé dans l'adhésion cellulaire et la phagocytose (Cornillon et al. 2006). Les domaines cytosoliques, transmembranaires et extracellulaires (notamment domaine VWA) de SbA présentent des caractéristiques des intégrines. De plus, le domaine cytosolique de SbA interagit avec la taline, qui est connue pour interagir avec les intégrines humaines (Cornillon et al. 2006, Cosson and Soldati 2008). Une étude récente a également montré que la courbure de la membrane du micro-organisme à phagocyter pouvait être reconnue par des récepteurs similaires à des récepteurs tyrosines kinases de mammifères et qui contiennent des domaines I-BAR et des domaines SH3 (Src homology domain). Ces récepteurs permettraient aux amibes d'adapter le processus de phagocytose au micro-organisme ciblé (Clarke et al. 2010).

Enfin, l'étude du génome d'*A. castellanii* a permis d'identifier un certain nombre de gènes codant pour des PRRs potentiels (Figure 7) (Clarke et al. 2013). Les auteurs de l'étude ont en effet pu identifier 6 gènes codant pour des protéines putatives de la famille des LBP/BPI (liant le LPS) et 2 protéines de liaison au peptidoglycane. Il avait été précédemment démontré que l'amibe *A. castellanii* pouvait reconnaître les bactéries à internaliser grâce à une lectine de type C liant le mannose (appelée MBP pour mannose-binding protein) exprimée à la membrane des amibes (Figure 7) (Garate et al. 2004). L'étude du génome a permis de mettre en évidence la présence de gènes codant 2 paralogs de cette lectine : les lectines liant le D-galactoside et/ou le L-rhamnose nommée SUEL (11 gènes codant) et les lectines de type H ayant un domaine prédit pour la reconnaissance du N-acétylgalactosamine (GalNAc). Les lectines SUEL ont été décrites chez certaines espèces d'invertébrés, comme l'oursin où elles ont un rôle de reconnaissance des micro-organismes pathogènes. Des protéines homologues ont été retrouvées dans les œufs de poissons et chez

certaines espèces de vertébrés, cependant leur fonction chez les vertébrés n'a pas été clairement établie (Tateno 2010). Les lectines de type H ont aussi été décrites chez les amibes du genre *Dictyostelium* et chez certaines espèces d'invertébrés, comme l'escargot *Helix pomatia* chez qui elles ont des propriétés antimicrobiennes (Sanchez et al. 2006, Clarke et al. 2013). Dans le génome d' *A. castellanii*, un gène code également pour une protéine membranaire homologue de MD-2 (myeloid differentiation factor 2) qui a été décrite pour son rôle dans la phagocytose opsonique chez l'humain (Tissieres and Pugin 2009), via son interaction avec le LPS des bactéries à Gram négatif. Enfin cette étude transcriptomique a mis en évidence la présence de gènes codant un homologue de NB-ARCTPR qui est un PRR des algues du genre *Ectocarpus*. Des gènes codant pour des protéines Sb (intégrine-like identifiée chez *Dictyostelium*) ont aussi été identifiées chez l'amibe *A. castellanii* (Clarke et al. 2013).



**Figure 7.** Les PRRs potentiels identifiés chez *A. castellanii*. LBP/BPI : lipopolysaccharide binding protein/ bactericidal permeability-increasing protein dont la localisation n'est pas démontrée, cette étude ayant identifié uniquement le gène codant ces protéines; C-lectin : lectine de type C; MBP : mannose binding protein ; SUEL lectine liant le D-galactoside/L-rhamnose; NB-ARC-TPR, NB-ARC tetratricopeptide repeat containing protein; ERVR, endogenous virus receptor. Adapté de Clarke et al., 2013

Les systèmes de reconnaissance des micro-organismes par les phagocytes qui semblent être les mieux conservés des amibes aux vertébrés sont donc la reconnaissance des carbohydrates microbiens par les lectines et/ou les intégrines.

#### II.1.4 La synapse phagocytaire

Si chaque type de récepteur de la phagocytose a été décrit séparément, il est admis que lorsqu'un phagocyte entre en interaction avec un micro-organisme, la reconnaissance se fait par l'activation de

plusieurs récepteurs, de manière simultanée ou séquentielle. Il a par exemple été démontré, chez l'humain, que la liaison de l'opsonine LBP au LPS des bactéries à Gram négatif permettait l'activation du récepteur Scavenger CD14 qui allait à son tour activer le récepteur MD2 qui activait à son tour les TLR4 (Stuart and Ezekowitz 2005). De plus, des expériences de FRET (fluorescence resonance energy transfert) ont montré la présence de coopération entre les intégrines CD11b/CD18 et les récepteurs Scavenger CD36, proches les uns des autres à la membrane, à la suite d'une interaction avec le LPS bactérien (Pfeiffer et al. 2001).

Tableau 1. Les récepteurs de phagocytoses au travers du règne vivant

	Homo sapiens	Crassostrea gigas	Acanthamoeba castellanii
Intégrines	intégrines CD11b/CD18 (Forsyth et al. 1998 , Le Cabec et al. 2002 , Brown and Gordon 2005 , Netea et al. 2008)	Intégrines (Gonzalez et al. 2005 , Duperthuy et al. 2011)	SbA (Similar to Integrin) (Cornillon et al. 2006).
Récepteurs Scavengers (SRs)	(Gough and Gordon 2000 , Murphy et al. 2005 , Limmon et al. 2008 , Liu et al. 2011)	(Liu et al. 2011)*	X
Les lectines de type C ou CLRs	récepteur au mannose et dectines (DeFranco et al. 2009, Dambuzza and Brown 2015)	lectines de type C et lectines liant les beta-galactoside putatives (Tanguy et al. 2004) ; (Yamaura et al. 2008 )	lectine de type C liant le mannose (MBP), les lectines SUEL et lectines de type H (Garate, et al. 2004 ; Clarke, et al. 2013)
Récepteurs Nimrod	X	CgNimC (Wang et al. 2015)	X
MD-2 (myeloid differentiation factor 2)	(Tissieres and Pugin 2009)	X	Homologue de MD-2 (Clarke, et al. 2013)

\* Ces récepteurs n'ont pas été identifiés chez *C. gigas*, il s'agit de protéines décrites chez le pétoncle *Chlamys farreri* et l'huître perlière *Pinctada martensii*

## II.2 L'internalisation

L'internalisation de la particule reconnue par le phagocyte est un processus dépendant de l'actine. L'activation des voies de signalisation intracellulaire va provoquer un réarrangement dynamique du

du squelette d'actine et de la surface membranaire de la cellule. Les protéines impliquées dans cette étape de la phagocytose sont très conservées, des amibes jusqu'aux vertébrés (Boulais et al. 2010). Il a d'ailleurs été proposé que l'apparition de la fonction de phagocytose chez les eucaryotes a été concomitante de l'apparition des complexes moléculaires acto-myosines (Richards and Cavalier-Smith 2005).

### II.2.1. Les voies de signalisation activées par les récepteurs

Chez l'humain, les récepteurs FcRs et les lectines vont se regrouper suite à la reconnaissance des particules à internaliser, permettant à leurs domaines ITAM cytosoliques de s'associer puis d'être phosphorylés par des protéine-tyrosine kinases de la famille Src (Fuller et al. 2007, Flannagan et al. 2012). Lorsque les domaines ITAM sont phosphorylés, des protéines adaptatrices LAT vont se lier et lier à leur tour phosphotyrosines. Ces protéines adaptatrices vont alors induire l'activation de la petite protéine G Rac, de phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) ou de la phospholipase C (PLC) (Swanson and Hoppe 2004, Flannagan et al. 2012). Les PI3K vont alors permettre la phosphorylation du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Il a été montré que les PI3K ont un rôle clé dans l'extension des pseudopodes d'actine, et donc dans la phagocytose (Cox et al. 1999), notamment en activant les protéines WASP qui sont des activateurs de la machinerie de polymérisation de l'actine. La PLC va dégrader le PI(4,5)P<sub>2</sub> en diacylglycérol (DAG) et inositol-3,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et le DAG va activer la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PLC et de la PKC sont nécessaires à la phagocytose bien que leur action soit indépendante de l'actine (Larsen et al. 2002).

Chez l'huître *C. gigas*, une étude transcriptomique menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes d'huîtres a permis de mettre en évidence la surexpression des gènes codant des protéine-tyrosine kinases de la famille Src (de Lorgeril et al. 2011). De plus, des protéines kinases de type C (PKC) et phospholipases C (PLC) ont été identifiées chez l'huître, cependant ces enzymes ont été caractérisées pour leur implication dans la métamorphose des larves et non dans la phagocytose (Yang et al. 2014).

Comme chez l'humain, le remodelage de l'actine semble être dépendant de cascade de signalisation impliquant des tyrosines kinases, et notamment de la famille SRC kinases cela ayant été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs (Alsam et al. 2005, Lorenzo-Morales, Khan and Walochnik 2015).

### II.2.2 L'importance des petites protéines G

Les petites protéines G, également appelées petites GTPases, sont sous forme actives lorsqu'elles sont liées au GTP et sous forme inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Ces petites GTPases sont

activées par des Guanine exchange factors (GEFs) qui catalysent l'échange du GDP en GTP (Flannagan et al. 2012). A l'inverse, les protéines "GTPase activating protein" (GAPs) vont permettre l'hydrolyse du GTP en GDP et ainsi inactiver les petites GTPases.

Les petites GTPases de la famille Rho sont très importantes dans la régulation de l'actine et leur implication dans la formation du phagosome a été démontrée chez l'humain (Flannagan et al. 2012). Les GEFs des Rho GTPases sont en effet recrutés au niveau des coupes phagocytaires et leur inactivation inhibent la phagocytose (Caron and Hall 1998 , Jankowski, Zhu and Marshall 2008). Les petites GTPases Cdc42 sont aussi fortement impliquées dans la phagocytose, leur inactivation par mutation inhibant fortement ce processus cellulaire (Park and Cox 2009). Leur forme liée au GTP permet l'activation de la protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) et joue alors un rôle primordial dans la phagocytose, notamment celle induite par les récepteurs FcRs (Park and Cox 2009 , Flannagan et al. 2012). Les petites GTPases de la famille Rac jouent également un rôle dans le processus de phagocytose. Deux GTPases de cette famille sont principalement impliquées : Rac1 et Rac2, toutes les deux décrites pour induire la formation de lamellipodes. Ces trois familles de petites GTPases semblent avoir des rôles complémentaires dans la phagocytose et interviennent à différentes étapes de processus d'internalisation (Hoppe and Swanson 2004).

Chez l'huître *C. gigas*, une étude transcriptomique menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes d'huîtres a permis de mettre en évidence la surexpression des gènes codant des petites GTPases des familles Rho, Rac et Cdc42 (de Lorgeril et al. 2011). Les petites GTPases semblent donc être également essentielles pour la phagocytose chez l'huître *C. gigas*, cependant leur rôle dans ce processus n'a pas été démontré à ce jour.

Les petites GTPases ont aussi un rôle central dans la phagocytose des amibes *Acanthamoeba castellanii* (Alsam et al. 2005) et *Dictyostelium discoideum* (Peracino et al. 1998 , Clarke et al. 2010). En effet, chez *D. discoideum*, un marquage à la GFP de domaines se liant aux Ras activées a montré que cette petite GTPase était activée au niveau de toute la coupe phagocytaire (Clarke et al. 2010). Des inhibiteurs des kinases spécifiques de RhoA utilisés chez *A. castellanii* bloquent partiellement la phagocytose. Cette inhibition partielle suggère que d'autres GTPases peuvent prendre le relais de RhoA, également chez *A. castellanii*. Cette hypothèse est supportée par le fait que la phagocytose chez *A. castellanii* est dépendante à l'activité de la PI3K, connue notamment pour son rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine par Rac et Cdc42 (Alsam et al. 2005 , Clarke et al. 2010).

### II.2.3 La polymérisation de l'actine

Il a été montré chez l'humain que les protéines Cdc42 liées au GTP ou le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> peuvent activer les WASP. Les protéines Rac liées au GTP peuvent activer les protéines de la famille Scar/WAVE. Les

protéines WASP et/ou les protéines de la famille Scar/WAVE vont alors activer le complexe de nucléation Arp 2/3 impliqué dans le réarrangement du cytosquelette d'actine filamenteuse et donc la formation de pseudopodes (May et al. 2000). Les complexes Arp2/3 se lient aux extrémités des filaments d'actine avec une haute affinité. Ces complexes de nucléation vont former des dimères similaires à ceux d'actine et servent de point de départ à la polymérisation (Higgs and Pollard 2001). La polymérisation des filaments d'actine va induire la formation de pseudopodes se réunissant en une coupe phagocytaire (Flannagan et al. 2012).

Chez l'huître *C. gigas*, une étude transcriptomique menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes d'huîtres a permis de mettre en évidence la surexpression des gènes codant l'actine A mais les protéines adaptatrices et régulatrices n'ont pas été identifiées à ce jour (de Lorgeril et al. 2011).

Le remodelage du cytosquelette d'actine semble également être primordial à la phagocytose chez les amibes. En effet, il a été montré que l'utilisation de cytochalasine D, qui est un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, bloque complètement la phagocytose chez *Acanthamoeba castellanii* (Alsam et al. 2005). Des protéines du complexe Arp2/3 ont été purifiées à partir d'amibes des genres *Acanthamoeba* (Mullins, Heuser and Pollard 1998) et *Dictyostelium* (Jung et al. 2001). Chez ces 2 genres amibiens, ce complexe se lie aux extrémités des filaments d'actine avec une haute affinité et permet leur polymérisation, conduisant à la formation de pseudopodes (Mullins et al. 1998, Clarke et al. 2010). Des protéines potentiellement activatrices du complexe Arp2/3, de la famille WASP ont également été identifiées chez *Dictyostelium* (Han et al. 2006).

#### II.2.4 Le rôle des myosines

Des myosines de classes I, II, V, IX et X ont été retrouvées au niveau des coupes phagocytaires de macrophages humains (Diakonova, Bokoch and Swanson 2002, Cox et al. 2002). Le recrutement de ces différentes myosines se fait de manière séquentielle. Les myosines de classes II et IX semblent avoir un rôle de GAP (GTPase activating protein) sur les petites protéines G de la famille Rho régulant l'actine et ainsi régulant la formation des pseudopodes (Diakonova et al. 2002). Les myosines de classe X se lient au  $PI(3,4,5)P_3$  au niveau de la membrane plasmique et aux filaments d'actine nouvellement générés, ce qui permet un mouvement de la membrane plasmique vers les extrémités barbues des filaments d'actine et ainsi l'élongation des pseudopodes (Cox et al. 2002). Les myosines de classe I semblent être impliquées dans la fermeture de la coupe phagocytaire pour former une vacuole de phagocytose (Diakonova et al. 2002). Cette fermeture de la coupe phagocytaire est dépendante de l'activité de la PI3-K. La PI 3-K est notamment connue pour son implication dans

l'activation des petites GTPases des familles Rac et Rho régulant le cytosquelette d'actine (Diakonova et al. 2002 , Bae et al. 2011 , Delorme-Walker et al. 2011).

Chez l'huître *C. gigas*, la surexpression de gènes codant diverses classes de myosines a été mise en évidence par une étude transcriptomique menée après une infection par des *Vibrio* pathogènes (de Lorgeril et al. 2011). Cependant, l'implication de ces protéines dans la phagocytose n'a pas été démontrée.

Différentes formes de myosines ont également été associées à la coupe phagocytaire des amibes *Dictyostelium discoideum* et *Acanthamoeba castellanii*. Les myosines de classes I (Schwarz et al. 2000) et VII (Titus 1999) semblent être particulièrement impliquées dans la phagocytose développée par ces amibes, leurs délétions réduisant significativement ce processus cellulaire (Titus 1999 , Schwarz et al. 2000 , Cox et al. 2002).

## II.3 La maturation du phagosome

La fermeture de la coupe phagocytaire se fait par la fusion des pseudopodes et de la membrane plasmique au sommet de ces protrusions, ce qui entraîne la formation d'une vésicule intracellulaire contenant la particule phagocytée. Cette nouvelle vésicule appelée phagosome va alors subir une maturation qui a pour but de produire un environnement microbicide. Cette maturation se fait par échange de composants membranaires et luminaux entre le phagosome et d'autres organites tels que les endosomes et lysosomes. Si l'étape d'internalisation est très conservée des amibes aux vertébrés, la maturation du phagosome chez l'amibe semble se faire dans un ordre différent de celle des métazoaires.

### II.3.1 La maturation du phagosome chez les métazoaires

Chez l'humain, les effecteurs moléculaires permettant et régulant la maturation du phagosome ont été décrits pour chaque étape. Chez *C. gigas* si les étapes semblent être similaires à l'humain, tous les effecteurs n'ont pas été identifiés à ce jour. Les étapes de la maturation sont : le phagosome précoce ([Figure 8](#)) qui résulte de la fusion du phagosome naissant avec un endosome précoce, le phagosome intermédiaire ([Figure 8](#)) qui résulte de l'excision d'un corps multivésiculaire à partir du phagosome précoce, le phagosome tardif ([Figure 8](#)) provenant de la fusion du phagosome intermédiaire avec un endosome tardif et le phagolysosome ([Figure 8](#)) provenant de la fusion du phagosome tardif avec un lysosome. Il n'a pas été déterminé, à ce jour, si la fusion du phagosome avec ces organites est totale ou si elle se fait selon le modèle "kiss and run" (Dudlos et al. 2000). Dans ce modèle, le phagosome interagit de manière transitoire et réversible avec les organites, ce qui permet l'échange de constituants et solutés.



L'acidification du phagosome se fait parallèlement aux différentes étapes de la maturation décrites ci-dessous et est cruciale pour le bon déroulement de la phagocytose. Chez les macrophages humains, le pH du phagosome passe de 5,4 (phagosome précoce) à 4,5 (phagolysosome). Cette acidification se fait grâce l'action de v-ATPases (les ATPases vésiculaires) qui vont permettre l'accumulation de protons H<sup>+</sup> dans le lumen phagosomal (Sun-Wada et al. 2009). Ces v-ATPases vont s'accumuler à la membrane du phagosome au fur et à mesure de sa maturation. L'acidification va créer un environnement hostile à la croissance des micro-organismes internalisés, notamment en permettant l'activation de nombreuses enzymes hydrolytiques telles que les cathepsines D et L (Huynh and Grinstein 2007) et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Winterbourn 2008, DeCoursey 2010). Chez *C. gigas*, une « ATPase H<sup>+</sup> transporting lysosomal protein » a été identifiée (Huvet et al. 2004). De manière intéressante, cette ATPase vacuolaire est surexprimée chez les huîtres survivant à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al. 2011). Ceci suggère donc que cette ATPase a un rôle dans l'élimination des bactéries au cours de la phagocytose. De plus, chez l'huître *C. virginica*, il a été montré que la phagocytose de particules de zymosan entraînait une acidification du phagosome jusqu'à un pH de 3,9 (Beaven and Paynter 1999). Des ATPases doivent donc être présentes également chez cette espèce d'huître. De la même manière, il a été montré qu'une infection de l'huître *S. glomerata* par le parasite *Marteilia sydneyi* entraîne une diminution du pH du phagosome (Kuchel et al. 2010).

### II.3.1.1 Phagosome précoce

La maturation du phagosome commence immédiatement après la formation de la vacuole. Chez l'humain cette maturation est principalement coordonnée par les GTPases de la famille Rab et particulièrement par Rab5 et Rab7 (Dudos et al. 2000 , Stenmark 2009). Rab5 stimule et régule la fusion des phagosomes naissants avec les endosomes précoces (Figure 8) (Dudos et al. 2000, Flannagan et al. 2012). Cette GTPase est nécessaire à la maturation du phagosome, la perturbation de cette protéine pouvant conduire à la formation de phagosomes géants ne possédant pas d'activité microbicide (Dudos et al. 2000).

Rab5 a notamment pour protéines effectrices l'antigène d'endosome précoce EEA1 (early endosomal antigen 1) et le complexe p-150-Vps34 (Figure 8). Le complexe p-150-Vps34 est composé d'une PI3K de classe III nommée mVps34 et de sa sérine/thréonine kinase activatrice p-150. Ce complexe va permettre la production de PI(3)P, dont l'accumulation est nécessaire à l'activation de nombreuses protéines impliquées dans la maturation du phagosome, telles que EEA1 et la NADPH oxydase (Vieira et al. 2001 , Flannagan et al. 2012). Les protéines EEA1 vont interagir directement avec les protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) qui sont des protéines médiant la fusion de membranes (McBride et al. 1999 , Flannagan et al. 2012). La

formation du complexe SNARE va permettre la fusion des membranes et l'échange de composants, ce qui donne naissance au phagosome précoce (Figure 8). Le phagosome précoce exprime alors les protéines Rab5 et leurs protéines effectrices Mon1a/b (Cox et al. 2000 , Flannagan et al. 2012). Le complexe Mon1-Rab5 permet le recrutement d'une protéine permettant de maintenir la petite GTPase Rab7 inactive (liée au GDP) (Kinchen and Ravichandran 2010).

Des petites GTPases de la famille Rab (Rab-like protein 3, Rab6-7, Rab18 et Rab2) ont également été identifiées chez les huîtres *C. gigas* ayant survécu à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al. 2011). Cependant le rôle de ces protéines dans la phagocytose n'a pas été démontré.

#### II.3.1.2 Phagosome intermédiaire

Le phagosome précoce humain va ensuite relarguer les protéines marqueurs de phagosome précoce et les récepteurs ayant permis la reconnaissance des particules à internaliser, tels que EEA1 et les FcRs. Ces protéines vont être mono ou poly-ubiquitinylées (Lee et al. 2005 , Flannagan et al. 2012). Le relarguage de ces protéines ubiquitinylées se fait ensuite grâce à la formation de corps multivésiculaires (Figure 8), suite à l'invagination et au pincement de la membrane du phagosome. Ceci est possible grâce aux complexes ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) - 0, I, II et III formés des groupes de protéines Vsp. L'ATPase Vsp4 va ensuite permettre le désassemblage et le recyclage des complexes ESCRTs. Cette étape est importante pour la maturation du phagosome, il a en effet été montré que la mutation du complexe ESCRT-0 entraîne une rétention des marqueurs précoces et va empêcher le phagosome de s'acidifier et d'acquérir les marqueurs tardifs (Vieira et al. 2004).

#### II.3.1.3 Phagosome tardif

Chez l'humain, le phagosome tardif exprime la petite GTPase Rab7 mais n'exprime plus Rab5 (Figure 8). Cette petite GTPase Rab7 est essentielle pour la suite de la maturation, la fusion phagosome/lysosome étant bloquée en cas d'inhibition de Rab7 (Harrison et al. 2003). Rab7 a pour protéines effectrices RILP "Rab7-interacting lysosomal protein" et ORPL1 "oxysterol-binding protein related protein 1". Une fois activées, ces protéines vont permettre le trafic vésiculaire du phagosome tardif, le long des microtubules. Les phagosomes tardifs vont alors avoir une localisation péri-nucléaire, nécessaire pour la fusion avec les endosomes (Johansson et al. 2007 , Flannagan et al. 2012). Il a été démontré que le recrutement de Rab7 se fait grâce aux protéines LAMP "lysosome-associated membrane proteins" 1 et 2. Les protéines LAMP1 et LAMP2 sont des protéines membranaires fortement exprimées chez les endosomes tardifs et les phagosomes tardifs. Ces protéines LAMPs sont également impliquées dans l'acquisition des fonctions microbicides par le phagosome (Huynh et al. 2007 , Binker et al. 2007 , Flannagan et al. 2012). De la même façon

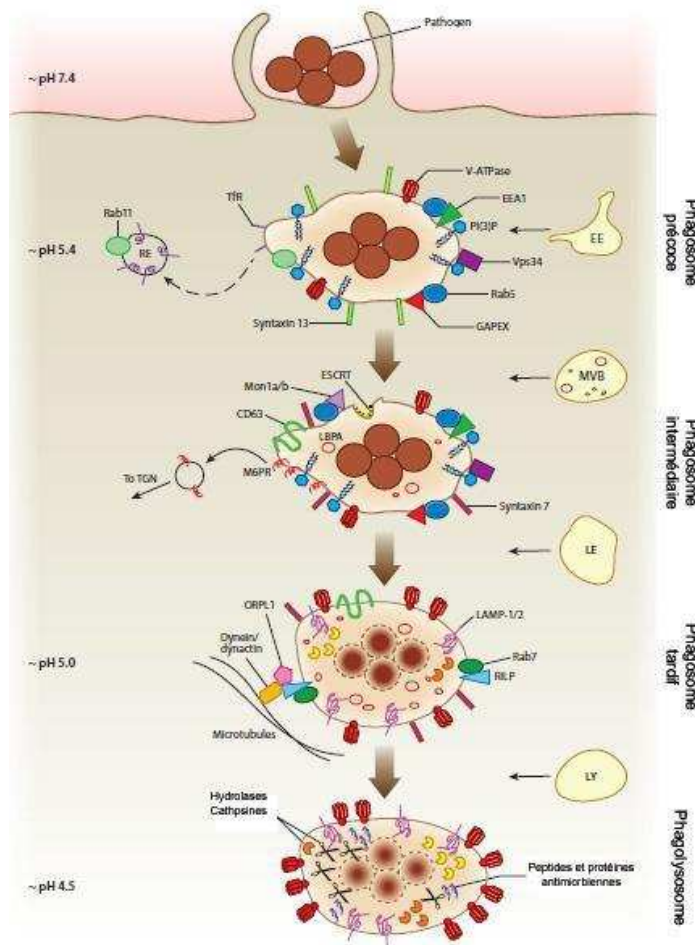
qu'après la fusion avec les endosomes précoces, le recyclage des protéines et la formation de corps multivésiculaires sont nécessaires pour la suite de la maturation du phagosome et impliquent le même type de protéines.

Un gène codant une "lysosome-associated membrane glycoprotein" 1 (homologue de LAMP-1 chez l'humain) a été identifiée chez des huîtres *C. gigas* ayant survécu à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32 (de Lorgeril et al. 2011). Cependant aucune caractérisation fonctionnelle n'a été menée sur cette protéine.

#### II.3.1.4 Phagolysosome

La dernière étape de maturation du phagosome est la fusion avec des lysosomes, nécessaire pour l'acquisition des effecteurs antimicrobiens et hydrolytiques. Ces effecteurs permettent au phagolysosome de dégrader les lipides, protéines et carbohydrates bactériens. Chez l'humain, la fusion phagosome/lysosome est coordonnée par un complexe SNARE formé par la syntaxine 7 et VAMP7 (Flannagan et al. 2012).

Le phagolysosome est caractérisé par son pH acide (4,5) qui permet notamment l'activation d'hydrolases lysosomales telles que des cathepsines. Des peptides antimicrobiens, amenés par la fusion avec les granules cytoplasmiques, sont retrouvés dans le phagolysosome et des espèces réactives de l'oxygène sont produites. La synthèse et/ou le mode d'action de ces effecteurs microbicides sont détaillés dans les sous-chapitres suivants.



**Figure 8.** Maturation du phagosome. Après l'internalisation de particules étrangères, le phagosome subit de nombreuses transformations créant ainsi un environnement microbicide. La maturation du phagosome résulte d'une interaction séquentielle avec les sous-compartiments de la voie d'endocytose. Parmi les stades de maturation du phagosome, on distingue en fonction de leurs propriétés biochimiques : le phagosome précoce, le phagosome intermédiaire, le phagosome tardif et la phagolysosome. Au cours de la maturation, des ATPases situées à la membrane des vésicules (V-ATPases) délivrent des ions  $H^+$  dans le phagosome entraînant ainsi une acidification. Le phagosome s'enrichit également en hydrolases et en protéines antimicrobiennes permettant la dégradation de l'élément étranger. EE: early endosomal, MVB: multivesicular body, LE: late endosome; LY: lysosome. D'après Flannagan et al., 2012.

### II.3.2 La maturation du phagosome chez les amibes

Chez *Dictyostelium*, une étude protéomique menée après infection par *Legionella pneumophila* sur les vacuoles contenant ces bactéries a permis l'identification des petites GTPases Arf1, Rab1, Rab7, Rab8 et Rab14 (Urwyler et al. 2009). Les protéines Rab5 et Rab7 ont également été identifiées chez l'amibe parasitaire *Entamoeba histolytica* où elles jouent un rôle important dans la coordination de la phagocytose, mais à des étapes différentes de celles connues chez l'humain (Saito-Nakano et al. 2004, Verma et al. 2015).

De plus, des analyses protéomiques du phagosome à différentes étapes de maturation, réalisées chez *Dictyostelium discoideum* après phagocytose de billes de latex, ont mis en évidence la présence de protéines de complexe SNARE (telles que VAMP7 et la syntaxine 7) permettant les fusions

membranaires de plusieurs v-ATPases et de cathepsines, en plus des petites GTPases Rab (Gotthardt et al. 2002 , Gotthardt et al. 2006). De nombreuses protéines inconnues, impliquées dans de nombreuses fonctions, ont également été isolées du phagosome (Gotthardt et al. 2006).

Si l'étape d'internalisation est très conservée des amibes aux vertébrés, la maturation du phagosome chez l'amibe semble se faire dans un ordre différent de celle des métazoaires. En effet, chez *Dictyostelium*, le phagosome naissant est tout d'abord associé à la coronine et à des vacuolines A et B (tous les 3 étant des facteurs endosomaux) au niveau de sa membrane puis va rapidement acquérir des v-ATPases et des glycoprotéines lysosomales LmpB (Maniak 2001 , Gotthardt et al. 2002). Dans une seconde étape de maturation, des hydrolases lysosomales telles que la cystéine protéase CP-p34 et des glycoprotéines telles que LmpA, LmpC et CD36 s'accumulent dans le phagosome. Les cathepsines D vont être délivrées dans une phase plus tardive. Trois phases de recyclage sont également observées dans la maturation du phagosome. La première permet l'élimination de LmpB et de la majorité des marqueurs de la membrane plasmique. La deuxième permet le recyclage de CP-p34 principalement. La troisième se fait de manière concomitante à la préparation de l'exocytose des produits de dégradation, et permet le recyclage des composants lysosomaux et phagosomaux. Chez les amibes, la phagocytose va en effet se terminer par l'exocytose des déchets qui subsistent après l'action des enzymes de dégradation (Gotthardt et al. 2002).

### III. LES EFFECTEURS MICROBICIDES DES PHAGOCYTES

Les phagocytes disposent de nombreux effecteurs permettant la dégradation de micro-organismes, que ce soit dans un but nutritif pour les protozoaires ou dans un but de défense de l'organisme pour les métazoaires. A la fin de la maturation du phagosome, ces effecteurs sont présents dans le phagolysosome et sont en contact direct avec les micro-organismes internalisés, permettant alors leur dégradation. Ces effecteurs microbicides comprennent : les espèces réactives d'oxygène et de l'azote, les peptides antimicrobiens, les enzymes hydrolytiques et certains métaux comme le cuivre et le zinc.

#### III.1 Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les productions d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) ont un rôle crucial dans l'activité microbicide des phagocytes. Ces ROS et RNS peuvent avoir des activités extracellulaires mais agissent principalement dans le phagosome. Ces molécules ont des effets microbicides en provoquant l'oxydation des protéines microbiennes, de l'ADN, des lipides et des glucides et en catalysant la destruction des chaînes respiratoires de micro-organismes. (Kohen and Nyska 2002 , Lambeth 2004).

Chez l'humain, la production d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote a été bien documentée (Figure 9). Ces radicaux peuvent être produits par les cellules non-phagocytaires mais également par les phagocytes, notamment suite à la phagocytose. En effet, après l'ingestion de microorganismes, une surproduction de ROS catalysée par la NADPH oxydase, et appelée burst oxydatif, se produit dans le phagosome (Lambeth 2004). Le complexe de la NADPH oxydase, qui s'assemble aux membranes plasmiques et phagosomales suite à l'activation de la cellule, présente une activité enzymatique clé dans la production de ROS. Ce complexe catalyse l'oxydation du NADPH cytosolique par le dioxygène  $O_2$ , ce qui produit du  $NADP^+$  et des ions superoxydes ( $O_2^-$ ). Les ions superoxydes ( $O_2^-$ ) sont des espèces radicalaires hautement réactives et toxiques qui vont s'accumuler dans le lumen du phagosome. Une superoxyde dismutase (SOD) phagosomale permet ensuite la synthèse de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à partir de l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et de protons  $H^+$  (Figure 9). La myéloperoxydase (MPO) permet ensuite la synthèse d'acide hypochloreux (HOCl) à partir de l' $H_2O_2$ , en présence d'ions  $Cl^-$ . Les catalases peuvent également catalyser la détoxification de l' $H_2O_2$  en eau ( $H_2O$ ) et dioxygène ( $O_2$ ) (Imlay and Linn 1988, Fang 2004).

La production de RNS par les phagocytes débute via une oxyde nitrique synthase membranaire (NOS) qui catalyse la formation d'oxyde nitrique (NO). Le NO est très réactif, ce qui va permettre la formation de nombreuses espèces réactives de l'azote, telles que le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) qui provient de l'interaction du NO avec l' $O_2^-$ , les nitrites ( $NO_2^-$ ) provenant de l'oxydation du NO, le nitrosothiol (RSNO) provenant de l'interaction du NO avec des thiols (RSH) portant un groupement cystéine-sulphydryle (Figure 9). Le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) peut spontanément se transformer en acide peroxydinitreux ( $ONOOH$ ) grâce à un proton  $H^+$ . Cet  $ONOOH$  peut ensuite se décomposer notamment en hydroxyle (OH) et/ou en dioxyde d'azote ( $NO_2$ ). L'interaction complexe entre des thiols (RSH), de l' $O_2$  et du NO peut également produire des nitrites ( $NO_2^-$ ) et de l'acide sulphénique (RSOH).

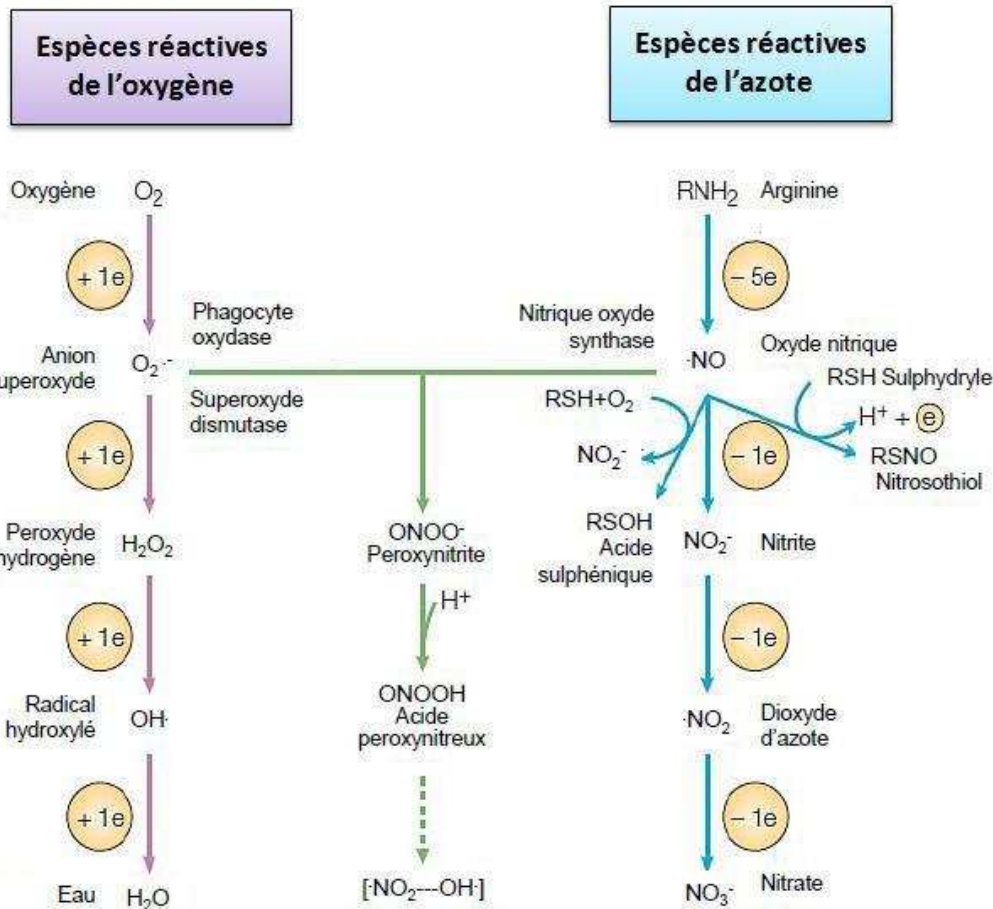


Figure 9. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote chez les mammifères.

Espèces réactives de l'oxygène : Le complexe NADPH oxydase catalyse l'oxydation du NADPH cytosolique par le dioxygène  $O_2$ , ce qui produit du  $NADP^+$  et des ions superoxydes :  $O_2^-$ . Une superoxyde dismutase (SOD) permet ensuite la synthèse de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  à partir de l'ion superoxyde  $O_2^-$  et de protons  $H^+$ . En cas d'ajout de protons  $H^+$ , le peroxyde d'hydrogène peut alors former le radical hydroxylé  $OH\cdot$  et de l'eau  $H_2O$ .

Espèces réactives de l'azote : L'oxyde nitrique (NO) est formé par une oxyde nitrique synthase membranaire à partir d'arginine. Le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) provient de l'interaction du NO avec l' $O_2^-$ , les nitrites ( $NO_2^-$ ) de l'oxydation du NO et le nitrosothiol (RSNO) de l'interaction du NO avec des thiols (RSH) portant un groupement cystéine-sulfhydryle. Le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) peut spontanément se transformer en acide peroxy-nitreux ( $ONOOH$ ) grâce à un proton  $H^+$ . Cet  $ONOOH$  peut ensuite se décomposer notamment en hydroxyle ( $OH\cdot$ ) et/ou en dioxyde d'azote ( $NO_2$ ). L'interaction complexe entre des thiols (RSH), de l' $O_2$  et du NO peut également produire des nitrites ( $NO_2^-$ ) et de l'acide sulphénique (RSOH). Adapté de Fang, 2004.

Chez l'huître, il a été démontré que les hémocytes sont également capables de produire des ROS et RNS (Figure 10). La production basale des ROS (hémocytes non stimulés) se fait par la respiration mitochondriale (Donaghy et al. 2012) (Figure 10). Suite à la phagocytose, notamment de particules de zymosan, un burst oxydatif et une production de RNS ont été observés (Bachere et al. 1990, Delaporte et al. 2003, Lambert et al. 2003, Labreuche et al. 2006b). Le burst oxydatif des hémocytes d'huître est très conservé par rapport à celui décrit chez l'humain et met en jeu une NADPH oxydase

qui produit l'ion  $O_2^-$  à partir de l'oxygène moléculaire, des superoxyde dismutase (SOD) qui convertissent l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et des myéloperoxydases (MPO) aux fonctions détoxifiantes qui convertissent le  $H_2O_2$  en acide hypochlorique (HOCl) en présence d'ion chlorure (Figure 10) (Donaghy et al. 2012). De même, la production de RNS par les hémocytes semble être similaire à celle décrite chez l'humain et débute grâce à une oxyde nitrique synthase membranaire (NOS) produisant du NO à partir de L-arginine. La présence de peroxyde nitrite ( $ONOO^-$ ), formé à partir de NO et d' $O_2^-$ , a également été observée dans les hémocytes (Donaghy et al. 2012).

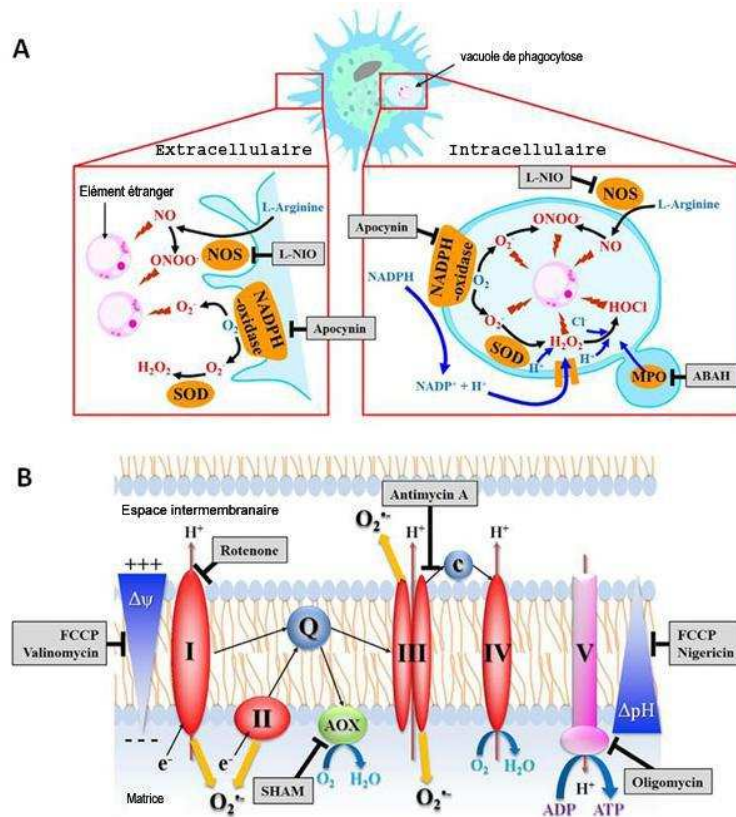


Figure 10. Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote produites chez les hémocytes de bivalves. A. Production des ROS/RNS à la membrane plasmique (droite) et à l'intérieur du phagosome (gauche). B. Chaîne respiratoire mitochondriale hypothétique. Les inhibiteurs des molécules cibles sont indiqués en gris. SOD : superoxyde dismutase, NOS : oxyde nitrique synthase, MPO : myéloperoxydase. D'après Donaghy et al., 2012.

D'après (Fang 2004), chacune des espèces de ROS et de RNS va avoir un mécanisme d'action, une localisation et une activité biologique qui lui sont propres. Des études menées sur *E. coli* ont montré que l' $H_2O_2$  (même à de faibles concentrations) créait rapidement des dommages à l'ADN du micro-organisme (Imlay and Linn 1988), alors que le mécanisme d'action du NO passe par l'inhibition de la respiration bactérienne (Wink et al. 1995).

La production de ROS et RNS constitue donc un mécanisme de l'immunité innée conservé au cours de l'évolution. Cependant, ces molécules peuvent être détoxifiées par certaines bactéries, telles que



*Salmonella enterica* serovar Typhimurium et *M. tuberculosis* qui ont développé des stratégies de vie intracellulaire (Imlay 2013). De plus, une exposition excessive des tissus de l'hôte aux ROS et RNS peut être nuisible et conduire à l'apoptose des cellules hôtes. La production de ces radicaux doit donc être strictement régulée afin qu'ils remplissent leurs fonctions de défense de l'organisme tout en protégeant l'hôte contre tout dommage. Des enzymes anti-oxydantes sont alors produites par l'hôte, comme des superoxyde dismutases (SOD), des peroxydases (catalases et glutathione peroxydases), des peroxyredoxines et des glutathione S-transférases (Vertuani, Angusti and Manfredini 2004). Les principales SODs sont des SODs à cuivre/zinc (Cu/Zn) extracellulaires ou cytosoliques (Tainer et al. 1982) ou des SODs à manganèse (Mn) mitochondriales (Borgstahl et al. 1992).

Chez l'huître, les enzymes antioxydantes les mieux étudiées sont les SODs, la protéine majoritaire du plasma étant une superoxyde dismutase Cu/Zn extracellulaire (EcSOD) (Gonzalez et al. 2005, Scotti, Dearing and Greenwood 2007b, Itoh et al. 2011, Green et al. 2014). Les SODs sont impliquées dans la réparation des lésions et la séquestration du fer en excès (Scotti et al. 2007b), leur rôle dans la réponse anti-oxydante est cependant controversé (Gonzalez et al. 2007a, Scotti, Dearing and Greenwood 2007a). La Cg-EcSOD, protéine majoritaire du plasma de l'huître, est une protéine multifonctionnelle également capable de se lier aux hémocytes via les  $\beta$ -intégrines, d'agir en tant qu'opsonine (Gonzalez et al. 2005, Dupertuy et al. 2011) et présente des activités antivirales (Green et al. 2014).

Deux superoxydes dismutases ont également été identifiées chez les amibes du genre *Acanthamoeba*: une superoxyde dismutase dépendante du fer et une dépendante du cuivre/zinc. Ces SODs ambiennes peuvent agir en tant qu'agents antioxydants et jouent alors un rôle dans la survie amibienne à la fois en les protégeant d'un stress oxydatif endogène et en les protégeant des défenses immunitaires d'éventuels hôtes, ces amibes pouvant être parasites (Lorenzo-Morales et al. 2015).

## III.2 Les métaux dans le phagosome

### III.2.1 L'influx de métaux dans le phagosome

La participation de métaux lourds (cuivre et zinc) dans les défenses immunitaires ainsi que les mécanismes de régulation de leur homéostasie ont récemment été décrits (Soldati and Neyrolles 2012, German, Doyscher and Rensing 2013) (Figure 11). Le zinc semble jouer un rôle essentiel dans l'activité antimicrobienne du NO. En effet, la mobilisation de zinc active des métalloprotéines Zn-dépendantes qui se lient à l'ADN et qui sont des cibles du NO<sup>-</sup> (Schapiro, Libby and Fang 2003). L'accumulation de ces métaux dans les phagosomes a été décrite chez les macrophages allant

internalisé des bactéries. Des études menées sur les macrophages infectés par des espèces *Mycobacterium* ont montré que l'accumulation de zinc et de cuivre dans les phagosomes est induite par les cytokines TNF $\alpha$  et INF $\gamma$ . De plus, le zinc s'accumule au cours du temps suite à une infection par *M. tuberculosis* et est colocalisé avec les bactéries internalisées (Wagner et al. 2005 , Botella et al. 2011). Une accumulation de cuivre dans des vésicules intracellulaires de macrophages a également été montrée suite à une infection par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Achard et al. 2012).

### III.2.1.1 Le cuivre et les macrophages

Dans les systèmes biologiques, le cuivre existe sous deux formes, la forme réduite Cu<sup>+</sup> et la forme oxydée Cu<sup>2+</sup>, utilisées par les enzymes redox en tant qu'accepteurs ou donateurs d'électrons. Dans le phagosome, qui est riche en ROS tels que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le cuivre Cu<sup>+</sup> peut permettre de former des radicaux hydroxyles toxiques par la chimie de Fenton. Ces métaux sont également essentiels aux SODs Cu/Zn qui catalysent la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

La concentration cellulaire en cuivre est régulée par des transporteurs et des protéines de liaison au cuivre (Stafford et al. 2013). Les principaux transporteurs de cuivre sont les protéines Ctr (Copper transport protein) incluant Ctr1 et Ctr2, localisées à la membrane plasmique et à la membrane des vésicules intracellulaires telles que les endosomes et lysosomes (Figure 11) (Bertinato et al. 2008). Les métallo-réductases Ctr transportent le cuivre sous la forme Cu<sup>+</sup>, de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme et éventuellement jusqu'aux endosomes (Klomp et al. 2002 , Petris et al. 2003). Les ATPases, ATP7A et les ATP7B, localisées également au niveau des membranes plasmiques et vésiculaires (Figure 11), transportent activement le cuivre en utilisant l'hydrolyse de l'ATP (Linz and Lutsenko 2007 , Lutsenko et al. 2008). Les protéines chaperonnes ATOX, CCS et Cox17 (Figure 11) lient le cuivre et le délivrent respectivement aux ATP7A, aux SODs à cuivre/zinc du cytosol et aux mitochondries (Gabbiani et al. 2012 , German et al. 2013).

### III.2.1.2 Le zinc et les macrophages

La concentration cellulaire en zinc est régulée par des métallothionéines et des transporteurs de zinc dont les 2 principales familles sont les exporteurs de zinc, SLC30A (ZnT) et les importeurs de zinc, SLC39A (Zip) (Figure 11) (Lichten and Cousins 2009 , Botella et al. 2011 , Botella et al. 2012 , German et al. 2013). Les exporteurs ZnT transportent le zinc vers l'extérieur des cellules ou vers les vésicules intracellulaires diminuant ainsi sa concentration cytoplasmique. A l'inverse, les importeurs Zip transportent le zinc extracellulaire et/ou vésiculaire vers le cytoplasme. Les transporteurs Zip et ZnT sont membranaires, soit au niveau de la membrane plasmique soit au niveau de la membrane d'organelles intracellulaires telles que les lysosomes et les endosomes (Figure 11). Ces transporteurs

de zinc peuvent alors se retrouver à la membrane du phagosome lors du processus de maturation. Suite à une infection par *M. tuberculosis*, une surexpression du transporteur ZnT1, situé à la membrane des vésicules intracellulaires, a été observée dans les macrophages (Botella et al. 2011).

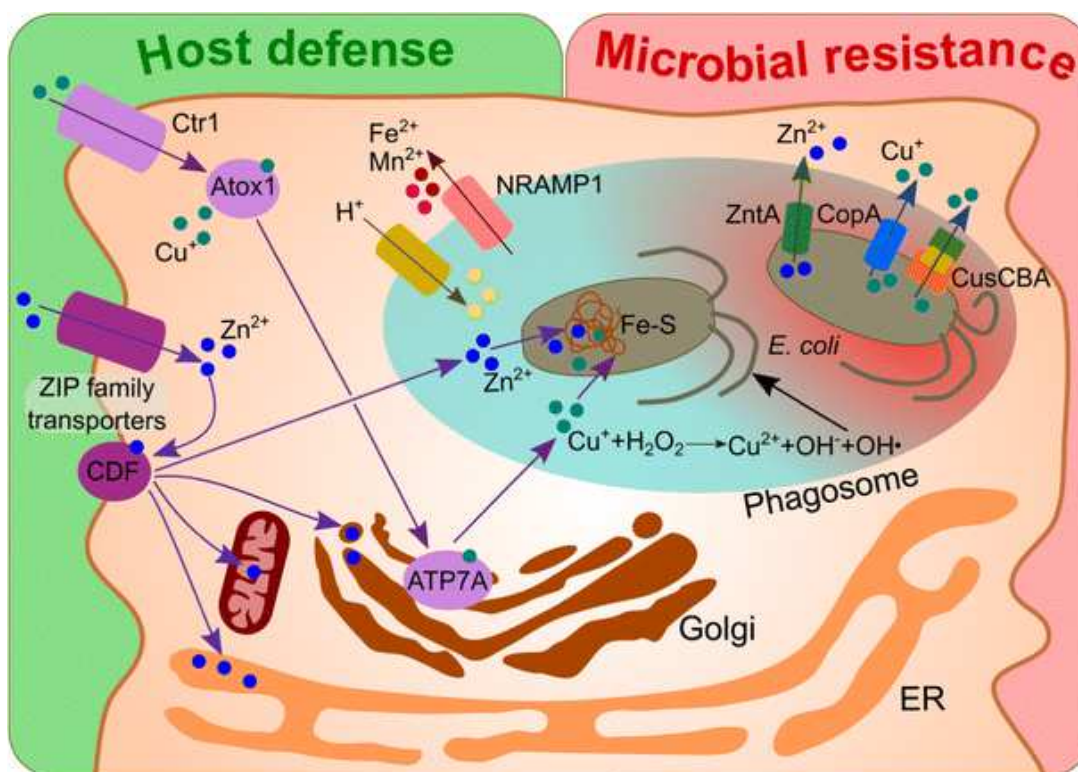


Figure 11. Schéma représentant de l'homéostasie des métaux dans l'activité microbicide du phagosome. Les transporteurs de la famille ZIP permettent l'entrée du  $Zn^{2+}$  dans le cytoplasme. L'entrée de  $Cu^{+}$  dans la cellule et dans le phagosome se font grâce aux transporteurs de cuivre (Ctr1), aux protéines chaperonnes antioxydantes de cuivre (Atox1) et aux ATPases de type ATP7A. Les ATPases provoquent l'acidification du phagosome et les protéines NRAMP1 permettent l'efflux de  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ , qui peuvent permettre la croissance et la reconstruction des bactéries intracellulaires. De plus, le  $Cu^{+}$  amplifie la toxicité des espèces réactives de l'oxygène. En réponse à ces systèmes, *E. coli* exprime des gènes codant pour l'efflux de  $Zn^{2+}$ : ZntA, l'efflux de  $Cu^{+}$ : CopA et le complexe CusCBA.

### III.2.1.3 L'influx de métaux chez *C. gigas*

Chez l'huître creuse *C. gigas*, divers transporteurs de métaux sont exprimés par les hémocytes. On trouve pour le transport du zinc, plusieurs métallothionéines (CgMT1, CgMT2 et CgMT3) et de nombreux transporteurs (Zp et Znt) identifiés *in silico* (Tanguy and Moraga 2001, 2001, Tanguy, Mura and Moraga 2001). Pour le transport du cuivre, des ATPases de type 1 homologues à ATP7A, des transporteurs de cuivre homologues à Ctr1 et une protéine chaperonne ATOX1 ont été retrouvés *in silico* (Wang et al. 2013b).

Or, le cuivre est présent à des concentrations élevées dans l'hémolymph des invertébrés marins. Ainsi chez les crustacés et les mollusques, la principale protéine de l'hémolymph complexe le cuivre, donnant une couleur bleutée à l'hémolymph (van Holde and Miller 1995, van Holde, Miller and Decker 2001). C'est le cas de l'hémocyanine qui assure le transport de l'oxygène chez les crustacés et

certains mollusques. L'huître ne possède pas cette protéine et il est proposé que le transport de l'oxygène se ferait sous forme dissoute dans l'hémolymphe. En revanche, elle possède une superoxyde dismutase extracellulaire à cuivre/zinc qui est la protéine majoritaire du plasma d'huître (Gonzalez et al. 2005). De plus, une étude récente menée chez *C. angulata* a suggéré que la protéine ABCB1 (ATP-binding cassette protein subfamily B member 1) pouvait être impliquée dans l'homéostasie du cuivre. En effet, le transcrite mRNA d'*abcb1* était fortement surexprimé en cas d'exposition au cuivre et une expérience de mRNA interférence a conduit à l'accumulation de cuivre dans les branchies et le manteau de l'huître surexposée à ce métal (Shi et al. 2015).

Ce raisonnement peut également être extrapolé aux écosystèmes marins côtiers, dans lesquels sont cultivés les huîtres, comme les lagunes méditerranéennes exposées aux contaminations chimiques d'origine anthropique, compris aux polluants d'origine industrielle ou agricole. On retrouve ainsi dans l'environnement lagunaire des métaux lourds tels que du mercure, du cadmium, du plomb, du cuivre et du zinc. De plus, plusieurs études ont montré que les huîtres *C. gigas* accumulent fortement le cuivre et zinc présents dans l'environnement. Les huîtres sur-expriment des métallothionéines qui lient ces métaux et qui participeraient à leur stockage dans des granules (Amiard et al. 2008).

#### III.2.1.4 L'influx de métaux chez les amibes

Deux revues récentes posent l'hypothèse que (i) comme cela a été observé chez les métazoaires, les amibes peuvent éliminer les bactéries grâce à des mécanismes d'influx de cuivre et de zinc et que (ii) les mécanismes bactériens de résistance au cuivre sont sélectionnés dans l'environnement par la prédation exercée par les protistes (German et al. 2013 , Hao et al. 2015). Cette hypothèse est supportée par le fait que les amibes possèdent des systèmes d'influx de cuivre homologues similaires à ceux des cellules immunitaires de métazoaires où ils sont impliqués dans l'influx de cuivre dans le phagosome (Davies, Chattings and Edwards 1991 , Burlando et al. 2002 , German et al. 2013 , Hao et al. 2015). Les amibes contiennent en effet des homologues de transporteurs de cuivre *Ctr1*, d'ATPases de type P et de métallothionéines retrouvés chez les macrophages mais également chez les hémocytes de *C. gigas* (Burlando et al. 2002 Wang, 2013 #3098 , German et al. 2013 , Hao et al. 2015). De plus, certaines bactéries résistantes à la fois aux amibes et aux macrophages, telles que *Salmonella* spp. et des souches virulentes d'*E. coli*, possèdent des systèmes d'efflux de cuivre comme les ATPases de type P *CopA* (Outten et al. 2001 , Espariz et al. 2007, Sillo et al. 2011 , Chekabab et al. 2013).

### III.2.2. L'efflux de métaux du phagosome

#### III.2.2.1 L'efflux de métaux chez l'humain et chez l'huître

Si l'activité antimicrobienne du cuivre et du zinc a été démontrée, il a également été montré que le fer et le manganèse sont nécessaires à la croissance de pathogènes intracellulaires. Dans un mécanisme de défense immunitaire, au cours de la phagocytose, la cellule hôte va diminuer la concentration en fer et manganèse dans le phagosome grâce aux protéines de type NRAMP (natural resistance associated macrophage protein) (Figure 11) (Forbes and Gros 2001, Cellier, Courville and Campion 2007), aux calprotectines (Damo et al. 2013) et aux ferroportines (Madejczyk and Ballatori 2012). Les transporteurs NRAMP permettent de diminuer la concentration à la fois de  $Fe^{2+}$  et de  $Mn^{2+}$  dans le phagosome (Jabado et al. 2000). La protéine NRAMP1 est localisée au niveau de la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes et va pouvoir se retrouver au niveau de la membrane du phagosome lors du processus de maturation (Gruenheid et al. 1997, Jabado et al. 2000, Courville, Chaloupka and Cellier 2006). Cette protéine NRAMP1 a en effet été retrouvée au niveau de la membrane des phagosomes suite à l'internalisation de pathogènes intracellulaires tels que des bactéries des genres *Salmonella*, *Leishmania*, *Mycobacterium avium* et *Yersinia* (Searle et al. 1998, Govoni et al. 1999). Les calprotectines lient le  $Mn^{2+}$  avec une haute affinité et le séquestrent. Cette séquestration du  $Mn^{2+}$  permet aux calprotectines d'exercer une activité antimicrobienne indirecte sur plusieurs espèces de *Staphylococcus*, sur *Enterococcus faecalis* mais aussi sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* et *E. coli* (Damo et al. 2013). L'activité de ces protéines sur *S. aureus* passe notamment par l'inhibition des SODs bactériennes qui sont dépendantes du Mn (Damo et al. 2013). Les ferroportines sont bien connues pour leur rôle dans l'efflux du  $Fe^{2+}$  et récemment, leur rôle dans l'efflux du  $Mn^{2+}$  a également été démontré (Madejczyk and Ballatori 2012). Il a également été récemment démontré que des protéines régulatrices de fer : IRPs (Iron regulation proteins), contrôlant l'expression de transporteurs de manière post-transcriptionnelle, étaient nécessaires pour la résistance des macrophages à *Salmonella Typhimurium* (Nairz et al. 2015). Ces IRPs vont notamment induire l'expression de la lipodine 2, qui est un facteur de l'hôte inhibant la synthèse bactérienne de sidérophores, et vont inhiber l'expression des ferritines permettant le stockage du fer (Nairz et al. 2015).

Chez l'huître *C. gigas*, un transporteur de métaux divalents homologue à NRAMP1 a été identifié dans le génome (Wang et al. 2013b). Plusieurs gènes codant les ferritines ont également été identifiés chez *C. gigas*, 3 de ces gènes étant tissus-spécifiques et 1 étant un gène de ménage (Huan et al. 2014). Il a été suggéré suite à une étude menée chez l'échinoderme *Asterias forbesi* que le rôle de séquestration du fer par la ferritine est important dans la réponse immunitaire des invertébrés (Beck et al. 2002).

### II.2.2.2 L'efflux de métaux chez les amibes

Chez *Dictyostelium*, l'homéostasie du fer est également impliquée dans la résistance aux bactéries intracellulaires. De nombreux gènes régulant la concentration en fer ont été identifiés dans le génome de *Dictyostelium* et notamment des gènes codant des transporteurs Nramp : Nramp1 et Nramp2 (Bozzaro, Buracco and Peracino 2013 , Peracino, Buracco and Bozzaro 2013, Buracco et al. 2015). Comme chez l'humain, le transporteur Nramp1 est présent au niveau de la membrane des endosomes et lysosomes et in fine des phagosomes, mais également au niveau de la membrane des macropinosomes. Le transporteur Nramp2 est localisé au niveau de la membrane de la vacuole pulsatile amibienne (Bozzaro et al. 2013 , Peracino et al. 2013, Buracco et al. 2015). Le transporteur Nramp1 joue un rôle important dans la résistance de *Dictyostelium* aux infections bactériennes. En effet, une mutation délétère du gène Nramp1 rend l'amibe sensible aux infections bactériennes et particulièrement aux pathogènes des genres *Legionella* et *Mycobacteria* (Bozzaro et al. 2013 , Buracco et al. 2015). Une étude plus récente a montré que, comme chez l'humain, ce transporteur NRAMP1 participe également à l'efflux de  $Mn^{2+}$  vers le cytoplasme (Buracco et al. 2015).

## III.3 Les enzymes hydrolytiques

Pendant la maturation du phagosome, la vésicule de phagocytose contenant les micro-organismes fusionne avec les lysosomes. Les lysosomes sont caractérisés par leur pH acide et la présence d'une grande variété d'hydrolases acides. L'action conjointe d'une cinquantaine de ces hydrolases lysosomales confère au phagosome sa grande capacité de dégradation des micro-organismes. Ces enzymes comprennent des protéases, des lipases, des nucléases, des glycosidases et des phosphatases qui peuvent permettre la destruction des structures bactériennes (Bachali et al. 2002 , Flannagan et al. 2012).

### III.3.1 Les lysozymes

Les lysozymes sont les principales glycosidases contenues dans les lysosomes de macrophages humains. Les lysozymes ont une activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram-positif en hydrolysant les liaisons  $\beta(1-4)$  glycosidiques existant entre les composants structuraux du peptidoglycane. Ces enzymes n'ont pas d'activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram-négatif, du fait de leur membrane externe protégeant le peptidoglycane (Flannagan et al. 2012).

Comme chez l'humain, il a été montré chez l'huître *C. gigas* que les lysozymes sont exprimés par de nombreux tissus, incluant les hémocytes (Cg-L-1 ou Cg-lyzol) mais aussi les épithelia comme la glande digestive (Cg-L- 2 ou Cg-lysoz2) et le manteau (Cg-L-3 ou Cg-lysoz3) (Matsumoto, Nakamura and Takahashi 2006 , Itoh and Takahashi 2007 , Itoh et al. 2010 , Xue et al. 2010). Les lysozymes Cg-L-1

(exprimé par les hémocytes) et CgL-3 (exprimé dans le manteau) sont actifs contre des bactéries à Gram positif (Itoh et al. 2010).

### III.3.2 Les protéases et les inhibiteurs de protéases

Les principales protéases lysosomales humaines sont les cathepsines. Cette famille de protéases contient des protéases à sérine, des aspartate protéases et des protéases à cystéine. Les cathepsines G sont des protéases à sérine bien connues pour leur activité antimicrobienne. De plus, il a été démontré que les cathepsines sont impliquées dans l'activation et le turn-over des peptides antimicrobiens (Andrault et al. 2015).

Chez l'huître *C. gigas*, des protéases et des inhibiteurs de protéases sont produits par les hémocytes. Ces protéases et inhibiteurs de protéases peuvent participer à de nombreuses réactions immunitaires notamment en régulant les cascades de signalisation endogènes (Hibbetts, Hines and Williams 1999). Les inhibiteurs de protéases peuvent inactiver les protéases sécrétées par certains agents infectieux (Armstrong 2006). De nombreuses séquences codant des inhibiteurs de protéases tels que des serpins, des inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) et des  $\alpha$ 2-macroglobulines (Montagnani et al. 2001, Gueguen et al. 2003, Roberts et al. 2009) ont été identifiées chez *C. gigas*. L'expression de l'inhibiteur de protéase Cg-Timp, retrouvé uniquement dans les hémocytes, est modulée suite à des dommages faits à la coquille ou suite à une infection bactérienne (Montagnani et al. 2001, Montagnani et al. 2007).

### III.3.3 Les hydrolases amibiennes

Chez l'amibe parasitaire *Entamoeba histolytica*, deux enzymes lysozymes-like exprimées constitutivement ont été identifiées. Ces enzymes stockées, dans des granules intracellulaires, semblent être impliquées dans la défense des amibes contre des bactéries intracellulaires (Andra, Herbst and Leippe 2003). Des hydrolases putatives ont également été identifiées chez *Dictyostelium discoideum*. Ces hydrolases comprennent des lysozymes (alyA, alyB, alyC and alyD), des glycosidases et des endopeptidases qui semblent être impliquées dans la dégradation du peptidoglycane des bactéries à Gram positif, les gènes codant ces protéines étant surexprimés suite à une infection à bactéries à Gram positif. Une autre protéine lysozyme-like (alyL) et une protéase à cystéine (cprF) ont également été identifiées chez *D. discoideum*, suite à une infection à bactéries à Gram négatif (Nasser et al. 2013).

### III.4 Les protéines et peptides antimicrobiens

Les phagocytes peuvent utiliser les peptides antimicrobiens (AMPs) pour tuer les micro-organismes qui ont été phagocytés. Il existe deux grandes classes d'AMPs : les AMPs conventionnels et non-

conventionnels, très largement conservés dans le règne vivant. Les AMPs conventionnels se réfèrent à des petits peptides cationiques souvent amphipathiques. Les peptides antimicrobiens non conventionnels se réfèrent à des molécules ayant habituellement un rôle de maintien structurel ou une implication dans les voies de signalisation et qui présentent également de puissantes activités antimicrobiennes (Hirsch 1958 , Smith and Dyrinda 2015).

### III.4.1 Les AMPs conventionnels des métazoaires

Les AMPs sont généralement de petits peptides cationiques et amphiphiles, considérés comme des molécules antimicrobiennes professionnelles. Ils sont généralement retrouvés dans les cellules du sang périphérique ou épithéliales de surface. Il existe au moins trois classes principales d'AMPs conventionnels basées sur leur structure secondaire: les peptides linéaires  $\alpha$ -hélicoïdaux, les peptides riches en cystéine, contenant des feuilletts  $\beta$  et des ponts disulfure, et les peptides enrichis en un acide aminé donné (Brogden 2005). L'action des AMPs repose dans de nombreux cas sur l'interaction du peptide avec les membranes bactériennes, dans lesquelles ils forment des pores (Brogden 2005). Ces interactions se font généralement via des interactions électrostatiques avec les membranes chargées négativement des microorganismes. Cette charge peut être conférée par les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif ou les acides teichoïques des bactéries à Gram positif (Bulet, Stocklin and Menin 2004). Les AMPs vont ensuite souvent s'insérer dans la bicouche lipidique membranaire causant une altération pouvant être à l'origine de l'activité antimicrobienne (Brogden 2005).

Les AMPs peuvent avoir d'autres mécanismes d'action induisant l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, l'inhibition de la synthèse de protéines ou d'acides nucléiques, l'inhibition d'activités enzymatiques et la liaison aux protéines de choc thermique et aux protéines chaperonnes, ce qui empêche la réparation ou l'élimination des protéines mal repliées et endommagées (Brotz et al. 1998, Park, Kim and Kim 1998 Kragol, 2001 #2170 , Patrzykat et al. 2002 , Srinivasan et al. 2010 , Wilmes et al. 2011). Les AMPs peuvent agir en synergie en combinant leurs mécanismes d'action pour combattre les bactéries pathogènes (Schmitt et al. 2012).

Les phagocytes humains, en particulier les polynucléaires neutrophiles et dans une moindre mesure les macrophages, sont connus pour exprimer une grande diversité d'AMPs (Tableau 2). Les neutrophiles expriment notamment des  $\alpha$ -défensines et de la cathélicidine LL-37 (Tableau 2), stockées dans des granules azurophiles qui fusionnent avec le phagolysosome lors de la maturation du phagosome (Ganz 2003). Les neutrophiles expriment également une protéine antimicrobienne appelée Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) (Tableau 2) (Weiss and Olsson 1987 , Calafat et al. 1998 , Levy et al. 2003). Les macrophages expriment des  $\alpha$ -défensines et la cathélicidine



LL-37, en plus faible quantité que les neutrophiles, mais également de l'hepcidine (Tableau 2) (Liu and Modlin 2008).

Chez l'huître *C. gigas*, diverses familles de peptides antimicrobiens (Tableau 2) ont été identifiées et notamment des défensines, des big-défensines, des peptides riche en proline, une Cg-molluscidine récemment identifiée, ainsi que deux protéines antimicrobiennes, Cg-BPI (bacterial/permeability-increased protein) et Cg-Mepg1 (macrophage expressed gene 1-like) (Tableau 2) (Gonzalez et al. 2007b, He, Zhang and Yu 2011, Zhang et al. 2011, Seo et al. 2013). Cg-BPI est une grosse protéine antimicrobienne stockée dans de larges vacuoles cytoplasmiques. Active uniquement sur les bactéries à Gram négatif, Cg-BPI est capable de se lier au LPS et de perméabiliser des bactéries (Gonzalez et al. 2007b). Cg-Mepg1 (macrophage expressed gene 1-like) appartient à la superfamille des perforines et se révèle peu active contre les bactéries à Gram négatif et positif (He et al. 2011). Le peptide riche en proline Cg-Prp présente une faible activité antimicrobienne et agit essentiellement en synergie avec les défensines (Gueguen et al. 2009). Les défensines Cg-Defh1 et 2, produites par les hémocytes, présentent des activités antimicrobiennes contre les bactéries à Gram positif grâce à l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane (Schmitt et al. 2010). La Cg-Molluscidine est active contre les bactéries à Gram négatif et positif (Seo et al. 2013). Enfin les big-défensines ont un mécanisme d'action encore inconnu (Rosa et al. 2011). Il a cependant été montré que les big-défensines de limule (*Tachypleus tridentatus*) étaient stockées dans des granules hémocytaires et exerçaient une activité antimicrobienne sur les bactéries à Gram positif, à Gram négatif et sur les levures (Iwanaga, Kawabata and Muta 1998)

L'expression de Cg-BPI, de Cg-Mepg1 et des big-défensines 1 et 2 est régulée dans les hémocytes circulants après une infection bactérienne mais l'expression des défensines est quant à elle constitutive (Gonzalez et al. 2007b, He et al. 2011, Rosa et al. 2011).

Tous les AMPs de l'huître ont été caractérisés à partir de formes synthétiques ou recombinantes. En effet, ils n'ont pas pu être purifiés à partir des tissus de *C. gigas* en quantités suffisantes pour pouvoir être étudiés sous forme native. L'immunolocalisation des AMPs d'huître a permis de montrer leur expression au niveau de diverses cellules épithéliales (branchies, manteau) et leur stockage dans les granules cytoplasmiques de certaines populations hémocytaires appelées granulocytes. La structure, les fonctions de phagocytose et l'infiltration des granulocytes rappellent les neutrophiles humains.

### III.4.2 Les AMPs non conventionnels des métazoaires

Il existe également des AMPs dits non conventionnels qui ont des motifs structuraux conservés au cours de l'évolution. Ces peptides antimicrobiens dérivent de la protéolyse des histones, des acides gras libres dérivés de la membrane, des oxylipines, des pigments respiratoires (tels que

l'hémocyanine), des neuropeptides, des lectines, des molécules de liaison au LPS et des toxines formant des pores présentes chez certaines espèces marines. Les histones sont des protéines généralement nucléaires, formant un core protéique autour de l'ADN. Les histones ont un rôle architectural essentiel mais leurs modifications post-traductionnelles jouent également un rôle clé dans la régulation génétique. Cependant, en plus de cette activité nucléaire les histones ont également des activités antimicrobiennes lorsqu'elles sont extracellulaires. Depuis 1942, le rôle antimicrobien des histones chez les vertébrés, et notamment chez l'humain, a été décrit dans la littérature (Miller et al., 1942). Les histones font partie des polypeptides antimicrobiens non conventionnels les plus fréquents. L'activité antimicrobienne des histones chez l'humain a été associée à l'histone H1 dans les cellules épithéliales intestinales, l'histone H2A dans le placenta et l'histone H1A dans les granulocytes. L'histone H2B présente également une activité antimicrobienne dans les macrophages murins, les ovaires de poulet et la peau des grenouilles (Seo et al. 2010). Le rôle antimicrobien des histones semble impliquer des processus de perméabilisation puis de pénétration de la membrane bactérienne, suivies par la liaison de ces protéines aux acides ribosomiques bactériens. Ces mécanismes permettent notamment la liaison et la neutralisation de la toxicité du lipopolysaccharide (LPS) ainsi que l'inhibition de la liaison virale (Dorrington, Villamil and Gomez-chiarri 2011). Des protéines homologues aux histones H2B désignées cvH2B (Seo et al. 2010, Seo, Stephenson and Noga 2011) et H4 (Dorrington et al. 2011) ont récemment été isolées à partir de tissus des huîtres américaines *Crassostrea virginica*. La protéine cvH2B extraite des tissus a une activité antimicrobienne importante contre les bactéries Gram-positives telles que les bactéries lactiques mais également contre les pathogènes Gram-négatifs tels que *Vibrio vulnificus* et *Vibrio parahaemolyticus* (Seo et al. 2010, Seo et al. 2011). Les isoformes d'histones H2B présents dans les tissus des huîtres pourraient jouer un rôle important dans la régulation des populations microbiennes commensales et pathogènes (Seo et al. 2011). Au cours d'une autre étude, la séquence de l'histone H4 a été identifiée dans une banque de gènes surexprimés chez *Crassostrea virginica* en cas d'infection par le parasite protozoaire *Perkinsus marinus*. Cette découverte laissant penser que l'histone H4 est impliquée dans la défense immunitaire de l'huître, les auteurs se sont intéressés à la présence de cette protéine dans l'hémolymph de *Crassostrea virginica*. L'histone H4 a pu être isolée à partir de lysats d'hémocytes et d'hémolymph extracellulaire. L'histone H4 a donc, au même titre que l'histone H2B, une activité antimicrobienne qui pourrait être impliquée dans la défense immunitaire de l'huître (Dorrington et al. 2011).

### III.4.3 Les peptides antimicrobiens chez les amibes

Les premiers peptides antimicrobiens identifiés chez les amibes sont appelés amoebapores (Andra et al. 2003). Ces amoebapores (Tableau 2) ont été retrouvés dans des phagosomes d'*Entamoeba*

*histolytica* ayant internalisé des bactéries. Des isoformes purifiés des amoebapores ont montré des activités antimicrobiennes puissantes in vitro sur les bactéries à Gram positif. Des expériences de microscopie électronique et d'immunogold menées sur des amibes en cours de phagocytose ont montré que les bactéries contenues dans les phagosomes étaient recouvertes de molécules d'amoebapores et que certaines de ces bactéries étaient désintégrées (Andra et al. 2003). Lorsque les amibes ne sont pas en cours de phagocytose, les amoebapores sont stockées dans des granules lysosomes-like. Au cours de la phagocytose, les granules lysosomes-like fusionnent avec la vacuole de phagocytose contenant les bactéries, ce qui permet au phagosome d'avoir une action antimicrobienne. Au-delà des amoebapores, ces granules contiennent des lysozymes agissant en synergie avec les peptides antimicrobiens (Andra et al. 2003). *E. histolytica* étant une amibe parasitaire, les amoebapores semblent également être impliquées dans l'activité cytolitique nécessaire à l'invasion de l'hôte (Andra et al. 2003).

Récemment, des acanthaporines (Tableau 2) ont également été identifiées à partir d'amibes du genre *Acanthamoeba*. De la même manière que les amoebapores, les acanthaporines sont des molécules présentant une activité antimicrobienne et une activité cytolitique grâce à la formation de pores dans les membranes. Les acanthaporines exercent une activité antimicrobienne sur une grande diversité d'espèces bactériennes mais ont également une activité cytolitique sur les neurones humains. Il a également été montré que ces molécules sont activées de manière dépendante du pH (modifications des résidus histidine) et vont alors former des dimères (Michalek et al. 2013).

Tableau 2. AMPs exprimés par les phagocytes

Espèces	AMPs	Exemples	Phagocytes	Références
Homo sapiens	Defensines	HNP-1/-2/-3/-4	Neutrophiles	(Ganz 2004)
	Defensines	hBD-1/-2	Macrophages, Cellules dendritiques	(Duits et al. 2002) (Liu and Modlin 2008)
	Cathélicidines	LL-37	Neutrophiles	(Sorensen et al. 1997) (Agerberth et al. 2000)
	Liver-expressed antimicrobial peptides (LEAPs)	Hepcidine	Granulocytes Macrophages	(Knutson et al. 2005) (Sow et al. 2007)
	Bactericidal-permeability increasing protéines	BPI	Neutrophiles, (Eosinophiles/dans une moindre mesure)	(Weiss and Olsson 1987) (Calafat et al. 1998) (Levy et al. 2003)
Crassostrea gigas	CS-Defensines	Cg-Defh-1/h2	Hémocytes	(Schmitt et al. 2012)
	Big-defensines	Cg-big-defensin-1/-2/-3 (contient un motif defensine)	Hémocytes	(Rosa et al. 2011)
	Peptides riches en Proline	Cg-Prp	Hémocytes	(Schmitt et al. 2012)
	Bactericidal-permeability increasing protéines	Cg-BPI	Hémocytes	(Schmitt et al. 2012) (Gonzalez et al. 2007b)
	Molluscidines	Cg-molluscidine	Hémocytes	(Seo, et al. 2013)
Acanthamoeba castellanii	Acanthaporines		Acanthamoeba	(Michalek et al. 2013)
Entamoeba histolytica	Amoebapores		E. histolytica	(Andra et al. 2003)

## IV. LES PIÈGES D'ADN EXTRACELLULAIRES

La phagocytose est un processus cellulaire développé par les phagocytes qui est connu depuis plus d'un siècle. Depuis une dizaine d'années, un nouveau mécanisme de défense cellulaire développé par les phagocytes a été étudié : la formation de structures fibreuses extracellulaires appelées pièges d'ADN extracellulaire ou ETs. Ce nouveau mécanisme cellulaire a été mis en évidence pour la première fois en 2004 et a été observé à partir de polynucléaires neutrophiles (Brinkmann et al. 2004). La formation de ces ETs correspond à la libération de chromatine nucléaire décondensée et de protéines antimicrobiennes granulaires et cytoplasmiques dans l'espace extracellulaire, en réponse à divers stimuli tels des bactéries Gram-positives et Gram-négatives, des champignons et des parasites qu'ils sont capables de piéger (Figure 12) (Brinkmann et al. 2004 , Papayannopoulos and Zychlinsky 2009 , Altincicek et al. 2008 , Remijsen et al. 2011a , Amulic and Hayes 2011). Une étude récente a également démontré la formation d'ETs par les polynucléaires neutrophiles in vivo, au cours d'infections à *S aureus* de la peau (modèle souris), par microscopie intravivale (Yipp et al. 2012).

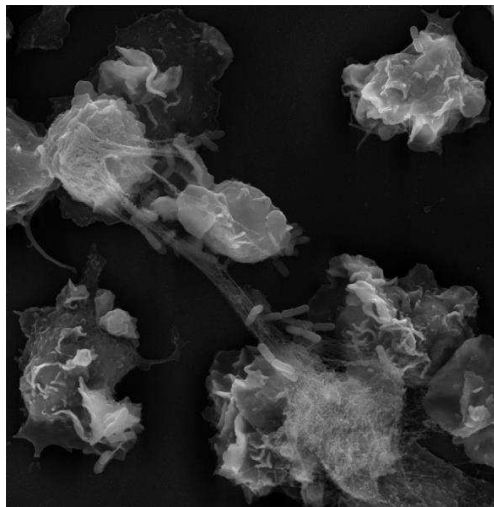


Figure 12. Observation par microscopie électronique à balayage de *Shigella flexneri* piégée dans un NET. Image prise par Volker Brinkmann (Amulic et Hayes, 2011).

Alors que les ETs ont été très étudiés chez les vertébrés pendant la dernière décennie, peu d'études ont été réalisées chez les invertébrés. Seule une étude réalisée en 2008 a suggéré que les acides nucléiques extracellulaires pouvaient avoir un rôle dans la réponse immunitaire de la chenille *Galleria mellonella* (Altincicek et al. 2008). Les auteurs ont en effet démontré que l'injection d'acides nucléiques dans le corps de l'insecte induisait la production de molécules antimicrobiennes, la coagulation de l'hémolymphe, l'activation des cellules immunocompétentes et conférait une protection contre la bactérie entomopathogène *Photobacterium luminescens*. De plus, des

observations microscopiques de la coagulation de l'hémolymphe ont révélé que les oenocytoides (5–10% des hemocytes totaux) sont une source potentielle d'acides nucléiques extracellulaires (Altincicek et al. 2008). Les paragraphes suivants porteront donc sur la description de la composition, de la formation et du rôle antimicrobien de ces structures uniquement chez les vertébrés.

## IV.1 La composition des NETs

Une analyse par microscopie à balayage haute résolution des NETs a permis d'observer la présence de structures lisses de 15 nm de diamètre et de domaines globulaires de 25 nm, s'agrégeant en de plus grandes structures filaires d'environ 50 nm (Figure 13). Une analyse par immunofluorescence de la composition protéique des NETs a ensuite permis de mettre en évidence la présence de protéines provenant de granules primaires (azurophiles), secondaires et tertiaires telles que la lactoferrine et la gélatinase, l'élastase neutrophile, la cathepsine G, et la myéloperoxydase à l'intérieur des NETs (Brinkmann et al. 2004). Le composant structural principal des NETs est l'ADN, un traitement à la DNase permettant la dégradation de ces structures extracellulaires (Brinkmann et al. 2004). Les NETs contiennent également des histones H1, H2A, H2B, H3 et H4, les histones H2A et H2B formant des complexes avec l'ADN. Les histones et l'élastase neutrophile sont retrouvées dans les domaines globulaires des NETs (Brinkmann et al. 2004).

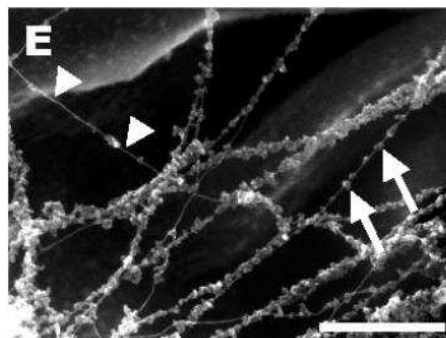
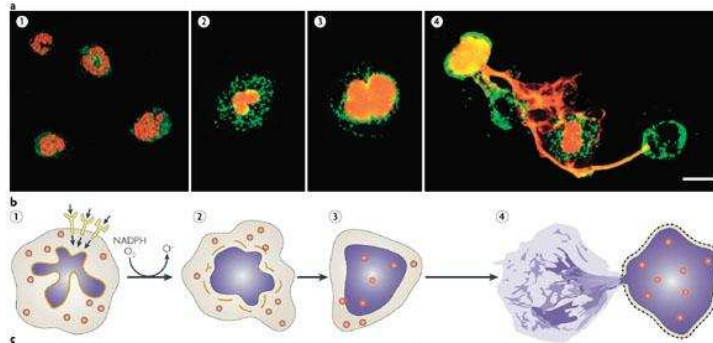


Figure 13. Analyse par microscopie à balayage haute résolution des NETs révélant des structures lisses (d'environ 15 à 17 nm de diamètre) et des domaines globulaires (autour de 25 nm de diamètre). Les domaines s'agrégeant en de plus grandes structures filaires (Brinkmann et al. 2004).

## IV.2 La formation de NETs ou NETose

La formation de NETs se fait à partir de neutrophiles activés en réponse à une variété de stimuli pro-inflammatoires comme le lipopolysaccharide (LPS), l'interleukine 8 (IL8), le phorbol myristate acétate (PMA) et le facteur de nécrose tumorale (TNF). La formation de NETs constitue un nouveau type de mort cellulaire appelé NETose (Brinkmann et al. 2004, Remijsen et al. 2011a). Les neutrophiles activés rentrent dans un programme de mort cellulaire où les membranes nucléaires et granulaires sont dissolues, où les composants nucléaires se décondensent dans le cytoplasme et où la membrane

plasmique se rompt pour déverser chromatine et protéines dans l'espace extracellulaire (Figure 14) (Remijnsen et al. 2011a, Brinkmann and Zychlinsky 2007).



**Figure 14.** Les étapes de la formation des pièges d'ADN extracellulaires. *a.* Photographies prises en microscopie à épifluorescence des étapes impliquées dans la formation des pièges d'ADN extracellulaires. *b.* Représentation schématique de la formation des ETs (1) L'activation des neutrophiles conduit à la formation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. (2) Les membranes nucléaires se désintègrent et l'intégrité des granules est progressivement perdue. (3) Les noyaux ne sont plus lobulés, le matériel nucléaire remplit une grande partie de la cellule et se mélange avec le contenu des granules. (4) L'intégrité des noyaux et des granules est complètement perdue et des réseaux d'ADN extracellulaires se forment (Brinkmann et Zychlinsky, 2007).

La NETose peut être activée par les pathogènes et leurs composants (Clark et al. 2007). Les mécanismes moléculaires de formation des NETs restent encore peu connus cependant les espèces actives de l'oxygène (ROS) synthétisées par la NADPH oxydase et la myéloperoxydase, la citrullination des histones, le calcium intracellulaire et l'autophagie semblent être requis pour l'initiation du programme de NETose.

#### IV.2.1 Implication de la citrullination des histones

Dans le noyau, la chromatine est hautement condensée. Certaines modifications post-traductionnelles des histones permettent de décondenser la chromatine. La formation des NETs nécessite une décondensation de la chromatine qui semble impliquer une augmentation la citrullination de l'histone H3 catalysée par la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4). La citrullination est la conversion d'une arginine chargée positivement en une citrulline, un acide aminé non conventionnel polaire mais non chargé (Wang et al. 2009 , Remijnsen et al. 2011a). La PAD4 est une enzyme calcium dépendante possédant un signal de localisation nucléaire, exprimée des divers leucocytes dont les neutrophiles (Wang et al. 2009 , Li et al. 2010, Remijnsen et al. 2011a , Remijnsen et al. 2011b , Rohrbach et al. 2012 , Pisanu et al. 2015 , Lewis et al. 2015). Les histones nucléaires semblent donc avoir un rôle dans la régulation de la NETose en plus de leur rôle antimicrobien direct.

## IV.2.2 Implication de la production des espèces réactives de l'oxygène

La production de ROS semble également jouer un rôle important dans l'initiation du programme de NETose (Fuchs et al. 2007). Les neutrophiles des patients atteints de Granulomatose chronique ne synthétisant pas la NADPH oxydase sont incapables de former des NETs ou de phagocyter les pathogènes (Fuchs et al. 2007 , Marcos et al. 2010). De plus, une mutation de la myéloperoxydase, une autre enzyme clé dans la formation des ROS, conduit aussi à une incapacité des neutrophiles à former des NETs (Papayannopoulos et al. 2010). Les ROS générés lors du burst oxydatif par la NADPH oxydase inactivent la voie des caspases dans les neutrophiles inhibant ainsi l'apoptose afin de privilégier la NETose. Cette inhibition peut se faire directement ou indirectement par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B conduisant à l'expression de gènes anti-apoptotiques (Arruda et al. 2004). Les ions superoxydes synthétisés par la NADPH oxydase sont également capables d'activer les protéases à sérine comme la cathepsine G et l'élastase neutrophile, cette dernière contribuant également à la décondensation de la chromatine (Papayannopoulos et al. 2010 , Remijsen et al. 2011a , Amulic and Hayes). La cathepsine G et la protéinase 3 ne semblent pas contribuer au processus de NETose mais sont retrouvées au même titre que l'élastase neutrophile comme composants des NETs. Ces protéases à sérine ont alors un rôle antimicrobien (Papayannopoulos et al. 2010, Remijsen et al. 2011a).

## IV.2.3 Rôle de l'autophagie

L'autophagie consiste en l'autodigestion des composants intracellulaires qui sont dégradés dans les endosomes et lysosomes. Le processus d'autophagie permet le maintien de l'homéostasie des organites et des biomolécules. L'autophagie intervient généralement lors du recyclage de ces composants cellulaires en cas de carence et lors du remplacement des organites endommagés ou des protéines mal repliées suite à un stress cellulaire. Ce processus intervient également dans le développement, la survie et la présentation de l'antigène des lymphocytes cellulaires (Levine and Kroemer 2008 , Huang et al. 2009 , Mitroulis et al. 2010 , Deretic, Saitoh and Akira 2013). Chez les neutrophiles, l'autophagie peut se déclencher de manière dépendante ou indépendante de la phagocytose. En réponse à une stimulation au PMA (phorbol myristate acétate), une augmentation massive de la vacuolisation est observée dans les neutrophiles (Remijsen et al. 2011b). L'analyse par microscopie électronique des vacuoles présentes dans ces neutrophiles révèlent la présence d'autophagosomes à différents stades de maturation. Lors du processus de formation des NETs, l'autophagie semble contribuer à l'inhibition de la voie des caspases et à la décondensation de la chromatine (Remijsen et al. 2011a , Remijsen et al. 2011b , Mitroulis et al. 2011 , Kambas et al. 2012).



### IV.3 Le rôle antimicrobien des NETs

Les NETs permettent aux neutrophiles de combattre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les champignons et les parasites. En effet, les NETs sont capables de lier et tuer les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes* et *Bacillus anthracis*, le champignon *Candida albicans* et le protozoaire *Leishmania amazonensis*. De plus, les NETs ont la capacité de piéger *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, et les *Streptococci* de groupe A. Cependant ces derniers microorganismes sont piégés mais non éliminés, suggérant que la séquestration médiée par les NETs joue un rôle important dans la défense immunitaire (Papayannopoulos and Zychlinsky 2009). L'élastase neutrophile contenue dans les NETs est capable de dégrader les facteurs de virulence des bactéries Gram-négatives, tel que l'IpaB de *Shigella flexneri*. Les facteurs de virulence des bactéries Gram-positives, telle que la toxine  $\alpha$  de *Staphylococcus aureus*, sont également sensibles aux protéases des neutrophiles. Les NETs sont donc capables de désarmer les bactéries pathogènes grâce aux protéases neutrophiles (Brinkmann et al. 2004). De plus, l'inhibition de l'activité des complexes ADN-H2A-HAB abolit la capacité d'élimination de *Staphylococcus aureus* et de *Shigella flexneri* par les NETs. Les facteurs responsables de l'élimination des pathogènes semblent donc être les histones et les protéines augmentant la perméabilité des bactéries (BPI). L'histone H2A permettant la destruction de *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* est conservée au cours d'évolution. La structure fibreuse des NETs semble être nécessaire à la séquestration et à la destruction des bactéries, en délivrant localement une haute concentration des molécules antimicrobiennes capables de lier les microorganismes. (Brinkmann et al. 2004). En conclusion, les NETs permettent de contenir physiquement les microorganismes, de moduler la réponse immunitaire et favorisent la synergie entre différents agents antimicrobiens contenus dans le NETs. De plus, les NETs permettent de minimiser les effets nocifs des antimicrobiens sur les tissus environnants en limitant la dispersion des molécules antimicrobiennes (Papayannopoulos and Zychlinsky 2009). Plus récemment, le rôle antimicrobien des NETs a été démontré in vivo (Yipp et al. 2012). En effet, une formation massive de NETs a été observée en intravital dans des tissus infectés par *Staphylococcus aureus* et il a été démontré que cette formation de NETs est importante pour contenir l'infection bactérienne. Les auteurs ont également injecté à des souris des neutrophiles humains provenant d'abcès pour suivre et quantifier la formation de NETs par ces neutrophiles. 11% des neutrophiles injectés ont généré des NETs, suggérant une régulation de la NETose (Yipp et al. 2012).

### IV.4 Les NETs, un dernier recours

Les polynucléaires neutrophiles sont capables de développer différentes stratégies antimicrobiennes : la phagocytose, la dégranulation et la formation de pièges d'ADN extracellulaire

ou NETs. La formation de pièges extracellulaires conduisant à la mort des neutrophiles, ce processus doit être finement régulé. Des expériences menées ex vivo, montrent que les neutrophiles déclenchent la phagocytose des microorganismes dans les premières minutes d'exposition. La dégranulation se produit de manière différentielle dans le temps en fonction de la composition des granules : des vésicules de sécrétion sont libérées pendant les premières minutes d'exposition, suivies par la libération de granules de gélatinase puis de granules spécifiques et enfin de granules azurophiles (Bentwood and Henson 1980 , Faurschou and Borregaard 2003). La formation de NETs est un processus plus long à se mettre en place (Fuchs et al. 2007). De plus, des expériences in vitro indiquent que les neutrophiles tuent *Staphylococcus aureus* avec la phagocytose en premier lieu puis par la formation de NETs (Fuchs et al. 2007). Ces résultats suggèrent que les neutrophiles vont mettre en œuvre les trois stratégies en effectuant tout d'abord la phagocytose puis la dégranulation et finalement la formation de NETs (Papayannopoulos and Zychlinsky 2009).

## V. LA RESISTANCE BACTERIENNE AUX PHAGOCYTES

Au cours de l'évolution, un certain nombre de bactéries ont développé des stratégies de résistance et/ou d'échappement aux phagocytes. Ceci inclut des stratégies de résistance à la phagocytose et aux NETs. La résistance aux NETs se fait principalement par la sécrétion de DNases. Les stratégies de résistance à la phagocytose consistent principalement en l'échappement à la reconnaissance et/ou à l'internalisation, en la résistance à la digestion intracellulaire et/ou en la prolifération dans le phagocyte. De manière intéressante, ces mécanismes de résistance sont fréquemment similaires entre les amibes et les métazoaires. Une revue exhaustive réalisée par Thomas et collaborateurs a permis de montrer que, parmi plus de 500 espèces bactériennes pathogènes intracellulaires pour l'homme et les animaux recensées par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA), au moins 20% sont capables de résister également à la digestion par les amibes (Thomas et al. 2010). Ces données laissent à penser que l'acquisition de la virulence de certaines bactéries pathogènes a pu se faire au contact d'amibes libres dans l'environnement et que les amibes peuvent représenter un réservoir environnemental de pathogènes. Les données les plus exhaustives étant sur la résistance aux phagocytes humains, les deux premiers sous-chapitres porteront sur les pathogènes humains puis sur ce qui est connu chez l'huître et chez les amibes.

### V.1 Résistance aux NETs de vertébrés

Certains micro-organismes pathogènes ont la capacité d'échapper aux NETs. Les Streptocoques peuvent éviter la liaison par les NETs grâce à la modification de la surface bactérienne. Par exemple *Streptococcus pneumoniae* peut s'entourer d'une capsule polysaccharidique lui permettant de se

protéger contre la liaison aux NETs (Wartha et al. 2007). Les Streptococci de groupe A, expriment et sécrètent des DNases dégradant activement les NETs, ce qui a pour effet d'augmenter la virulence de ces pathogènes (Buchanan et al. 2006). Il a également été récemment démontré que *Vibrio cholerae* induit l'expression de 2 nucléases extracellulaires (Dns et Xds), en réponse à la formation de NETs. Ces nucléases dégradent rapidement les NETs et permettent l'évasion de *V. cholerae* à ce mécanisme antimicrobien (Saper et al. 2013). Des hypothèses ont également été émises sur l'utilisation de catalases par certaines espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus* pour inhiber la formation de NETs en prévenant la production de ROS (Piau et al. 2008).

## V.2 Résistance à la phagocytose des macrophages

### V.2.1 Echappement à l'internalisation

Afin de ne pas être éliminés par les phagocytes, certains pathogènes restent extracellulaires en échappant à la reconnaissance par les phagocytes (Kenneth 2009). Pour inhiber l'attachement et/ou l'internalisation par les cellules immunitaires, les bactéries peuvent synthétiser des capsules polysaccharidiques pour empêcher la reconnaissance ou exprimer à leur surface des protéines inhibant la liaison avec les récepteurs (Flanagan, Cosio and Grinstein 2009, Flanagan et al. 2012). Par exemple, *V. vulnificus* est capable de sécréter une capsule qui peut le protéger de la phagocytose par des lignées cellulaires de type HeLa ainsi que de la reconnaissance par les protéines du complément qui peuvent servir d'opsonines (Genthner et al. 1999, Park et al. 2006).

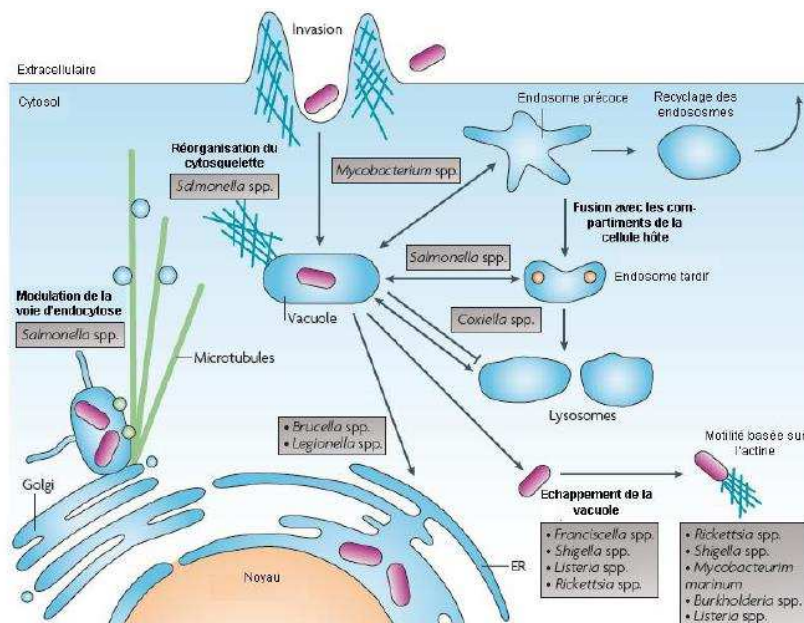
Certaines bactéries pathogènes peuvent également former des biofilms pour échapper à la phagocytose de cellules immunitaires. Il a été montré que *Staphylococcus aureus*, par exemple, pouvait former des biofilms et créer des infections chroniques, résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (Thurlow et al. 2011). Les biofilms sont des communautés bactériennes complexes dans lesquelles les bactéries sont enchâssées dans une matrice composée de polysaccharides, d'ADN extracellulaire et de protéines. Lance et collaborateurs ont montré que les biofilms de *S. aureus* formés dans des souris transgéniques sont capables d'éviter la phagocytose par les macrophages de l'hôte, en modifiant le profil d'expression de gènes de ces cellules immunes (Thurlow et al. 2011).

D'autres pathogènes peuvent adopter des formes filamenteuses pour échapper à la phagocytose. Une étude récente menée sur les formes filamenteuses de *Legionella pneumophila* a montré que la filamentation permet à ces bactéries de dévier la phagocytose des macrophages. En effet, les formes filamenteuses de ces bactéries vont retarder la fermeture de la coupe phagocytaire et modifier la maturation du phagosome. Les endosomes et lysosomes vont alors fusionner avec la coupe phagocytaire avant sa fermeture, ce qui va empêcher l'action microbicide engendrée par ces fusions. La filamentation de ces bactéries va donc ralentir la phagocytose, ce qui va avoir pour effet

d'entraver l'action microbicide des macrophages (Prashar et al. 2013). Cette inhibition de la phagocytose a également été observée suite à la filamentation d'E. coli (Moller et al. 2012).

## V.2.2 Résistance à la digestion intracellulaire

Certaines bactéries pathogènes sont intracellulaires strictes ou facultatives, et peuvent parfois utiliser les phagocytes comme niches répliquatives. Après leur internalisation, ces bactéries ont la capacité de survivre et de se répliquer dans les phagocytes. Parmi les nombreux pathogènes intracellulaires, il est possible de citer entre autres les bactéries des genres *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Brucella*, *Coxiella*, *Legionella*, *Shigella* et *Rickettsia* (Figure 15) (Diacovich and Gorvel 2010). Ces bactéries pathogènes peuvent survivre à la phagocytose soit en établissant une niche répliquative dans une vacuole, soit en s'échappant dans le cytosol.



**Figure 15.** Les pathogènes intracellulaires. La maturation du phagosome inclut de multiples interactions entre les compartiments de l'endocytose. Le phagosome fusionne avec les lysosomes pour former la phagolysosome, où se déroule la digestion des particules phagocytées. Les pathogènes ont développé différentes stratégies pour empêcher la dégradation dans le phagolysosome. Ainsi, on distingue la lyse de la membrane du phagosome suivie de l'évasion dans le cytosol avec l'évitement de l'autophagie; un retard de la maturation du phagosome facilitant le développement de la niche répliquative; une déviation de la voie d'endocytose; et une survie dans l'environnement hostile du phagolysosome. Adapté de Diacovich and Gorvel, 2010.

### V.2.2.1 Pathogènes cytosoliques

Ces bactéries pathogènes vont s'échapper du phagosome et se retrouver dans le cytosol où elles survivent et se multiplient. C'est le cas notamment de certaines espèces bactériennes des genres *Shigella*, *Rickettsia*, *Chlamydia* et *Mycobacterium*. Toutes ces bactéries utilisent pour cela des effecteurs moléculaires qui diffèrent en fonction de l'espèce bactérienne (Hybiske and Stephens

2008). L'échappement de la vacuole par la bactérie à Gram négatif *Shigella flexnerii* se fait par la formation de pores dans la membrane de la vacuole phagocytaire, grâce aux protéines IpaB, IpaC et IpaD produites par le système de sécrétion de type III. (Schroeder and Hilbi 2008). Dans le cas de *Rickettsia prowazekii*, la membrane de la vacuole phagocytaire va être perturbée puis lysée par des phospholipases D et/ou A2 (Whitworth et al. 2005). Les bactéries du genre *Chlamydia* vont utiliser la protéolyse pour détruire la membrane de la vacuole phagocytaire puis rapidement après la membrane plasmique de la cellule. Ce processus lytique implique principalement des protéases à cystéine (Hybiske and Stephens 2007). Il a également été récemment montré que *Mycobacterium marinum* et *M. tuberculosis* étaient capables de s'échapper du phagosome. Pour cela, ces bactéries nécessitent une protéine produite par le système de sécrétion de type VII nommée ESX-1, qui va causer la rupture de la membrane du phagolysosome (Smeone et al. 2012). La rupture de cette membrane intervient après survie et multiplication bactériennes dans la vacuole phagocytaire.

#### V.2.2.1.2 Pathogènes intravacuolaires

De nombreux pathogènes intracellulaires survivent et se multiplient à l'intérieur des vacuoles de phagocytose. Ces bactéries se protègent de l'acidification du phagosome et/ou des effecteurs microbicides s'accumulent dans le phagosome au cours de sa maturation tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et les métaux (Cu, Zn). Pour cela, ces bactéries vont empêcher la fusion du phagosome avec les différents compartiments vésiculaires nécessaires à la maturation du phagosome et/ou vont développer des systèmes permettant la dégradation des ROS/RNS et/ou l'efflux des métaux microbicides.

##### V.2.2.1.2.1 Altération de la maturation du phagosome

Afin de survivre et se répliquer, une grande partie des pathogènes intracellulaires ont développé des moyens de bloquer ou de détourner la maturation du phagosome. Parmi ces pathogènes, on retrouve par exemple *M. tuberculosis* (Philips 2008, de Chastellier et al. 2009, Diacovich and Gorvel 2010, Soldati and Neyrolles 2012), *Chlamydia trachomatis* (Belland et al. 2003), *Legionella pneumophila* (Bruggemann, Cazalet and Buchrieser 2006, Isberg, O'Connor and Heidtman 2009, Hilbi and Haas 2012, Herweg et al. 2015) les bactéries des genres *Salmonella* (Knodler and Steele-Mortimer 2003, Diacovich and Gorvel 2010) et *Brucella* (Rittig et al. 2001, Diacovich and Gorvel 2010).

*M. tuberculosis* bloque tôt la maturation du phagosome. En effet, les vacuoles qui contiennent ces bactéries présentent les caractéristiques du phagosome précoce et ne fusionnent pas avec les endosomes et les lysosomes. Il a été montré que ces vacuoles retiennent la petite GTPase Rab5 et excluent Rab7 et EEA1 (nécessaires à la fusion avec les endosomes). Les bactéries du genre

*Salmonella* bloquent plus tardivement la maturation du phagosome en inhibant la fusion avec les lysosomes, principalement en excluant la petite GTPase Rab7. Ces bactéries se maintiennent alors dans un phagosome tardif (propriétés similaires aux endosomes tardifs) (Knodler and Steele-Mortimer 2003).

*Legionella pneumophila* (Bruggemann et al. 2006) et les espèces de *Brucella* (Rittig et al. 2001) détournent la machinerie des compartiments intracellulaires pour interagir avec le réticulum endoplasmique. Les *Brucella* spp. dévient la voie d'endocytose pour aboutir à la fusion du phagosome avec le réticulum endoplasmique (RE). Pour cela, ces bactéries modifient la composition lipidique et protéique de la vacuole par un  $\alpha$ -glucane cyclique, pour faciliter la fusion avec les membranes du réticulum endoplasmique (Arellano-Reynoso et al. 2005). Les *Legionella pneumophila* vont se développer dans un compartiment unique appelé "Legionella-containing vacuole" (LCV). Ces LCVs ne vont pas fusionner avec les lysosomes mais vont communiquer avec des vésicules sécrétées par le RE puis finalement interagir avec le RE lui-même. Les effecteurs moléculaires nécessaires sont sécrétés par le système de sécrétion de type IV de *Legionella* (Isberg et al. 2009 , Hilbi and Haas 2012, Herweg et al. 2015).

#### V.2.2.1.2.2 Résistance aux ROS/ RNS

Les phagocytes produisant des ROS et RNS suite à l'internalisation des micro-organismes, les pathogènes ont développé des mécanismes pour détoxifier les ROS et les RNS. La détoxification se fait par des enzymes qui convertissent les ROS en des espèces moins toxiques, en partie grâce aux catalases, superoxydes dismutases et peroxydases.

La résistance aux ROS/ RNS se fait principalement grâce à l'induction soit du système OxyR soit du système SoxR/S (Imlay 2013). Le système OxyR est activé suite à l'interaction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) avec des protéines OxyR. Une fois liées à l' $H_2O_2$ , les OxyR vont agir comme facteurs de transcription pour les membres du régulon OxyR, codant notamment des catalases et des réductases péroxirédoxine (Aslund et al. 1999 , Choi et al. 2001 , Pomposiello and Demple 2001 , Imlay 2013). De la même manière, les homodimères de SoxR peuvent être oxydés par des composés redox auto-oxydables. Une fois oxydés, ces dimères agissent comme facteurs de transcription pour SoxS. Les protéines SoxS vont alors également agir comme facteurs de transcription sur les membres du régulon SoxRS qui codent, entre autres, des superoxydes dismutases (Greenberg et al. 1990 , Pomposiello and Demple 2001 , Imlay 2013).

Ces systèmes de réponse au stress antioxydant sont retrouvés chez des pathogènes intracellulaires, tels que *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *M. tuberculosis* et des bactéries des genres *Shigella*, *Salmonella*. Selon les pathogènes, l'importance de ces systèmes pour la survie est variable. En effet, chez les bactéries des genres *Shigella*, *Salmonella*, la délétion de ces systèmes rend les bactéries plus sensibles aux ROS mais n'affecte pas leur capacité à être infectieuses (van der Straaten et al. 2001 , Daugherty, Suvarnapunya and Runyen-Janecky 2012). A l'inverse, ces systèmes de réponse au stress oxydant, et particulièrement *oxyR*, sont importants pour la pathogénicité de *V. cholerae* et *V. vulnificus*. La mutation d'*oxyR* chez *V. cholerae* entraîne un défaut de colonisation chez la souris (Wang et al. 2012b) et cette même mutation chez *V. vulnificus* entraîne une réduction de la létalité pendant l'infection (Kim et al. 2014). De plus, l'augmentation du niveau de SODs par l'induction *SoxR* en présence de superoxyde serait essentielle à la virulence chez *V. vulnificus* (Kang, Kim and Lee 2007). Chez *V. vulnificus*, les systèmes antioxydants peuvent se déclencher également en cas de choc thermique ou d'exposition à un pH acide (Kim et al. 2005 , Limthammahisorn, Brady and Arias 2008).

Les superoxydes dismutases (SODs), produites notamment suite à l'activation système *SoxRS*, transforment l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces enzymes peuvent utiliser comme cofacteurs soit le manganèse (MnSOD), soit le fer (FeSOD), soit le cuivre et/ou le zinc (Cu/Zn SOD). Les SODs sont retrouvées chez les pathogènes intracellulaires des genres *Salmonella* (Linehan and Holden 2003), *Mycobacterium* (notamment *M. tuberculosis*, *M. leprae* et *M. segmatis*) (Bartos, Falkinham and Pavlik 2004), *Vibrio* (notamment *V. shiloi*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*) (Shyu and Lin 1999 , Kimoto et al. 2001 Banni, 2003 #2483 , Gabbianelli et al. 2004) et chez *E. coli* (Imlay and Imlay 1996).

L' $H_2O_2$  produit par le phagosome ou généré par l'action des SODs bactériennes est aussi très toxique pour les bactéries. L' $H_2O_2$  peut alors être réduit en  $H_2O$  par des peroxyrédoxines ou alkylperoxydereductase (*Ahp*) et/ou des catalases. Les *Ahp* font partie de la superfamille des peroxydases à thiol (ou *Tsa*) et sont impliquées dans la détoxification de l' $H_2O_2$  mais aussi du peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ) chez *E. coli* et chez des pathogènes intracellulaires tels que *M. tuberculosis*, (Master et al. 2002) et les autres espèces de mycobactéries virulentes, *Legionella pneumophila* et les *Vibrio* pathogènes *V. vulnificus* (Baek et al. 2009), *V. parahaemolyticus* (Wang et al. 2013a) et *V. cholerae* (Davies et al. 2011). Deux familles de catalases ont été décrites chez les bactéries en fonction de leur cofacteur : les catalases à hème, utilisant le fer, et les catalases à manganèse, les plus répandues étant les catalases à hème. Les catalases ont un turn over plus rapide que les *Ahp* et leur rôle serait prédominant en cas d'exposition à de fortes concentrations de  $H_2O_2$ . En effet, les catalases utilisent le fer  $Fe_{3+}$  ou le manganèse  $Mn_{2+}$  comme donneurs d'électrons alors que les *Ahp*

utilisent le NADH (Seaver and Imlay 2001). Des catalases ont pu être identifiées chez *E. coli* (Heimberger and Eisenstark 1988), chez plusieurs espèces de *Mycobacterium*, telles que *M. tuberculosis* (Ng et al. 2004), chez *Salmonella* spp. (Hebrard et al. 2009) ainsi que chez *V. cholerae* (Wang et al. 2012b).

#### V.2.2.1.2.3 L'homéostasie des métaux

Le cuivre et le zinc ont un rôle important dans la dégradation des micro-organismes par le phagosome. Les bactéries intracellulaires ont alors développé des systèmes d'efflux et d'oxydation du cuivre ainsi que des transporteurs de zinc. A l'inverse, la présence de fer et de manganèse est nécessaire aux bactéries intracellulaires pour le bon fonctionnement de leurs enzymes, telles que les MnSOD et des FeSOD, impliquées dans la réponse anti-oxydante. Les bactéries intracellulaires expriment alors des transporteurs permettant l'influx de fer et de manganèse.

##### a) Le cuivre

Pour le cuivre, les principaux systèmes impliqués dans l'homéostasie des bactéries sont les ATPases, les systèmes RDN (résistance-nodulation-cell division) et les « multi-copper oxydases » périplasmiques (Rademacher and Masepohl 2012). Chez les bactéries à Gram négatif, ces effecteurs sont principalement régulés au niveau transcriptionnel par des systèmes à un ou deux composants dont la protéine senseur détecte la concentration en cuivre (Ma, Jacobsen and Giedroc 2009b).

Le système à un composant Cue existe chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et repose sur la protéine CueR, appartenant à la famille des protéines MerR. La protéine CueR comporte 3 domaines: un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison aux métaux (Changela et al. 2003). CueR active la transcription de deux gènes codant pour CopA, une ATPase de type P localisée à la membrane interne, et pour CueO un multi-copper oxydase (Samanovic et al. 2012). Le système à deux composants CusRS permet également la régulation de l'efflux de cuivre chez *E. coli*. CusS, situé à la membrane cytoplasmique, est capable de détecter le cuivre périplasmique. Après avoir lié le Cu<sup>+</sup>, CusS active le régulateur transcriptionnel CusR par transfert de phosphate qui à son tour active la transcription de l'opéron cusCFBA codant pour le système d'efflux de type RND nommé CusABC (Gudipaty et al. 2012).

Les ATPases de type P, activées par l'hydrolyse de l'ATP, constituent le principal mécanisme d'efflux de cuivre chez les bactéries (Rademacher and Masepohl 2012). Parmi les ATPases de type P les plus étudiées, on peut citer CopA qui a été retrouvée chez *E. coli* et *Salmonella* spp. (Outten et al. 2001, Espariz et al. 2007) ainsi que CtpV et CtpC retrouvées chez *M. tuberculosis* (Neyrolles, Mintz and Catty 2013).



Les systèmes d'efflux de type RND (résistance-nodulation division cellulaire) sont utilisés par de nombreuses bactéries pour contrôler leur concentration en cuivre et zinc intracellulaire (Franke et al. 2003). Parmi ces systèmes RND, le système CusABC est l'un des plus étudiés chez *E. coli* (Rensing and Grass 2003). Le système CusABC est composé d'une pompe localisée à la membrane interne CusA, d'une protéine périplasmique CusB et d'une protéine CusC qui forme un canal au travers de l'espace périplasmique jusqu'au milieu extérieur. Ce complexe peut exporter le cuivre grâce à une protéine chaperonne CusF qui lie le cuivre et le leur délivre (Loftin et al. 2005, Mealman, Blackburn and McEvoy 2012).

En condition anaérobie, le  $Cu^+$  est plus toxique que le  $Cu_{2+}$  (Macomber and Imlay 2009), les bactéries peuvent alors utiliser des multi-copper oxydases capables d'oxyder le  $Cu^+$ . Chez *E. coli*, comme chez *S. enterica* serovar Typhimurium, la multi-copper oxydase impliquée dans l'homéostasie du cuivre est nommée CueO (cuprous oxidase). Ces enzymes périplasmiques oxydent leur substrat en utilisant des équivalents ionisés de molécules d'oxygène (Outten et al. 2001).

#### b) Le zinc

Pour le zinc, les principaux systèmes impliqués dans l'efflux sont des ATPases de type Ib, des transporteurs de type CDF (Cation Diffusion Facilitator), RND (Resistance Nodulation Division) et MDF (Membrane Diffusion Facilitator). Comme pour le cuivre, certains de ces transporteurs sont régulés au niveau transcriptionnel par des protéines capables de répondre à la concentration en zinc (Ma et al. 2009b). Il existe également chez les bactéries à Gram négatif des transporteurs de type ABC qui permettent l'acquisition du zinc à la membrane interne.

L'efflux du zinc est contrôlé par la protéine ZntR, un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines MerR, comme CueR. Une fois liée au zinc, ZntR va permettre l'expression d'une ATPase (Wang, Hosteen and Fierke 2012a). Chez *E. coli* et *M. tuberculosis*, l'efflux de zinc se fait principalement via des ATPases : respectivement une ATPase de type P nommée ZntA (Binet and Poole 2000, Wang and Fierke 2013) et ATPase nommée CptV (Botella et al. 2011). Chez *E. coli*, l'efflux de zinc peut également se faire grâce au système d'efflux de type CDF nommé ZntB (Grass et al. 2001).

L'influx de zinc est contrôlé par les facteurs de transcription Zur et SoxR. Une fois liées au zinc, l'une ou l'autre de ces protéines va permettre l'expression des gènes *znuABC* (Li et al. 2009, Warner and Levy 2012). Le transporteur de type ABC, ZnuABC, qui transporte le zinc du périplasma vers le cytosol permet l'influx de zinc chez *E. coli* et *Salmonella* spp. Le complexe ZnuABC est composé d'une protéine périplasmique liant le zinc, ZnuA, d'une perméase membranaire ZnuB et d'une sous-unité l'hydrolysant de l'ATPase ZnuC (Hantke 2005).

### c) Le fer et le manganèse

Le fer et le manganèse sont requis pour le bon fonctionnement de certaines enzymes bactériennes comme les MnSODs et des FeSODs, impliquées dans la réponse anti-oxydante. Les bactéries vont donc importer ces métaux, notamment grâce à des transporteurs de type ABC présents au niveau de la membrane interne, des transporteurs appartenant à la famille NRAMP, des transporteurs de sidérophores présents au niveau de la membrane externe et des systèmes à 3 composants dépendants de TonB (Goswami et al. 2001 , Forbes and Gros 2003 , Braun 2001, Botella et al. 2012 , Chatfield et al. 2012 , Portier et al. 2015).

Les concentrations en fer et en manganèse vont donc être finement contrôlées chez les bactéries. L'homéostasie du fer implique entre autres les régulateurs de transcription Fur retrouvés par exemple chez *E. coli* (Chen et al. 2007b) et *Legionella pneumophila* (Canciotta 2007). Une étude récente a également mis en évidence, chez *Legionella pneumophila*, des transporteurs membranaires de fer IroT nécessaires à la virulence de la bactérie pour les macrophages et pour les amibes (Portier et al. 2015) et DtxR (Ma et al. 2009b), tous deux identifiés chez *E. coli* et retrouvés chez *Salmonella* spp. DtxR réprime l'expression des systèmes d'efflux MntH (famille NRAMP) et StABCD (transporteur ABC) suite à l'exposition de la bactérie à de fortes concentrations en manganèse chez *E. coli* et *Salmonella* spp. (Patzner and Hantke 2001 , Ikeda et al. 2005).

## V.3 Résistance des *Vibrio* pathogènes aux hémocytes d'huître

Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'origine infectieuse des mortalités estivales a été reliée au virus OSHV-1 (Segarra et al. 2010) et à des *Vibrio* (Lacoste et al. 2001, Gay et al. 2004b , Gay et al. 2004a , Saulnier et al. 2010). La plupart des *Vibrio* colonisant les organismes marins sont des espèces considérées comme commensales mais quelques espèces sont devenues des pathogènes opportunistes. Ces différentes espèces pathogènes peuvent alors affecter les larves et/ou les juvéniles ou les adultes (Beaz-Hidalgo et al. 2010 , Romalde et al. 2014). Les larves de *C. gigas* peuvent être affectées par des *Vibrio* du Clade Splendidus, des *V. alginolyticus*, et principalement par des *V. tubiashii* (Jeffries 1982 , Beaz-Hidalgo et al. 2010). *V. tubiashii*, causant des nécroses bacillaires, a en effet été isolé au cours de maladies survenues dans les éclosiers de *C. virginica* (Tubiash, Chanley and Leifson 1965 , Tubiash, Colwell and Sakazaki 1970) et de *C. gigas* (Estes et al. 2004, Travers et al. 2014). La mortalité d'huîtres adultes a principalement été associée à des souches de *Vibrio aestuarianus* (Labreuche et al. 2006b , Labreuche et al. 2006a , Garnier et al. 2008 , Saulnier et al. 2009 , Labreuche et al. 2010), dont la virulence a été confirmée en infections expérimentales (Garnier et al. 2008 , Saulnier et al. 2009). Les naissains et les juvéniles sont particulièrement affectés par des *Vibrio* du clade Splendidus (Lacoste et al. 2001, Gay et al. 2004b , Gay et al. 2004a , Saulnier et al. 2010). Ce clade présente une diversité génétique importante et de nombreuses souches ont été

isolées et caractérisées lors de mortalités estivales (Lacoste et al. 2001 , Waechter et al. 2002 , Gay et al. 2004a, Saulnier et al. 2010). Toutes les souches de ce clade ne sont pas pathogènes pour l'huître. Une étude récente menée dans la lagune de Goro en Italie s'est intéressée à l'occurrence, aux variations temporelles et aux réservoirs environnementaux des *Vibrio* du clade *Splendidus* et de *V. aestuarianus* (Vezzulli et al. 2015). Ces travaux ont montré la présence de ces pathogènes d'huître dans le sédiment, dans la colonne d'eau et associés au plancton ainsi qu'aux mollusques *C. gigas* et *Mytilus galloprovincialis* tout au long de l'année (Vezzulli et al. 2015).

A ce jour, le seul *Vibrio* pathogène d'huître pour lequel la résistance à la phagocytose des hémocytes d'huître a été entièrement démontrée et caractérisée est *V. tasmaniensis* LGP32 (Duperthuy et al. 2011). Les *Vibrio* sont généralement considérés comme des pathogènes extracellulaires. En effet, la pathogénicité de *V. aestuarianus* pour l'huître semble être principalement liée à la sécrétion d'une métalloprotéase à zinc (Vam) (Labreuche et al. 2010). Des études ont également montré que les pathogènes humains *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*, transmis par les huîtres, étaient capables d'échapper à la phagocytose des hémocytes de l'huître, notamment par encapsulation (Harris-Young et al. 1995 , Genthner et al. 1999, Canesi et al. 2002). Depuis quelques années, il a été montré que les pathogènes humains *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* peuvent adopter des stades de vie intracellulaire dans des phagocytes de l'environnement comme les amibes (Abd et al., 2005; Abd et al., 2007) ainsi que dans les cellules épithéliales et les phagocytes professionnels de l'hôte colonisé (Ma et al. 2009a , de Souza Santos and Orth 2014).

*V. tasmaniensis* LGP32 est une souche du clade *Splendidus* qui a été isolée par Le Roux et collaborateurs lors des épisodes de mortalités de 2004 (Gay et al. 2004b). Les récents progrès faits dans la phylogénie moléculaire des Vibrionacées par Sawabe et al. (2013) a permis de renommer la souche pathogène d'huître *V. splendidus* LGP32 du clade *Splendidus* en *V. tasmaniensis* LGP32. Ce pathogène intracellulaire facultatif, est un pathogène intravacuolaire qui va survivre dans le phagosome, se multiplier puis lyser les hémocytes d'huître (Duperthuy et al. 2011 , Vanhove et al. 2015a).

### V.3.2 Internalisation du pathogène *V. tasmaniensis* LGP32

Des travaux récents de notre équipe ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif et qu'il utilise l'invasion des hémocytes d'huître comme une étape majeure du processus infectieux (Duperthuy et al. 2011). La présence de la porine OmpU à la membrane externe de *V. tasmaniensis* LGP32 est essentielle pour la virulence de ce pathogène (Duperthuy et al. 2010). En effet, des expériences d'infections expérimentales (in vivo) ont montré que les mutants de *V. tasmaniensis* LGP32 délétés du gène codant la porine OmpU sont rendus non virulents, et que ceci

est corrélée à leur incapacité à envahir les hémocytes d'huîtres (Duperthuy et al. 2011). A l'inverse, la souche sauvage de *V. tasmaniensis* LGP32 envahit les hémocytes de *C. gigas*, dans lesquels elle survit. Dans ce processus, OmpU sert d'adhésine/invasine nécessaire à la reconnaissance de la bactérie par la  $\beta$ -intégrine hémocytaire et à l'invasion de la cellule hôte. En outre, la protéine majoritaire du plasma d'huître, la superoxyde dismutase extracellulaire Cg-EcSOD, est utilisée comme une opsonine favorisant la phagocytose OmpU-dépendante via sa séquence RGD. Les travaux de Duperthuy et collaborateurs ont montré d'une part que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif qui manipule les mécanismes de défense de l'hôte pour entrer et survivre à l'intérieur des cellules immunitaires, et d'autre part que la porine OmpU est un déterminant majeur de l'invasion des cellules hôtes chez les espèces de *Vibrio*. Ces travaux ont en effet montré que la porine OmpU est utilisée par *V. tasmaniensis* LGP32 pour adhérer et envahir les hémocytes d'huître après opsonisation par la protéine Cg-EcSOD du plasma d'huître (Figure 16) (Duperthuy et al. 2011) et que cette même porine contribue à la résistance contre les AMPs de l'huître, Cg-Def and Cg-BPI (Duperthuy et al. 2010).

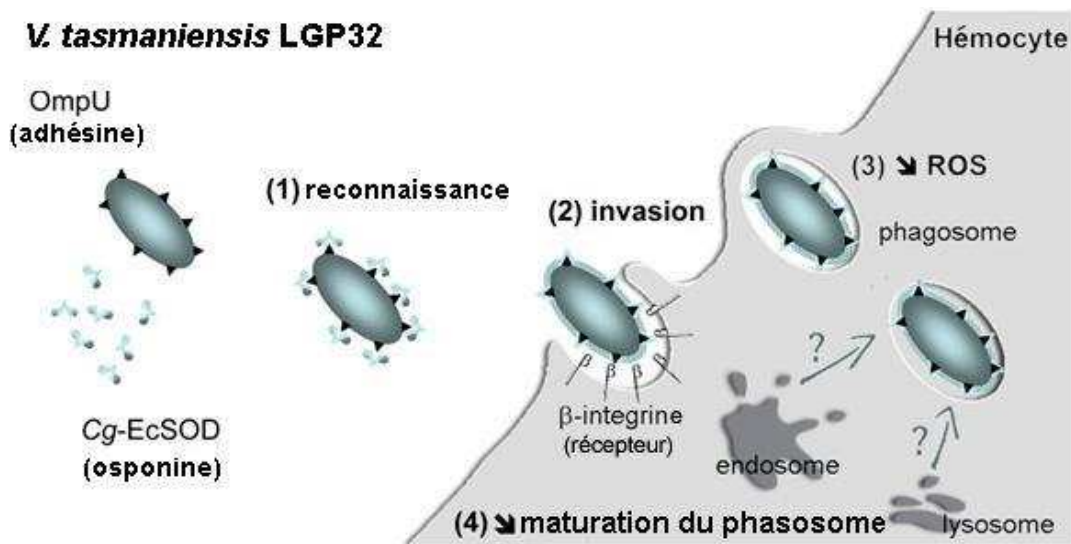


Figure 16. Modèle d'invasion des hémocytes de *C. gigas* par *V. tasmaniensis* LGP32. Le mécanisme d'invasion des hémocytes par *V. tasmaniensis* est dépendant de la  $\beta$ -intégrine hémocytaire et fait intervenir OmpU en tant qu'adhésine, et la protéine plasmatique Cg-EcSOD en tant qu'opsonine. Dans ce modèle (1) OmpU de *V. tasmaniensis* LGP32 est reconnu par la Cg-EcSOD qui va alors recouvrir la bactérie. (2) *V. tasmaniensis* LGP32 ainsi opsonisé est reconnu au niveau de la membrane des hémocytes par la  $\beta$ -intégrine qui signale l'internalisation de la bactérie. Une fois internalisé, *V. tasmaniensis* LGP32 inhibe (3) la production de ROS et (4) la formation de vacuoles acides par les hémocytes. D'après Duperthuy et al., 2011.

### V.3.2 Survie et multiplication dans les cellules de l'hôte

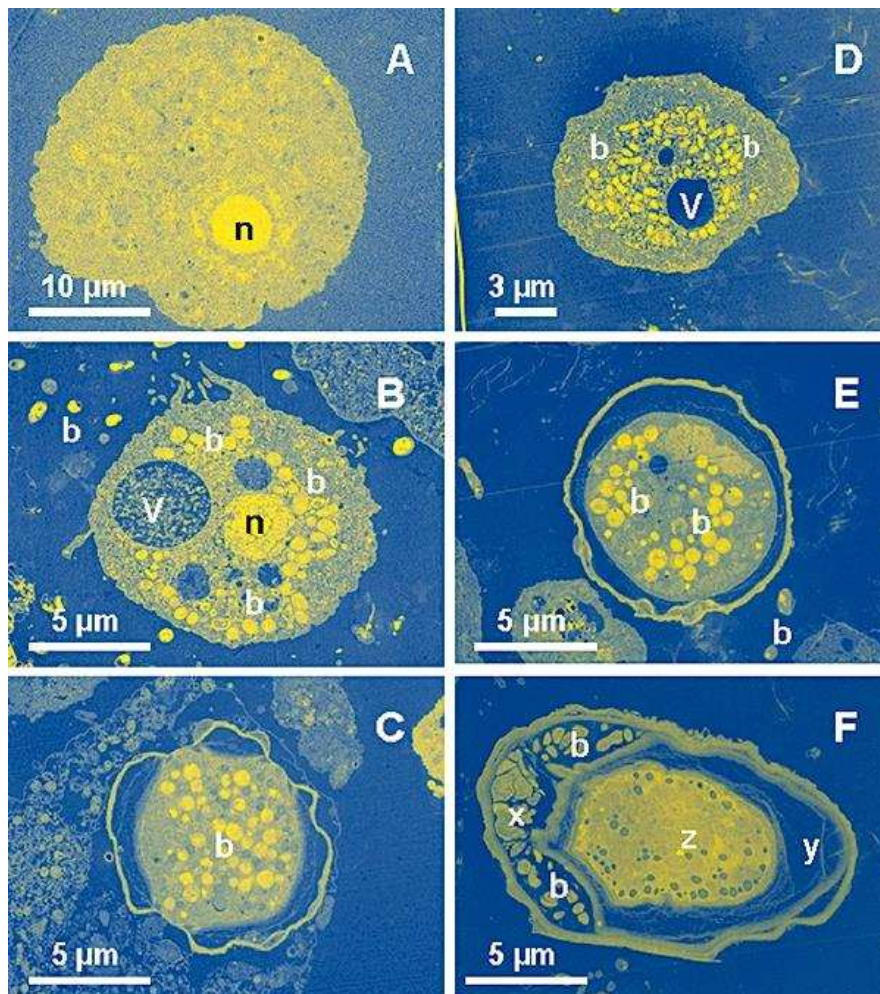
Les bactéries internalisées montrent des capacités de survie intracellulaire et d'échappement aux défenses de l'hôte en inhibant la formation de vacuoles acides et en limitant la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS) (Duperthuy et al. 2011). La résistance de *V. tasmaniensis* LGP32 aux défenses de l'hôte semble également impliquer la production de vésicules

de membrane externes (OMVs) lors de ses stades intracellulaires (Vanhove et al. 2015a). Les OMVs constituent la fraction vésiculaire des produits de sécrétion extracellulaires (ECPs). Ces OMVs contiennent des enzymes possiblement impliquées dans la virulence de la bactérie, comme des métalloprotéases, des hémolysines, des sérines protéases et des phospholipases. Parmi ces enzymes, la sérine protéase Vsp encapsulée dans les OMVs a un rôle démontré dans la virulence de LGP32, en infections expérimentales d'huître. De plus, il a été montré que les OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 protègent la bactérie contre la polymyxine B dans un mécanisme de résistance dose-dépendant, basé sur la titration (et non la dégradation) du peptide antimicrobien (Vanhove et al. 2015a). La sécrétion d'OMVs apparaît donc comme un mécanisme d'adsorption des AMPs permettant de limiter leur interaction avec les bactéries elles-mêmes. La mise en évidence de la sécrétion intracellulaire des OMVs par LGP32 laisse supposer qu'elles puissent jouer un rôle dans la survie de la bactérie dans le phagosome des hémocytes (Vanhove et al. 2015a).

#### V.4 Résistance à la phagocytose des amibes

Les amibes libres se nourrissant notamment de bactéries qu'elles broient à la surface des biofilms, elles régulent de manière importante les populations bactériennes de ces biofilms. Cependant de nombreuses espèces bactériennes ont développé la capacité de survivre à ces phagocytes professionnels, en résistant à la digestion intracellulaire et/ou en proliférant de manière importante dans l'amibe. Or les mécanismes permettant la résistance à la digestion par les amibes sont fréquemment similaires à ceux permettant aux micro-organismes infectieux de résister à la dégradation par les cellules immunitaires d'organismes supérieurs ; la conséquence en est que les espèces bactériennes qui ont développé des mécanismes de résistance à la digestion par les amibes au cours de leur évolution sont aussi potentiellement pathogènes pour les organismes supérieurs. Une partie de ces bactéries résistantes aux amibes sont des intracellulaires facultatifs pouvant être dispersés dans l'environnement lors de la lise des amibes, par formation et sécrétion de vésicules ou lors de l'enkystement des amibes (Marciano-Cabral 2004). Ces similarités entre les mécanismes de virulence vis-à-vis des amibes et des eucaryotes supérieurs ont été largement démontrées pour les espèces bactériennes *Legionella pneumophila* (Orlino et al. 1999 , Orlino, Falkow and Tompkins 1994 , Bouyer et al. 2007b , Anacarso et al. 2010) pour *Mycobacterium avium* (Orlino et al. 1997 , Taylor et al. 2003 , Amisshah et al. 2014), pour *Salmonella enterica* Typhimurium (Wildschutte and Lawrence 2007) et également pour les *Vibrio* pathogènes humains : *Vibrio cholerae* et *Vibrio mimicus* (Abd et al. 2007b , Sandstrom, Saeed and Abd 2010 , Abd et al. 2010). En effet, des études récentes ont démontré que *Vibrio cholerae* peut adopter des stades intracellulaires dans les amibes *Acanthamoeba castellanii* (Abd et al. 2007b) et *Acanthamoeba polyphaga* (Sandstrom et al. 2010). Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont fréquemment retrouvées dans les environnements

aquatiques (eaux saumâtres et eaux douces). De plus, ce genre amibien est fréquemment retrouvé, en plus de *Vibrio cholerae*, dans les zones aquatiques où il y a des épidémies de choléra. L'interaction entre les amibes du genre *Acanthamoeba* et *Vibrio cholerae* a alors été étudiée (Abd et al. 2007b , Sandstrom et al. 2010). Ces études ont montré que les *V. cholerae* sont capables de survivre au processus de phagocytose et de proliférer dans les amibes. Les bactéries intracellulaires sont retrouvées dans des vacuoles cytoplasmiques au sein des amibes (Figure 17). La présence de ces bactéries intracellulaires n'affecte pas la croissance amibienne, il est donc probable que les amibes du genre *Acanthamoeba* soient des hôtes environnementaux pour *V. cholerae* (Sandstrom et al. 2010). L'amibe *Acanthamoeba castellanii* est également un réservoir environnemental potentiel pour *Vibrio mimicus*, une bactérie aquatique responsable de gastro-entérites généralement liées à l'ingestion de fruits de mer crus (Abd et al. 2010). Après avoir été phagocyté, *Vibrio mimicus* est capable de survivre en intracellulaire et est retrouvé dans le cytoplasme d'*A. castellanii*. Cependant, si la croissance bactérienne est fortement augmentée en présence de l'amibe, le cycle de vie d'*A. castellanii* n'est pas perturbé par cette interaction. En effet, la croissance amibienne n'est pas altérée par la présence de *V. mimicus* intracellulaires et *A. castellanii* peut s'enkyster, sans que les *Vibrio* ne soient relargués dans l'environnement. Les kystes vont alors protéger les *V. mimicus* intracellulaires de l'environnement et notamment des antibiotiques (Abd et al. 2010).



**Figure 17.** Localisation intracellulaire de *V. mimicus* CS-5 dans les amibes *A. castellanii*. Ces photographies ont été prises en microscopie électronique. b, bactéries; n, noyau; v, vacuole; x, ectokyste; y, mesokyste; z, endokyste. A. Trophozoïte d'*Acanthamoeba castellanii* en absence de bactéries. B. *Vibrio mimicus* CS5 localisées dans le cytoplasme d'un trophozoïte d'*A. castellanii*, après 1 jour de co-culture. C. Des *V. mimicus* CS5 sont aussi contenues dans des kystes d'*A. castellanii*, après 1 jour de co-culture. D. *Vibrio mimicus* CS5 localisées dans le cytoplasme d'un trophozoïte d'*A. castellanii*, après 3 jours de co-culture. E. Des *V. mimicus* CS5 sont aussi contenues dans des kystes d'*A. castellanii*, après 3 jours de co-culture. F. Un prékyste d'*A. castellanii* contenant des *V. mimicus* CS5 intracellulaires dans l'espace entre l'ectokyste et le mesokyste, après 3 jours de co-culture. D'après Abd et al, 2010

Une fois internalisées par les amibes, les bactéries peuvent éventuellement se multiplier en grand nombre dans la cellule infectée et elles sont par ailleurs protégées vis-à-vis de l'environnement, notamment contre l'action de traitements biocides auxquels sont résistants certains trophozoïtes mais surtout les kystes amibiens (Thomas et al. 2004 , Abd et al. 2010). Les kystes sont extrêmement résistants aux températures élevées, à la dessiccation et à différents types de traitements biocides (Coulon et al. 2010 , Thomas et al. 2010). Ils peuvent donc former des niches ou des réservoirs environnementaux pour diverses espèces bactériennes.

CHAPITRE II :

RESULTATS



## Section A.

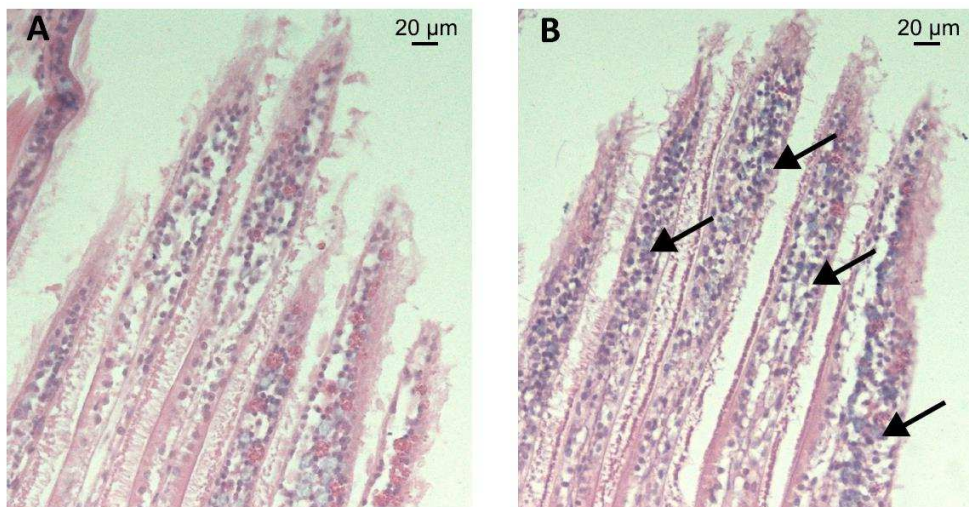
Les hémocytes de C. gigas peuvent  
former des pièges d'ADN  
extracellulaire, contenant des  
histones antimicrobiennes.

## CHAPITRE II: RESULTATS

### Section A.

#### Les hémocytes de *C. gigas* peuvent former des pièges d'ADN extracellulaire, contenant des histones antimicrobiennes.

Des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe indiquaient la présence d'histones antimicrobiennes en quantité importante dans les branchies d'huîtres *C. gigas* infectées par *V. tasmaniensis* LGP32 (SCHMITT 2010). Cependant, leur caractérisation biochimique était incomplète et leur spectre d'activité antimicrobienne n'avait pas été étudié. Nous avons alors dans un premier temps purifié ces antimicrobiens à partir de branchies d'huîtres puis les avons caractérisés par spectrométrie de masse. De manière très intéressante, cette accumulation d'histones dans les branchies d'huîtres infectées était corrélée avec une infiltration cellulaire massive au niveau de ces tissus, laissant penser que les hémocytes infiltrants pourraient jouer un rôle important dans la réponse immunitaire au niveau des tissus (Figure 18).



**Figure 18.** Infiltration hémocytaire dans des branchies d'huîtres infectées avec *V. tasmaniensis* LGP32. A et B : coupes histologiques d'huîtres non stimulées (A) et d'huîtres infectées pendant 24h avec *V. tasmaniensis* LGP32 (B). La coloration hématoxyline-éosine montre une infiltration massive dans les branchies d'huîtres infectées avec *V. tasmaniensis* LGP32.

Chez les vertébrés, des histones antimicrobiennes ont récemment été associées à des pièges d'ADN extracellulaire formé par les neutrophiles (NETs pour Neutrophil Extracellular Traps) (Brinkmann et al. 2004). Les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle central dans la formation de ces NETs (Papayannopoulos and Zychlinsky 2009, Amulic and Hayes 2011, Remijsen et al. 2011b ,

Remijssen et al. 2011a). Toutefois, chez l'huître *C. gigas*, si la production d'espèces réactives de l'oxygène a été démontrée comme une puissante réponse immunitaire des hémocytes (Bachere et al. 2004), aucune étude n'avait été menée sur la capacité des hémocytes à former des pièges d'ADN extracellulaire (ETs). L'existence même d'un tel phénomène chez les Lophotrochozoaires n'avait d'ailleurs jamais été rapportée.

## Principaux résultats

Nous avons ici étudié la formation d'ETs chez l'huître *Crassostrea gigas* en mettant en œuvre une approche biochimique couplée à une approche cellulaire s'appuyant sur des expériences *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons tout d'abord montré que des histones antimicrobiennes s'accumulent dans les tissus de *C. gigas* suite à une blessure ou à une infection. Ces histones ont été purifiées par HPLC de phase inverse à partir de branchies d'huître infectées avec *V. tasmaniensis* LGP32 pendant 24h ou blessées par piqûre stérile. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de dire qu'il s'agissait majoritairement d'histones H1 et H5. Nous avons également montré que ces histones exercent une action antimicrobienne sur des bactéries à Gram positif et Gram négatif.

L'accumulation des histones antimicrobiennes dans les tissus étant corrélée à une infiltration massive des hémocytes, nous avons développé une approche cellulaire en mettant en contact des hémocytes et des *V. tasmaniensis* LGP32, afin de voir si ces cellules pouvaient libérer des structures similaires aux NETs. Nous avons alors mis en évidence la formation rapide, par les hémocytes de *C. gigas*, de pièges d'ADN extracellulaire (ETs) dans lesquels des bactéries sont piégées. Ces ETs ont été observés après 1h de mise en contact des hémocytes avec *V. tasmaniensis* LGP32, à la fois en microscopie à épifluorescence, après marquage de l'ADN extracellulaire au Sytox Green et en microscopie confocale après marquage des acides nudéiques totaux au DAPI et des membranes cellulaires à la WGA-TRITC. Nos images de microscopie confocale ont aussi permis de mettre en évidence la présence de bactéries piégées à l'intérieur des ETs.

Nous avons également démontré que les ETs de *C. gigas* étaient associés aux histones H5 antimicrobiennes isolées des tissus. Des plages d'histones H5 ont été observées autour des ETs, grâce à des anticorps que nous avons fait produire pour être spécifiques des protéines antimicrobiennes isolées des branchies de *C. gigas*. Ces plages d'histones nous ont alors permis de développer une méthode de quantification de la formation des pièges d'ADN extracellulaire, en adaptant un protocole mis au point sur les NETs de vertébrés. Cette méthode de quantification nous

a alors permis de montrer la dépendance de la formation des ETs à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et sa non-spécificité aux agents pathogènes. Nous avons en effet observé le même taux de formation des ETs en incubant les hémocytes de *C. gigas* avec *V. tasmaniensis* LGP32, avec d'autres bactéries à Gram positif et négatif et avec du zymosan. De plus, nous avons pu montrer que le taux de formation des ETs était similaire aux hémocytes contrôle lorsque les hémocytes étaient prétraités avec un inhibiteur de la production de ROS, avant de les mettre en contact avec les différents agents microbiens. Ces résultats démontrent ainsi l'implication de la production des ROS dans la formation des ETs de *C. gigas*.

Enfin, nous avons pu observer la présence d'ETs *in vivo*, suite à une blessure ou à une infection. Nous avons en effet mis en évidence par microscopie confocale la présence de filaments d'ADN extracellulaire sur des coupes histologiques de muscle d'huîtres infectées avec LGP32 ou piquées stérilement. Ces filaments ont été observés dans des zones fortement infiltrées en hémocytes, au niveau du tissu interstitiel situé entre les fibres musculaires, en périphérie de la blessure créée par l'aiguille. De plus, grâce à la reconstruction en 3 dimensions des coupes histologiques étudiées, nous avons confirmé la présence de cellules intactes au-dessus et en dessous des ETs, indiquant que ces filaments d'ADN ne sont pas dus à des dommages faits aux noyaux pendant la préparation des coupes.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer l'existence, chez *C. gigas*, d'un mécanisme antimicrobien encore inconnu, conservé au sein du règne animal.

Lors de ces travaux nous avons testé une autre méthode de quantification des ETs, par suivi de la quantité d'ADN extracellulaire à l'aide de Sytox Green. Cette méthode, mise au point sur notre modèle pendant cette thèse, ne s'est pas révélée assez sensible pour suivre la formation des ETs. Elle a cependant été utilisée par les membres de l'équipe pour quantifier la lyse des hémocytes, notamment due à la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 (annexe I).

## Publication 1 :

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

Aurore C. Poirier, Paulina Schmitt, Rafael D. Rosa, Audrey S. Vanhove, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Tristan P. Rubio, Guillaume M. Charrière and Delphine Destoumieux-Garzón, 2014, "Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*." J Biol Chem. 289(36):24821-31. doi: 10.1074/jbc.M114.576546. Epub 2014 Jul 17.

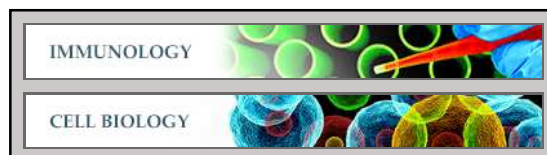
**Immunology:**

Antimicrobial Histones and DNA Traps in  
Invertebrate Immunity: EVIDENCES IN  
CRASSOSTREA GIGAS

Aurore C. Poirier, Paulina Schmitt, Rafael D.  
Rosa, Audrey S. Vanhove, Sylvie  
Kieffer-Jacquod, Tristan P. Rubio, Guillaume  
M. Charrière and Delphine  
Destoumieux-Garzón

J. Biol. Chem. 2014, 289:24821-24831.

doi: 10.1074/jbc.M114.576546 originally published online July 17, 2014



---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.576546](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](http://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2014/07/17/M114.576546.DC1.html>

This article cites 37 references, 8 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/289/36/24821.full.html#ref-list-1>

# Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity

## EVIDENCES IN CRASSOSTREA GIGAS<sup>\*†§</sup>

Received for publication, April 24, 2014, and in revised form, July 1, 2014. Published, JBC Papers in Press, July 17, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.576546

Aurore C. Poirier<sup>†1</sup>, Paulina Schmitt<sup>†§</sup>, Rafael D. Rosa<sup>†1,2,3</sup>, Audrey S. Vanhove<sup>†1</sup>, Sylvie Kieffer-Jaquinod<sup>†1</sup>, Tristan P. Rubio<sup>†</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>†4</sup>, and Delphine Destoumieux-Garzón<sup>†</sup>

From <sup>†</sup>Laboratory of Ecology of Coastal Marine Systems, CNRSUMR5119, University of Montpellier 2, Ifremer, University of Montpellier 1, and IRD, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier, France, the <sup>§</sup>Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Universidad 330, 2373223 Valparaíso, Chile, and <sup>†</sup>INSERM, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Université Joseph Fourier, U1038, Etude de la Dynamique des Protéomes, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

**Background:** How antimicrobial histones participate in invertebrate defense was still unclear.

**Results:** Upon injury or infection, oyster immune cells release antimicrobial histones and extracellular DNA traps in a ROS-dependent manner.

**Conclusion:** DNA traps are involved in the defense of Lophotrochozoa. Their mechanistic bases are shared with vertebrates.

**Significance:** This is a novel mechanism in the evolutionary conserved invertebrate immune arsenal.

Although antimicrobial histones have been isolated from multiple metazoan species, their role in host defense has long remained unanswered. We found here that the hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas* release antimicrobial H1-like and H5-like histones in response to tissue damage and infection. These antimicrobial histones were shown to be associated with extracellular DNA networks released by hemocytes, the circulating immune cells of invertebrates, in response to immune challenge. The hemocyte-released DNA was found to surround and entangle vibrios. This defense mechanism is reminiscent of the neutrophil extracellular traps (ETs) recently described in vertebrates. Importantly, oyster ETs were evidenced *in vivo* in hemocyte-infiltrated interstitial tissues surrounding wounds, whereas they were absent from tissues of unchallenged oysters. Consistently, antimicrobial histones were found to accumulate in oyster tissues following injury or infection with vibrios. Finally, oyster ET formation was highly dependent on the production of reactive oxygen species by hemocytes. This shows that ET formation relies on common cellular and molecular mechanisms from vertebrates to invertebrates. Altogether, our data reveal that ET formation is a defense mechanism triggered by infection and tissue damage, which is shared by relatively distant species suggesting either evolutionary conservation or convergent evolution within Bilateria.

Histones play an essential role in the organization and architecture of the chromatin, and their post-translational modifications are essential to gene regulation (1). Since 1942 (2), histones have been shown to display antimicrobial activities against bacteria, fungi, viruses, and protozoa (3). In Protostomia, antimicrobial histones have been isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* (4), the scallop *Chlamys farrieri* (5), the abalone *Haliotis discus discus* (6), and recently the oyster *Crassostrea virginica* (7, 8). However, the mechanisms facilitating histone release, which is a prerequisite for their antimicrobial activities on potential pathogens, has long remained unidentified.

In 2004, a new antimicrobial mechanism relying on the release, by mammalian neutrophils, of extracellular DNA-carrying histones and granular antimicrobial proteins bound to the decondensed nucleic acids was uncovered (9). More recently, those extracellular traps (ETs)<sup>5</sup> have been observed to form massively in infected tissues by intravital microscopy, demonstrating further their role in host defense (10). ETs can be released in response to bacteria, fungi, parasites, and viruses (9, 11, 12), to microbe-associated molecular patterns such as lipopolysaccharide (LPS), and to host inflammatory signals associated with tissue damage such as interleukin-8 (9) and tumor necrosis factor (13). ETs were reported to entrap bacteria, fungi, and parasites (9, 11, 12) and to kill them by their content in antimicrobial peptides/proteins including histones, bactericidal permeability-increasing proteins, and hydrolases (9, 12, 14–16). However, some bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, and group A *Streptococci* are found entrapped into ETs without being killed (17,

\* This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Vibriogen project, Blanc SVSE7 2011) and the Languedoc-Roussillon region (REVAESP project, Chercheur(se) d'avenir 2009).

† This article contains Online supplement 1.

<sup>1</sup> Supported by a fellowship from the Ministry of Higher Education and Research.

<sup>2</sup> Present address: Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Dept. of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>3</sup> Supported by a fellowship from Ifremer.

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed: Equipe "Réponse immunitaire des macroorganismes marins et environnement," Laboratoire ECOSYM, Université Montpellier 2, CC80, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France. Tel.: 33-467-14-46-25; Fax: 33-467-14-46-22; E-mail: guillaume.charriere@univ-montp2.fr.

<sup>5</sup> The abbreviations used are: ET, extracellular trap; ROS, reactive oxygen species; PMA, phorbol myristate acetate; MIC, minimum inhibitory concentration; DPI, diphenylene iodonium chloride; WGA, wheat germ agglutinin; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate; SSW, sterile seawater; DAMP, damage-associated molecular pattern; HMG, high mobility group; CIP, Collection de l'institut Pasteur.



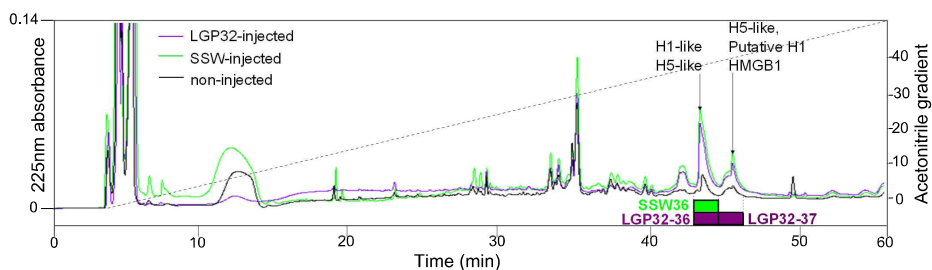


FIGURE 1. Antimicrobials accumulate in oyster gills 24 h after infection or injury. Reversed-phase HPLC was performed on gill extracts from non-injected oysters (black line), SSV-injected oysters (green line), and *V. tasmaniensis* LGP32-injected (LGP32-injected) oysters (purple line) using a 0–80% acetonitrile gradient (dotted line) developed over 90 min, on a UP50DB-25QS column. Absorbance at 225 nm (continuous lines) showed an increase in intensity for the fractions eluted at 36% of acetonitrile in LGP32-injected (LGP32–36) and SSV-injected oysters (SSW36) and for the fraction eluted at 37% of acetonitrile in LGP32-injected oysters (LGP32–37). Purple and green oblongs show antimicrobial fractions in LGP32-injected and SSV-injected oysters, respectively. LGP32–36, LGP32–37, and SSW36 were the only fractions showing antimicrobial activity against *S. aureus* SG511. The molecules found by LC-MS/MS in active fractions are displayed with arrows.

18). ETs can then play two important roles in the control of infections, first by entrapping microbes and preventing their dissemination, and second by concentrating antimicrobials and potentially killing microbes (10, 16, 19).

Although ETs have been well studied in vertebrates (Deuterostomia) over the past decade, studies on invertebrates have remained sparse and limited to arthropods (Ecdysozoa, Protostomia). In 2008, a first report suggested that extracellular nucleic acids enhance immunity and induce hemolymph coagulation in *Galleria mellonella* (20). More recently, an *in vitro* study showed that hemocytes from the shrimp *L. vannamei* release ETs able to entrap bacteria upon challenge with LPS, phorbol myristate acetate (PMA), or bacteria (21). To the best of our knowledge, clear evidences of ETs formation *in vivo* and characterization of the underlying mechanisms have not been reported yet in any invertebrate.

Here we performed a comprehensive study on DNA extracellular traps in the defense of a lophotrochozoan, the oyster *Crassostrea gigas*. Our work reveals that *C. gigas* hemocytes form ETs associated with antimicrobial histones both *in vitro* and *in vivo*, in response to infections and tissue damage, and that these ETs can entrap bacteria. By using a quantitative approach, we also show that similar to vertebrate neutrophils, oyster hemocytes require the production of reactive oxygen species to release ETs. Altogether, our data reveal that *C. gigas*, a lophotrochozoan, uses ET formation as defense mechanism that can be triggered by infection and tissue damage. From this study, this defense mechanism is shared by distant species among the main branches of the Bilateria.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cationic Protein Extraction from *C. gigas* Tissues**—*C. gigas* adult oysters were carved in the dorsal side of the shell with a small notch and acclimated for 5 days in seawater tanks. Then, 16 oysters were challenged by injection in the adductor muscle of 100  $\mu$ l of *Vibrio tasmaniensis* LGP32 ( $1 \times 10^7$  CFU/oyster), an oyster pathogen (22) recently assigned to *V. tasmaniensis* within the *Splendidus* clade (23). After 24 h, gills were dissected, frozen at  $-80^\circ\text{C}$ , and ground to fine powder. Gill powder was resuspended in 5% acetic acid and a mixture of protease inhibitors (Sigma). After sonication, proteins were acid-extracted for 3 h at  $4^\circ\text{C}$  and centrifuged

twice at 13,000  $\times$  g,  $4^\circ\text{C}$ , 30 min. pH was adjusted to 6.8 before the addition of a cation exchange resin (CM Macro-Prep, Bio-Rad). After overnight incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the resin was washed with 25 mM ammonium acetate, pH 6.8, and proteins were eluted twice with 1% TFA in ultrapure water.

**Purification of Antimicrobial Proteins**—Cation exchange extracted proteins were fractionated on a C18 reversed-phase HPLC column (UP50DB 25QS, 5  $\mu$ m, 250  $\times$  2.0 mm, Interchim) using a linear gradient of 0% to 80% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) over 90 min at a flow rate of 0.7 ml/min. Fractions were dried under vacuum, dissolved in ultrapure water, and tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* SG511. Antimicrobial fractions were purified by a second step of reversed-phase HPLC (X-bridge BEH130, 4.6 mm  $\times$  150 mm, Waters) using a biphasic gradient of 0–26% and 26–46% acetonitrile in 0.05% TFA over 5 and 80 min at a flow rate of 0.25 ml/min. Fractions were dried under vacuum, dissolved in ultrapure water, and tested for antimicrobial activity.

**Protein Identification**—Purity of active fractions was assessed by MALDI-TOF-MS, while sequences were obtained by nano-LC-MS/MS after digestion with trypsin or V8 endopeptidase. LC-MS/MS spectra were analyzed using the automated Mascot algorithm (Matrix Science Ltd., London, UK), and homology searches of the purified protein sequences were performed using a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Results were validated by the software IRMa (Mascot Results Interpretation). Sequence alignment was performed with the ClustalW2 tool of European Bioinformatics Institute server (EBI).

**Antimicrobial Assays**—Antibacterial activity of HPLC fractions was assayed against the Gram-positive *Micrococcus lysodeikticus* Collection de l'institut Pasteur (CIP) 5345, *Bacillus megaterium* CIP 66.20, *S. aureus* SG 511, as well as the Gram-negative *Escherichia coli* SBS363 and *V. tasmaniensis* LGP32. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined in poor broth (1% Bacto-Tryptone, 0.5% NaCl w/v, pH 7.5) medium by the liquid growth inhibition assay as described previously (24). Poor broth was supplemented with 2.9% NaCl for the marine *V. tasmaniensis*. Incubation was performed for 18 h

under shaking (150 rpm) at 30 °C for *M. lysodeikticus* and *B. megaterium*, at 37 °C for *S. aureus* and *E. coli*, and at 20 °C for *V. tasmaniensis*. Growth was monitored by optical density at 620 nm on a microplate reader infinite M200 (Tecan).

Induction of Extracellular Traps—Hemolymph withdrawn from the oyster pericardial cavity was kept on ice before plating hemocytes on 13-mm glass coverslips in 24-well culture plates at  $2.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. One h after plating, ET formation was induced by adding *V. tasmaniensis* LGP32, *V. tasmaniensis* LMG20012T, *Brevibacterium stationis* CIP 101282, or Zymosan particles to hemocytes at a multiplicity of infection of 50:1. Plates were centrifuged for 5 min at 500  $\times$  g to synchronize binding and further incubated at 20 °C for 30 min, 1 h, or 2 h. To assess the involvement of reactive oxygen species (ROS) in ET formation, hemocytes were pretreated with 10  $\mu$ M diphenyleneiodonium chloride (DPI, Sigma) for 1 h before microbial challenge. For microscopy analyses of living cells, 0.5  $\mu$ M Sytox Green nucleic acid stain (Molecular Probes) was added to hemocytes. Live imaging was performed on an Axiovert 200M Zeiss inverted microscope. For other experiments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min and stained with 1.25  $\mu$ g/ml DAPI (Sigma) and either 16.5 nM phalloidin-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) or 2  $\mu$ g/ml wheat germ agglutinin (WGA)-TRITC (Sigma). Immunostaining was performed with a rabbit anti-H5-like histone antibody generated against the NH<sub>2</sub>-TPKPAKAKKAAKPKKPASHC-COOH

peptide conjugated to Keyhole limpet hemocyanin (KLH) (Proteogenix). Fixed and permeabilized hemocytes were first incubated for 45 min in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl and then for 20 min in PBS containing 5% BSA. Then, 20  $\mu$ g/ml antibody dissolved in PBS containing 5% BSA was added to coverslips and incubated for 1 h. After three washes in PBS, 10  $\mu$ g/ml anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 was added and incubated for 1 h. Coverslips were then washed, stained with DAPI, and mounted with fluorescent mounting medium (DAKO).

Monitoring of Reactive Oxygen Species Production—Hemocytes freshly withdrawn from oysters were plated on a 96-well plate at a density of  $6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. After 1 h of incubation at 17 °C to let the cells settle down, the wells were washed with sterile seawater (SSW) and incubated for 1 h in SSW supplemented with 1  $\mu$ M luminol (Sigma). Then, zymosan particles (at a multiplicity of infection of 50:1) or PMA (at a final concentration of 1  $\mu$ M, Sigma) were quickly added, and the plate was immediately placed into a microplate reader infinite M200 (Tecan) to quantify the luminescence emission every 2 min for 2 h. To inhibit ROS production, 10  $\mu$ M DPI was added to hemocytes 1 h before the addition of ROS inducers (PMA or zymosan).

Histology—Whole oysters were fixed with Davidson's fixative for 42 h. After dissection, muscles and gills were embedded in paraffin. Histological sections and hematoxylin-eosin staining were performed at the technical platform of RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier UMS3426 CNRS, US9 INSERM, University Montpellier 1 and 2). After rehydration, histological sections were permeabilized with 0.01% Triton X-100 for 10 min, washed three times in PBS, and stained with 0.25  $\mu$ g/ml DAPI for 1 h. After three washes in PBS, coverslips were mounted over histological sections with fluorescent mounting medium (DAKO).

Image Acquisition and Extranuclear Histone Quantification—Histological sections stained with DAPI; coverslips labeled with DAPI, WGA-TRITC, and phalloidin were observed with 40 $\times$  or 63 $\times$  objectives, and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope. Extranuclear histones were quantified on hemocytes immunostained with anti-H5-like histone antibody and counterstained with DAPI using a method adapted from Brinkmann et al. (25). Briefly, for every conditions, 80 images were taken randomly over the entire surface of the coverslip (covering more than a thousand hemocytes) using a 40 $\times$  objective on a Zeiss Axio Imager upright fluorescence microscope

TABLE 1

MICs of native H1-like histone (GenBank EKC17653)

	MIC
	$\mu$ M
<i>M. lysodeikticus</i> CIP 53.45	0.7
<i>B. megaterium</i> CIP 66.20	0.18
<i>S. aureus</i> SG511	0.7
<i>E. coli</i> SBS363	0.7
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32	$\leq$ 0.7

TABLE 2

Estimated MIC of the LGP32–36 HPLC fraction

	MIC <sup>a</sup>
	$\mu$ M
<i>M. lysodeikticus</i> CIP 53.45	0.35
<i>B. megaterium</i> CIP 66.20	0.35
<i>S. aureus</i> SG511	0.7
<i>E. coli</i> SBS363	0.7
<i>V. tasmaniensis</i> LGP32	$\leq$ 0.7

<sup>a</sup> MICs were determined in  $\mu$ g/ml and converted into  $\mu$ M considering an average molecular mass of 20176 Da (Fig. 2).

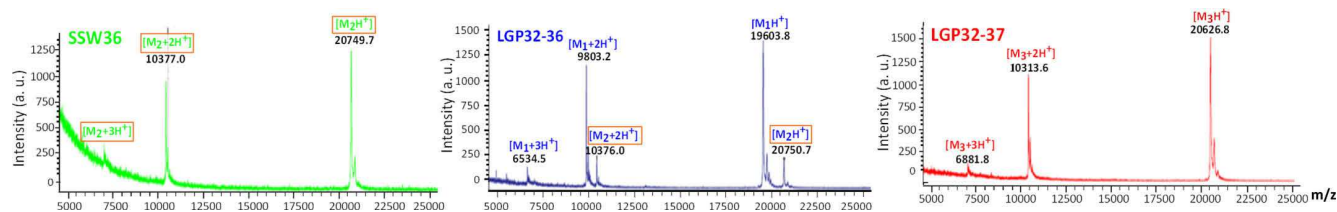


FIGURE 2. Mass spectrometry analysis of antimicrobial HPLC fractions. MALDI-TOF spectra were acquired on the antimicrobial fractions issued from two rounds of reversed-phase HPLC. The SSW36 fraction (green) is pure, showing single-, double-, and triple-charged ions of one single molecule (molecular mass M2) at MH<sup>+</sup> # 20,749.7 Da. The LGP32–36 fraction (blue) contains two molecular species, showing ions of one major molecule (molecular mass M1) at MH<sup>+</sup> # 19,603.8 Da and ions of a minor molecule at MH<sup>+</sup> # 20,750.7 Da also found in SSW36. The LGP32–37 fraction (red) is pure, showing ions of one single molecule (molecular mass M3) at MH<sup>+</sup> # 20,626.8 Da. a.u., arbitrary units.



# DNA Extracellular Traps in Oyster Defense

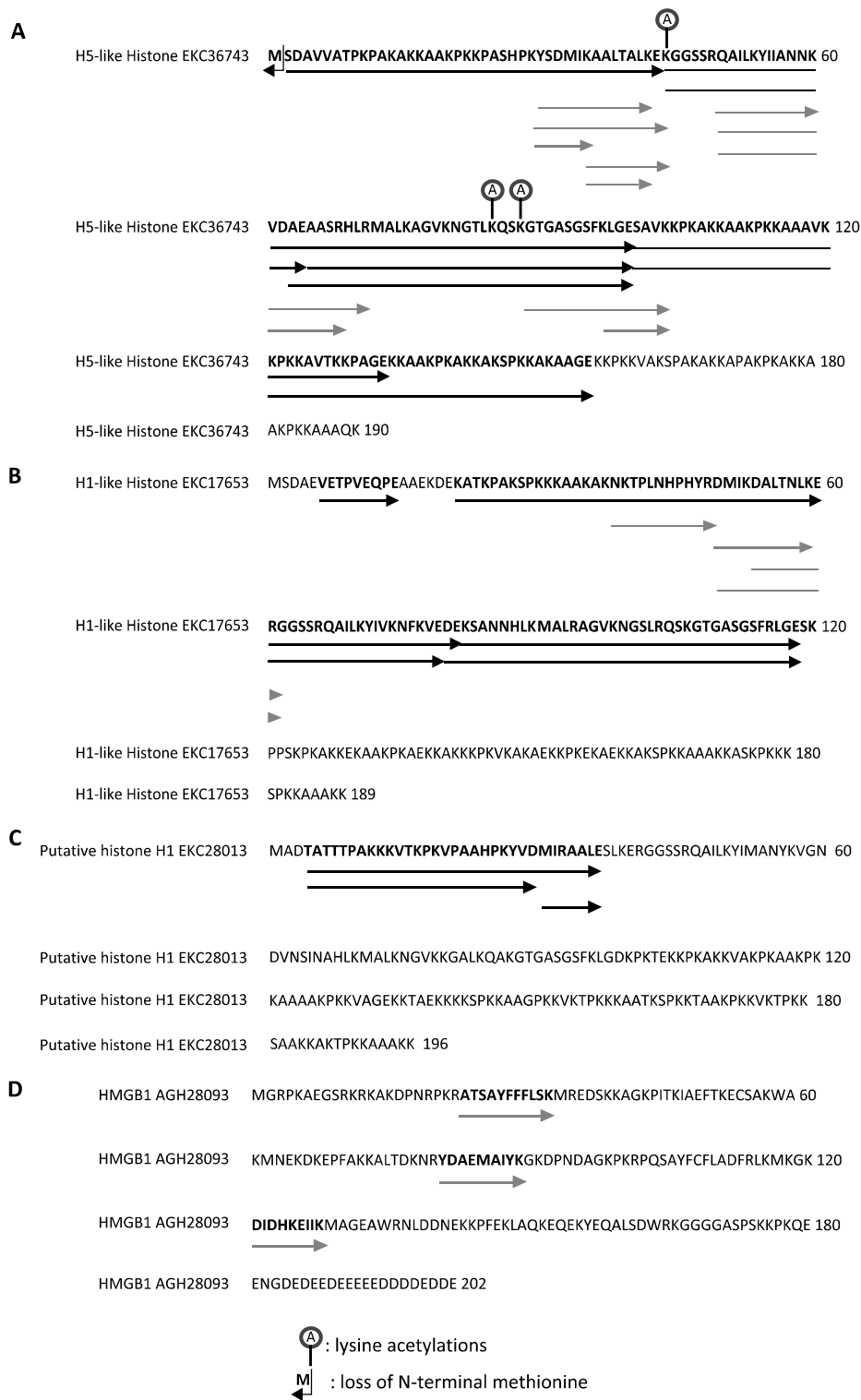


FIGURE 3. Alignment of LC-MS/MS sequenced peptides with the full-length sequences of H1- and H5-like histones and HMGB1. A–D, H1-like histone (A), H5-like histone (B), putative H1-like histone (C), and HMGB1 (D) full sequences were aligned with LC-MS/MS peptides. Black arrows indicate peptides obtained after endopeptidase V8 digestion, and gray arrows indicate for peptides obtained after trypsin digestion. Sites of acetylation observed by LC-MS/MS are displayed above the sequences.

equipped with an AxioCam MRm 2 digital microscope camera. The image files were then analyzed with Fiji software (26). For every image, the DAPI-stained nuclei of hemocytes

were counted. The total area revealed by anti-H5-like histone staining and the total area revealed by DNA staining DAPI-staining were measured in  $\mu\text{m}^2$ . The area occupied by

extranuclear histones only was obtained by subtracting the DAPI-stained area to the anti-H5-like histone stained area. The area of extranuclear histones was finally divided by the number of counted hemocytes (nuclei) to normalize on hemocyte density ( $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ).

## RESULTS

**Antimicrobials Accumulate in Oyster Gills 24 h after Infection or Injury**—Antimicrobial peptides/proteins were isolated from gills of oysters 24 h after an intramuscular injection of *V. tasmaniensis* LGP32 (LGP32) or SSW. For that, the dissected gills were subjected to acid extraction, cation exchange chromatography, and reversed-phase HPLC. Gills of non-injected oysters were used as a negative control. Two absorbance peaks strongly increased upon injection (Fig. 1). The corresponding HPLC fractions were the only fractions showing antimicrobial activity against *S. aureus* SG511 (Fig. 1, Tables 1 and 2). Two were isolated from LGP32-injected oysters (LGP32–36 and LGP32–37), and one was isolated from SSW-injected oysters (SSW36). No antimicrobial activity could be recorded in any fractions isolated from non-injected oysters.

After a second reversed-phase HPLC step, the active fractions were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 2). The SSW36 fraction contained one single molecule with a measured molecular mass of 20,748.7 Da. The LGP32–36 fraction contained two molecules: a major one of 19,602.8 Da and a minor one of 20,749.7 Da, similar to that found in the SSW36 fraction. Finally, the LGP32–37 fraction contained one single molecule of 20,625.8 Da (Fig. 2).

**H1- and H5-like Histones Are the Major Antimicrobials of Challenged Oyster Gills**—The SSW36, LGP32–36, and LGP32–37 antimicrobial fractions were analyzed further by LC-MS/MS after trypsin and endopeptidase V8 digestion. Histones were found in all three fractions (Fig. 1). An H5-like histone (GenBank™ EKC36743) present in the three fractions was identified with a coverage of 81.6% (Fig. 3A). From the molecular mass measured by MALDI-TOF on the LGP32–36 fraction (19,602.8 Da) (Fig. 2) and from the modifications observed by MS/MS sequencing (Fig. 3), it could be deduced that it lacks its N-terminal methionine ( $\approx 131$  Da) and carries one lysine acetylation ( $\approx 42$  Da) (calculated mass # 19,601.8 Da). An H1-like histone (GenBank EKC17653) only found in LGP32–36 and SSW-36 was identified with a coverage of 57.1% (Fig. 3B). This lower coverage prevented its post-translational status to be established accurately. Finally, traces of a putative histone H1 (GenBank EKC28013) and an high mobility group 1 domain protein (HMGB1, GenBank AGH28093) were found in the LGP32–37 fraction (Figs. 1 and 3, C and D). Interestingly, this accumulation of antimicrobial histones in oyster tissues in response to damage/infection (Fig. 1) correlated with hemocyte infiltration in gill tissue (Fig. 4). This suggests that H1-like and H5-like antimicrobial histones could be brought by hemocytes.

**Oyster Histones Present Potent Antibacterial Activity**—Due to minute amounts of native proteins purified to homogeneity from oyster tissues, only the H1-like histone (isolated from SSW36) was tested for antimicrobial activity in a low range of concentrations ( $0\text{--}0.7 \mu\text{M}$ ). Potent activities were observed against *M. lysodeikticus* CIP 53.45, *S. aureus* SG511, *E. coli* SBS363, and

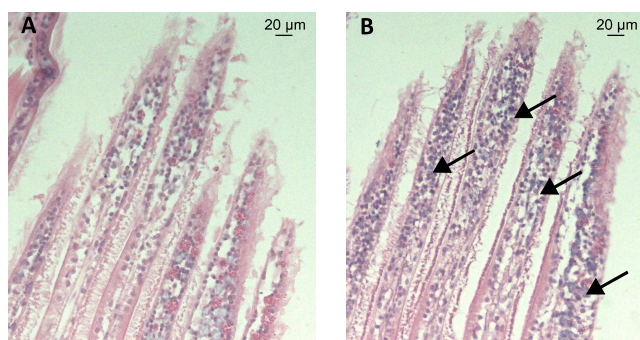


FIGURE 4. Hemocyte infiltration in gills of LGP32-infected oysters. A and B, histological sections of gills of unchallenged oyster (A) and of oysters infected for 24 h with *V. tasmaniensis* LGP32 (B). Hematoxylin-eosin staining shows a major hemocyte infiltration in gills of oyster infected with *V. tasmaniensis* LGP32.

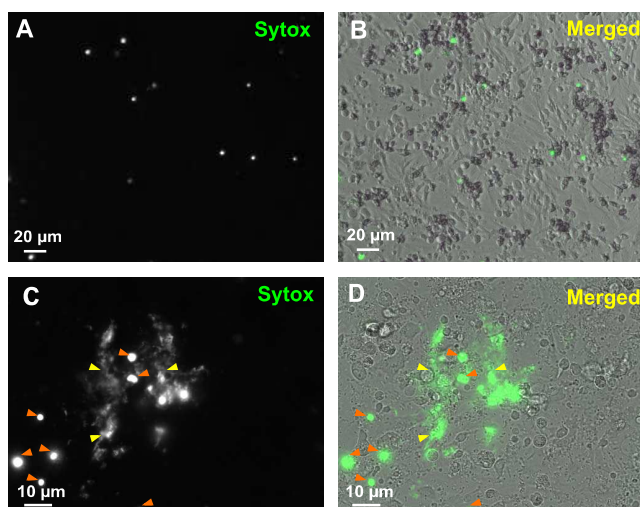
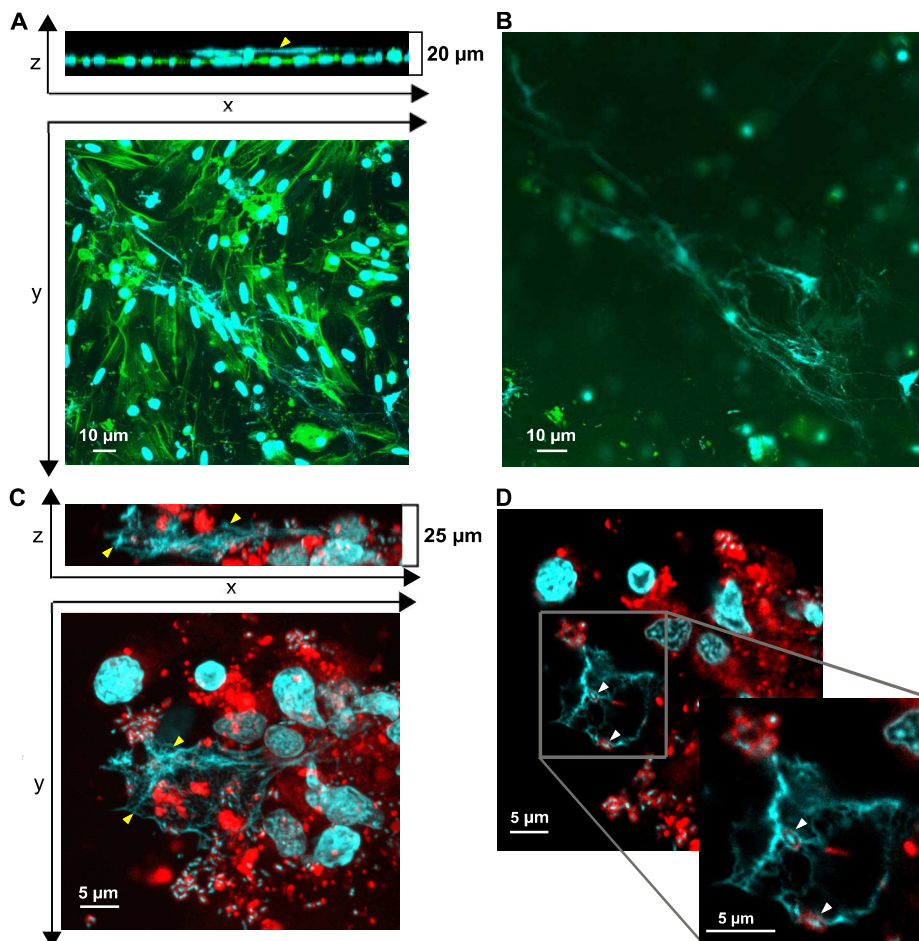


FIGURE 5. Living oyster hemocytes release extracellular DNA upon bacterial challenge. A–D, cultures of unchallenged hemocytes (A and B) and hemocytes challenged for 45 min with *V. tasmaniensis* LGP32 (C and D) were stained with Sytox Green and observed by epifluorescence microscopy to reveal extracellular DNA and dead cell nuclei. B and D, bright field images acquired to visualize total cells were merged to epifluorescence images. C and D, extracellular DNA networks (yellow arrowheads) were observed in areas where cells are dead (orange arrowheads) after *V. tasmaniensis* LGP32 challenge only.

*B. megaterium* CIP 66.20 with MICs  $\leq 0.7 \mu\text{M}$  but not against *V. tasmaniensis* LGP32 (Table 1). The MICs estimated for LGP32–36, which contains the H5-like histone together with low amounts of H1-like histone, were also in the low micromolar range against most of the tested strains (Table 2).

**Oyster Hemocytes Release DNA Extracellular Traps in Response to Bacterial Challenge**—To identify the defense mechanism by which histones are released in oyster tissues, oyster hemocytes were challenged with LGP32 *in vitro*. The cell-impermeant nucleic acid dye, Sytox Green, added to the primary cultures revealed clusters of permeabilized cells and extracellular DNA only 45 min after LGP32 challenge, whereas most of the hemocytes remained unstained (Fig. 5, C and D). In control hemocytes, permeabilized cells were rarely detectable without any visible extracellular DNA (Fig. 5, A and B). To get higher imaging resolution of the extracellular DNA structures, confocal microscopy was per-



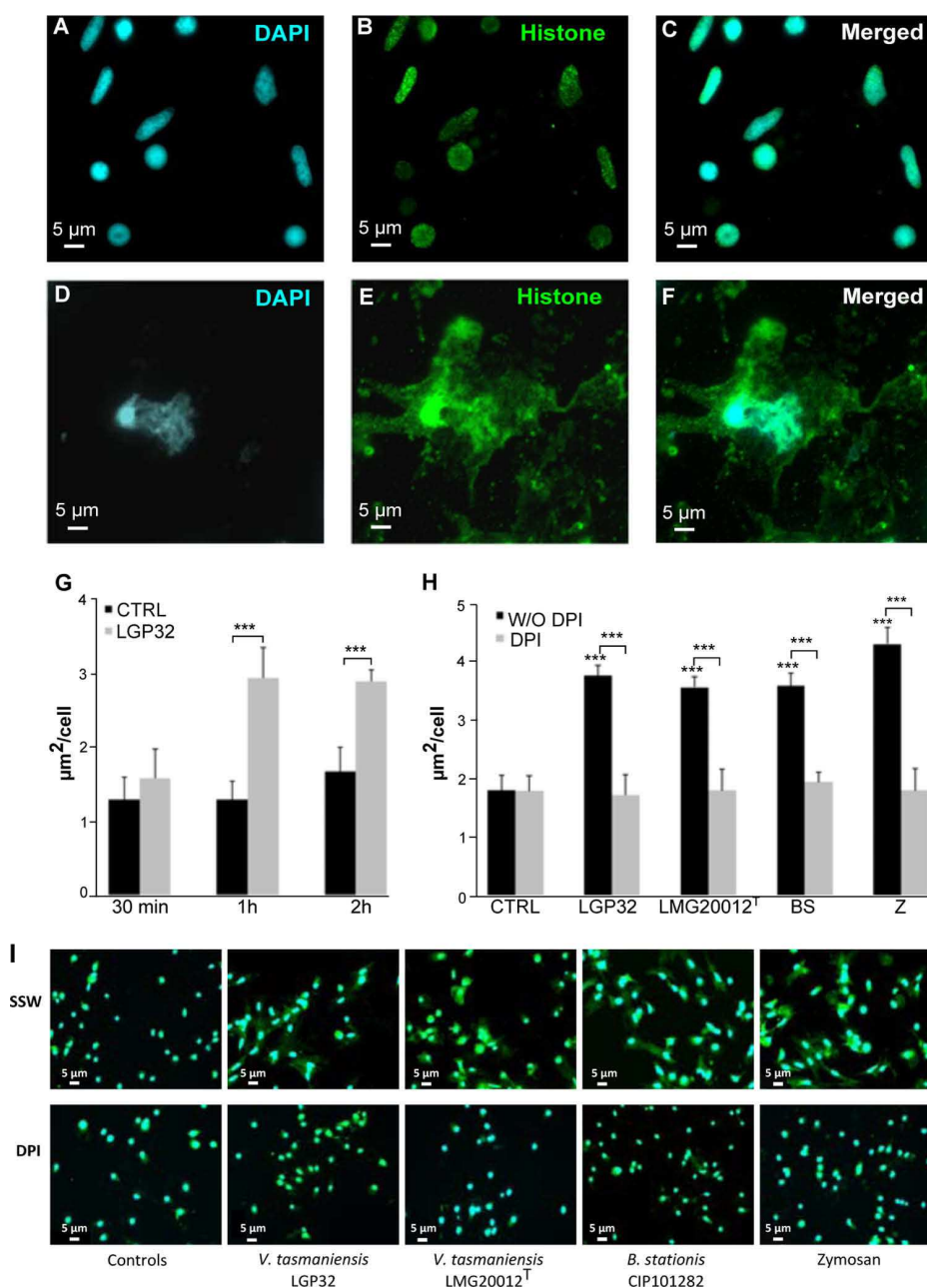
**FIGURE 6.** Oyster hemocytes release DNA extracellular traps in which bacteria are entrapped. **A** and **B**, DNA ETs released by oyster hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32. Confocal microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and filamentous actin with phalloidin-Alexa Fluor 448 (green). **A**, projections of a z stack and a y stack made from 20 confocal sections. An extracellular DNA ET can be observed extending from 5 to 10  $\mu\text{m}$  above the layer of adherent hemocytes (yellow arrowhead). **B**, an upper confocal section depicting the longest ET observed in the preparation. **C** and **D**, bacteria entrapped in ETs of hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32. Confocal microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and cellular membranes with WGA-TRITC (red). **C**, projections of a z stack and a y stack made from 125 confocal sections. ETs stained with DAPI (yellow arrowheads) were observed in areas with a high bacterial density and extending up to 10  $\mu\text{m}$  above adherent hemocytes. **D**, bacteria were found entrapped in ETs (white arrowheads), as revealed by their blue nucleic acid staining (DAPI) and red membrane staining (WGA-TRITC) on one representative confocal section of 0.2- $\mu\text{m}$  thickness. See [Online supplement 1](#) for full z-stack.

formed. Extracellular networks of DNA filaments were observed 1 h after LGP32 challenge. They were found to extend 5–10  $\mu\text{m}$  above the hemocyte monolayer whose actin cytoskeleton was stained with fluorescent phalloidin (Fig. 6, **A** and **B**). To determine whether vibrios could be entrapped into the extracellular DNA, confocal three-dimensional imaging was performed at a higher magnification after staining the bacterial cell wall with the WGA-TRITC lectin. Numerous vibrios were found entrapped in these extracellular DNA networks as shown on a representative confocal section (0.2- $\mu\text{m}$  thickness) (Fig. 6, **C** and **D**) and in the reconstituted z-stack containing all the focal planes ([Online supplement 1](#)). Altogether, these data show that (i) *C. gigas* hemocytes can form large DNA ETs upon challenge with *V. tasmaniensis* LGP32, and (ii) vibrios are entrapped into these ETs.

**Release of H5-like Histones Is Associated with ET Formation and Dependent on the Production of ROS**—To determine whether the antimicrobial histones isolated from gills of infected/wounded oysters could be released during ET for-

mation, a polyclonal antibody was raised against an N-terminal peptide designed on the sequence of the H5-like histone. Immunostaining was performed on both control and LGP32-challenged hemocytes. As expected, in control hemocytes, H5-like histones were found only within hemocyte nuclei (Fig. 7, **A–C** and **I**). Conversely, in LGP32-challenged hemocytes, a significant amount of H5-like histones was found to be extranuclear both in the cytosol and in the extracellular space surrounding ETs, showing that H5-like histones are released along with DNA during ET formation (Fig. 7, **D–F** and **I**). Thanks to the H5-like histone immunostaining, we were able to develop a method by automated image analyses to quantify the release of H5-like histone by oyster hemocytes, which is indicative of ET formation (see “Experimental Procedures”). In control hemocytes, the amounts of extranuclear histones remained stable over time (Fig. 7G). In accordance with our previous observations (Figs. 5 and 6), a significant nuclear release of H5-like histones was measured in LGP32-challenged hemocytes as soon



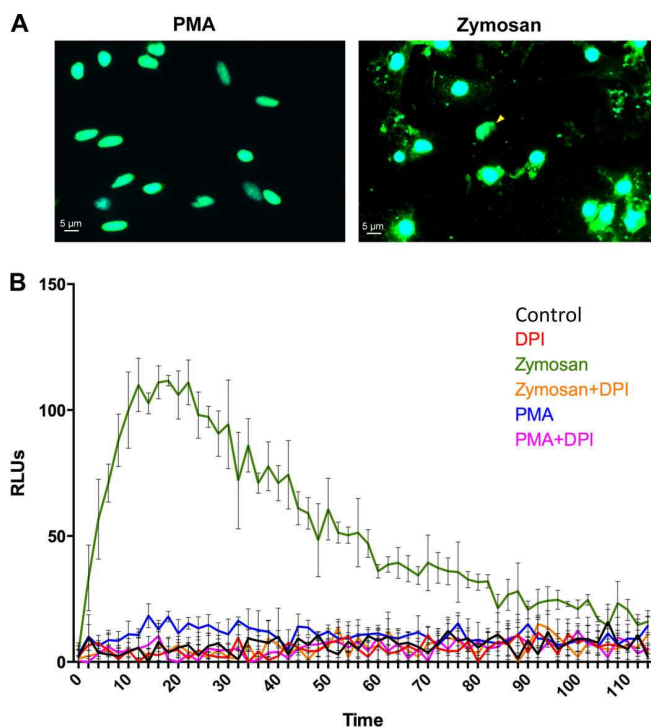


**FIGURE 7.** ET release is triggered by different microbes and depends on ROS production. A–F, H5-like histone immunostaining of ETs. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue, A and D) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green, B and E). In unchallenged hemocytes (A–C), H5-like histones co-localized with nuclear DNA (merge in C). In hemocytes challenged for 1 h with *V. tasmaniensis* LGP32 (D–F), H5-like histones formed large extranuclear areas around ETs (merge in F). G, time course of ET formation in response to challenge with *V. tasmaniensis* LGP32. Extranuclear histone areas ( $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ ) were similar to unchallenged hemocytes (controls (CTRL), black) at 30 min. A 2-fold increase was observed 1 and 2 h after *V. tasmaniensis* LGP32 challenge (*V. tasmaniensis*, light gray). Averages and standard deviations were calculated from two independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$  (Student's *t* test). H, inhibition of ET formation upon blocking of ROS production. *V. tasmaniensis* LGP32 (LGP32), *V. tasmaniensis* LMG20012<sup>I</sup> (LMG20012<sup>I</sup>), *B. stationis* CIP101282 (BS), or zyosan (Z) triggered similar ET formation (black) after a 1-h challenge as indicated by extranuclear histone quantification. In all challenge conditions, DPI treatment (light gray) was sufficient to inhibit release of extranuclear histone down to levels of unchallenged hemocytes. Averages and standard deviations were calculated from three independent experiments. \*\*\*,  $p < 0.001$  (Student's *t* test). I, the most representative photographs of the hemocyte response to microbial challenge in the presence/absence of DPI. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green). The extracellular histones observed in non-treated samples (SSW) are absent in DPI-treated samples. Sets of eighty similar images were used for extranuclear histone quantification.

as 1 h after challenge with a 2-fold increase in the average size of extranuclear histone areas ( $p < 0.001$ , Fig. 7G). There was no significant difference in the amount of extranuclear histones between 1 and 2 h, indicating that the release of H5-like histone and ET formation was rapid and synchro-

nized for most hemocytes capable of forming ETs in our experimental conditions.

To investigate the diversity of microbial challenges that could trigger ET formation, different bacterial strains and microbe-associated molecular patterns were tested including



**FIGURE 8.** Zymosan but not PMA induces ROS production and ET formation by oyster hemocytes. **A**, representative photographs of the hemocyte response to stimulation with PMA or zymosan. Epifluorescence microscopy images were acquired after staining of DNA with DAPI (blue) and immunostaining of *C. gigas* H5-like histones (green). The extranuclear histones and ETs observed in zymosan-stimulated samples are absent in PMA-stimulated samples. **B**, ROS production was monitored in control hemocytes (black line) and after hemocyte stimulation with PMA (blue line) or zymosan (green line). The inhibition of ROS production by DPI treatment was monitored in control hemocytes (red line), PMA-stimulated hemocytes (pink line), and zymosan-stimulated hemocytes (orange line). Results are expressed in relative luminescence units (RLUs) indicative of luminol oxidation. Averages and standard deviations were calculated from three independent experiments.

the Gram-negative *Vibrio tasmaniensis* LMG20012<sup>T</sup> and LGP32, the Gram-positive *B. stationis* CIP 101282, and zymosan particles used as a yeast surrogate. All of them induced a massive release of H5-like histones indicative of ET formation without significant difference between microbial challenges (Fig. 7, H and I). As neutrophil ET formation in mammals has been shown to depend on the production of ROS (27), a ROS production inhibitor (DPI) was used in our assays. Remarkably, DPI treatment was sufficient to completely inhibit the release of extranuclear H5-like histones, whose quantities remained as low as in unchallenged hemocytes for any kind of microbial challenge (Fig. 7, H and I).

To determine whether ROS production is sufficient to induce ET formation by oyster hemocytes, we used PMA, a well described inducer of oxidative burst and ET formation in mammalian neutrophils (27). Surprisingly, in contrast to zymosan, PMA did not induce ET formation nor the release of extranuclear H5-like histones by hemocytes (Fig. 8A). This correlated with a lack of ROS production in PMA-stimulated hemocytes, as determined by chemiluminescence (Fig. 8B). On the contrary, zymosan induced a strong oxidative burst in hemocytes, which correlated with the induction of ET formation and the release of extranuclear H5-like histones (Fig. 8, A and B). Sup-

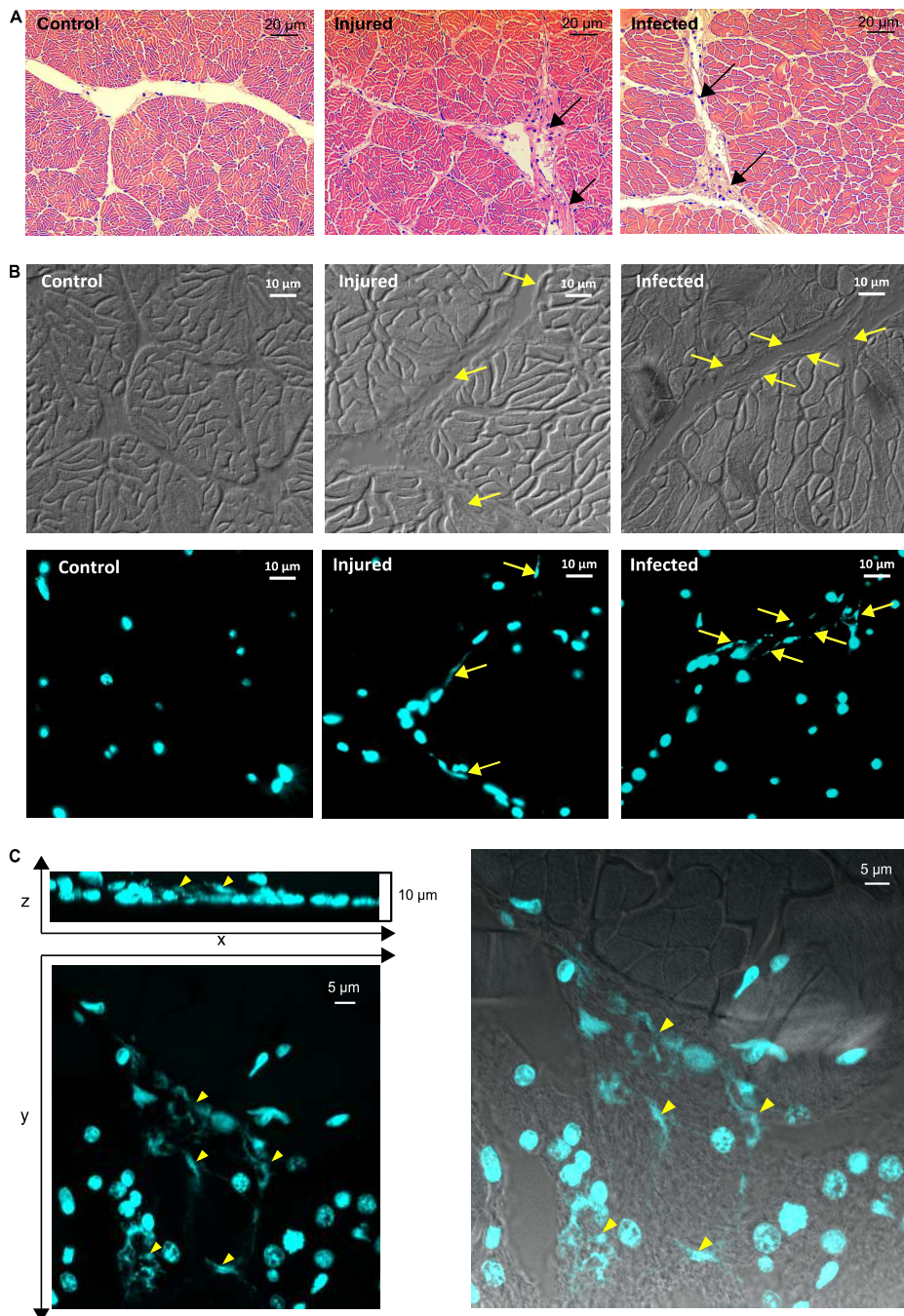
porting the hypothesis of a ROS-dependent process, DPI was sufficient to inhibit zymosan effects, i.e. ROS production (Fig. 8B) and ET formation (Fig. 7). Taken together, these results show that ET formation in *C. gigas* hemocytes can be triggered by a broad diversity of microbial agents and depends strongly on ROS production.

**ETs Are Observed in Vivo in Infected or Wounded Tissues—** Finally, we assessed whether ETs could form in vivo. Oysters were either challenged with a sublethal injection of *V. tasmaniensis* LGP32 or injured by a sterile puncture in the adductor muscle. Massive hemocyte infiltrations were observed in gills (Fig. 4) and in the adductor muscles (Fig. 9A). In gills, the high hemocyte density precluded the imaging resolution needed to observe extracellular DNA filaments. In adductor muscles, cell infiltrates were found within interstitial tissue between fascicles of muscle fibers at the wound periphery in both LGP32-challenged and injured oysters 1 day after the challenge (Fig. 9, A and B). More importantly, DNA filaments were observed in these hemocyte-infiltrated regions, whereas only intact cell nuclei were observed in control animals after DAPI staining (Fig. 9C). Confocal microscopy was performed on a thick tissue section to get a better three-dimensional reconstruction of the areas containing extracellular DNA. Images confirmed the presence of ETs between fascicles of muscle fibers, and in the z-projected image, intact cell nuclei were observed above and below the ET areas, indicating that the DNA was not released as a result of any nuclei damaging during the preparation of histological sections (Fig. 9C). Taken together, these data showed that infiltrating hemocytes can release ETs in vivo in response to infection or tissue damage.

## DISCUSSION

Results showed that antimicrobial histones accumulate together with extracellular DNA in oyster tissues in response to infection and injury. Tissues of non-injected oysters were devoid of such antimicrobial histones (Fig. 1), indicating that histone accumulation in tissues was induced by the challenges. The major antimicrobial histones isolated here were H5-like and H1-like histones. Antimicrobial H2B and H4 histones have also been isolated from another oyster species, *C. virginica* (7) (8). Similar to our observations, protein levels of H4 histone strongly increased in hemocyte lysates and extracellular hemolymph of *C. virginica* oysters infected with *Perkinsus marinus* (8). Therefore, accumulation of histones in oyster tissues could be a common response to infection and injury.

The antimicrobial histones isolated from oyster gills showed a broad spectrum of antimicrobial activities with MICs as low as 0.18  $\mu$ M against *Bacillus megaterium* CIP 66.20 for native H1-like histone (Table 1). Together with oyster defensins (24), the H1-like histone is therefore one of the most potent antimicrobials of *C. gigas* described so far. No activity could be recorded against the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32, whereas the H2B and H4 histones from *C. virginica* were reported to be active against vibrios (7, 8). This may be due to the intrinsic resistance of *V. tasmaniensis* LGP32 to antimicrobials (28) or to the low range of concentrations tested (0–0.7  $\mu$ M). Because tissues of *C. gigas* oysters are poor in antimicrobial peptides/proteins (29), the isolation of histones as the only



**FIGURE 9.** ETs are observed *in vivo* in muscles of infected or injured oysters. **A**, hematoxylin-eosin stained adductor muscles of unchallenged (Control), *V. tasmaniensis* LGP32-infected, and injured oysters. Infiltrating hemocytes are found between muscle fascicles after injury (black arrows, middle panel) or after infection (black arrows, right panel). **B**, epifluorescence microscopy observation of DAPI-stained ETs within histological sections of muscle infiltrated with hemocytes. Contrast phase images are shown below epifluorescence images. ETs are observed in cell-infiltrated interstitial tissues between fascicles of muscle fibers after injury (yellow arrows, middle panel) or after *V. tasmaniensis* LGP32 infection (yellow arrows, right panel). No ETs are observed in muscle of control animals (left panel). **C**, confocal microscopy observation of DAPI-stained ETs within a thick histological section of muscle infiltrated with hemocytes. Projections of a z stack and a y stack display several ETs (yellow arrowheads, left panel). Intact cell nuclei are observed above and below ETs (z projection, left panel). Superposition of the phase confocal section and y projection (right panel) shows that ETs located in cell-infiltrated interstitial tissues between fascicles of muscle fibers.

antimicrobials found in gills of challenged oysters strongly argues in favor of their role in the oyster antimicrobial defense.

*In vitro*, antimicrobial histones were rapidly released (in less than 1 h) by oyster hemocytes together with extracellular DNA when exposed to diverse microbial agents (Figs.

5–8 and [Online supplement 1](#)). Importantly, this phenomenon was also observed *in vivo* (Fig. 9). Indeed, both LGP32-infected and injured oysters showed a massive hemocyte infiltration and release of extracellular DNA in tissues surrounding the site of injury (Fig. 9). These DNA structures are



reminiscent of the neutrophil ETs well studied in vertebrates such as mammals, birds, and fish over the past decade (15, 16, 30). In the present work, bacteria were found entrapped into such extracellular DNA networks (Fig. 6 and Online supplement 1). This strongly suggests that, as in vertebrates, oyster ETs participate in host defense by capturing large numbers of microbes and preventing their dissemination (16). Surrounding and entangling of bacteria in DNA or peptide networks are indeed increasingly recognized as conserved mechanisms of antimicrobial defense (31). Moreover, as shown in some vertebrates, the antimicrobial properties of the ET-associated antimicrobials including histones (Table 1) and their concentration on ETs could also contribute to kill the entrapped microorganisms (10, 16, 19).

The formation of oyster ETs was shown here to be dependent on ROS production by hemocytes (Fig. 7H), which results from NADPH-oxidase activity and/or mitochondrial respiration (32). Indeed, we observed a strong positive correlation between ROS production and ET formation (Figs. 7 and 8). This result is particularly important because ROS play a central role in initiating ET formation in vertebrates (27). However, unlike in vertebrates, PMA failed to trigger the oxidative burst and the formation of ETs by oyster hemocytes under our experimental conditions. Along with ROS, damage-associated molecular patterns (DAMPs) released by injured tissues (33) likely regulate ET formation in oysters. Indeed, we first showed that an aseptic injury is sufficient to induce accumulation of histones and extracellular DNA release in vivo. Second, an HMG domain protein group 1 (HMGB1) was identified in the LGP32–37 HPLC fraction, issued from LGP32-infected oysters (Fig. 1). HMGB1 is a DAMP of intracellular origin well known in vertebrates (34) but also in *C. gigas*, in which it enhances the Rel-dependent NF- $\kappa$ B activation (35). Importantly, HMGB1 was recently shown to promote neutrophil ET formation through TLR-4 activation (36). Therefore, the ROS-dependent production of ETs by oyster hemocytes can be triggered by microbial agents and potentially by DAMPs released in the extracellular milieu in response to injury or cell lysis.

One limitation of the present study is that the hemocyte subset producing ETs has not been identified. We believe that ETs are produced by certain hemocyte subsets only because numerous intact cells are observed in ET-containing regions in both in vivo and in vitro microscopy observations (Figs. 5 and 8). In vertebrates, ETs are formed mostly by neutrophils (9, 15, 16). However, the accurate determination of ET-forming hemocytes remains challenging in oysters, hemocytes subsets being still mainly classified based on morphological features rather than molecular markers (37).

In conclusion, the present study shows that oysters use the release of DNA extracellular traps and antimicrobial histones as part of their immune defense. Therefore, this defense mechanism is shared by relatively distant species belonging to the different branches of the Bilateria, not only the Deuterostomia (mammals, birds, fishes) and the Ecdysozoa (shrimp) but also the Lophotrochozoa (oyster). The identification of ROS as a secondary messenger required for ET formation in oysters supports the evolutionary conservation within Bilateria of an important immune strategy without ruling out the hypothesis

of a convergent evolution between phylogenetically distant species.

**Acknowledgments**—We are grateful to Agnès Vergnes and Marc Leroy for technical assistance. We thank the Montpellier RIO Imaging platform for access to confocal and epifluorescence microscopy, the “Réseau d’Histologie Expérimentale de Montpellier” histology facility for histology expertise and tissue processing, and the mass spectrometry platform of the “Institut des Biomolécules Max Mousseron” for MALDI-TOF-MS.

## REFERENCES

- Parseghian, M. H., and Luhrs, K. A. (2006) Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem. Cell Biol.* 84, 589–604
- Miller, B. F., Abrams, R., Dorfman, A., and Klein, M. (1942) Antibacterial properties of protamine and histone. *Science* 96, 428–430
- Kawasaki, H., and Iwamuro, S. (2008) Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord. Drug Targets* 8, 195–205
- Patat, S. A., Carnegie, R. B., Kingsbury, C., Gross, P. S., Chapman, R., and Schey, K. L. (2004) Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur. J. Biochem.* 271, 4825–4833
- Li, C., Song, L., Zhao, J., Zhu, L., Zou, H., Zhang, H., Wang, H., and Cai, Z. (2007) Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 663–672
- De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Whang, I., Lee, J. S., and Lee, J. (2009) Abhisin: a potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol.* 27, 639–646
- Seo, J. K., Stephenson, J., and Noga, E. J. (2011) Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 158, 223–229
- Dorrington, T., Villamil, L., and Gómez-chiarri, M. (2011) Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 94–101
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., Pittman, K., Asadzaman, M., Wu, K., Mejdert, H. C., Malawista, S. E., de Boisfleury Chevance, A., Zhang, K., Conly, J., and Kubes, P. (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* 18, 1386–1393
- Jenne, C. N., Wong, C. H., Zemp, F. J., McDonald, B., Rahman, M. M., Forsyth, P. A., McFadden, G., and Kubes, P. (2013) Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 13, 169–180
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Wardini, A. B., Pinto-da-Silva, L. H., and Saraiva, E. M. (2012) ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death. *J. Parasitol. Res.* 2012, 929743
- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., and Coonrod, S. A. (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184, 205–213
- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8, 668–676
- Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 577–582
- Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30, 513–521
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., and Henriques-Normark, B. (2006) An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol.* 16, 401–407

18. Ramos-Kichik, V., Mondragón-Flores, R., Mondragón-Castelán, M., Gonzalez-Pozos, S., Muñoz-Hernandez, S., Rojas-Espinosa, O., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S., and Estrada-García, I. (2009) Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* (Edinb.) 89, 29–37
19. McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B. G., Jenne, C. N., and Kubes, P. (2012) Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host. Microbe* 12, 324–333
20. Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T., and Vilcinskas, A. (2008) Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *J Immunol.* 181, 2705–2712
21. Ng, T. H., Chang, S. H., Wu, M. H., and Wang, H. C. (2013) Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 644–651
22. Gay, M., Renault, T., Pons, A. M., and Le Roux, F. (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ* 62, 65–74
23. Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R., Fukui, Y., Satomi, M., Matsushima, R., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Christen, R., Maruyama, F., Kurokawa, K., and Hayashi, T. (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritoni* sp. nov. *Front Microbiol.* 4, 414
24. Schmitt, P., Wilmes, M., Pugnère, M., Aumelas, A., Bachère, E., Sahl, H. G., Schneider, T., and Destoumieux-Garzón, D. (2010) Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *J Biol. Chem.* 285, 29208–29216
25. Brinkmann, V., Goosmann, C., Kühn, L. I., and Zychlinsky, A. (2012) Automatic quantification of in vitro NET formation. *Front Immunol.* 3, 413
26. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682
27. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 176, 231–241
28. Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol.* 12, 951–963
29. Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2012) The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: how diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Front Microbiol.* 3, 160
30. Palić, D., Ostojić, J., Andreassen, C. B., and Roth, J. A. (2007) Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 805–816
31. Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S. P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., Winter, M. G., Winter, S. E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N. H., Underwood, M. A., Tsolis, R. M., Young, G. M., Lu, W., Lehrer, R. I., Bäuml, A. J., and Bevins, C. L. (2012) Human  $\alpha$ -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* 337, 477–481
32. Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A. K., and Soudant, P. (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7, e46594
33. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991–1045
34. Rubartelli, A., and Lotze, M. T. (2007) Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* 28, 429–436
35. Li, J., Zhang, Y., Xiang, Z., Xiao, S., Yu, F., and Yu, Z. (2013) High mobility group box 1 can enhance NF- $\kappa$ B activation and act as a pro-inflammatory molecule in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 63–70
36. Tadie, J. M., Bae, H. B., Jang, S., Park, D. W., Bell, C. P., Yang, H., Pittet, J. F., Tracey, K., Thannickal, V. J., Abraham, E., and Zmijewski, J. W. (2013) HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 304, L342–349
37. Bachère, E., Gueguen, Y., Gonzalez, M., de Lorgeril, J., Garnier, J., and Romestand, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol. Rev.* 198, 149–168



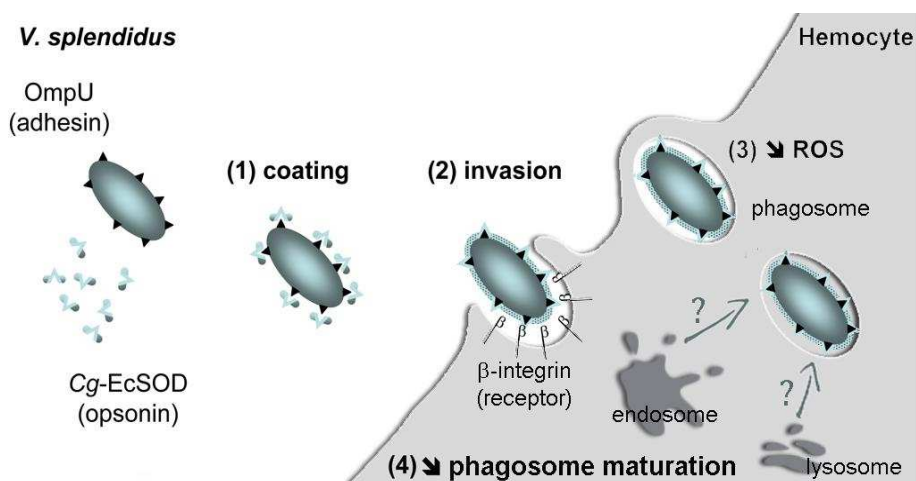
## Section B.

V. tasmaniensis LGP32 résiste à la  
phagocytose des protistes  
hétérotrophes présents dans  
l'environnement des huîtres.

## Section B.

### V. tasmaniensis LGP32 résiste à la phagocytose des protistes hétérotrophes présents dans l'environnement des huîtres.

Dans de précédents travaux, il a été montré que la souche *V. tasmaniensis* LGP32, isolée d'événements de mortalité massive de l'huître *C. gigas* est un pathogène intracellulaire facultatif. Ce *Vibrio* est capable de détourner la phagocytose des cellules immunitaires de *C. gigas*, les hémocytes, afin de les envahir (Duperthuy et al. 2010). Sa virulence dépend de la porine OmpU qui est nécessaire à l'invasion des hémocytes (Figure 19). Une fois à l'intérieur des cellules immunitaires, les bactéries sont capables de survivre en inhibant certains mécanismes de dégradation intracellulaire (Duperthuy et al. 2010).



**Figure 19.** Modèle d'invasion des hémocytes de *C. gigas* par *V. tasmaniensis* LGP32. Le mécanisme d'invasion des hémocytes par *V. tasmaniensis* LGP32 est dépendant d'une intégrine  $\beta$  hémocytaire et fait intervenir OmpU en tant qu'adhésine, et Cg-EcSOD en tant qu'opsonine. Dans ce modèle (1) OmpU de *V. tasmaniensis* LGP32 est reconnu par la Cg-EcSOD qui va alors recouvrir la bactérie. (2) *V. tasmaniensis* LGP32 ainsi opsonisé est reconnu par l'intégrine  $\beta$  des hémocytes ce qui induit (4) l'internalisation de la bactérie dépendante de l'actine et de la clathrine. (5) Une fois internalisé, *V. tasmaniensis* LGP32 inhibe la synthèse de ROS et la formation de vacuoles acides (Duperthuy et al., 2010)

Plus récemment, les travaux réalisés dans l'équipe au cours de cette thèse (annexe I) ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est cytotoxique et induit la lyse des hémocytes de manière dépendante de la phagocytose. Ces travaux ont également identifié la réponse anti-oxydante et l'efflux de cuivre comme des éléments nécessaires à la survie intracellulaire et à la cytotoxicité de cette souche pathogène.

La résistance à la phagocytose étant un élément clé pour la virulence de *V. tasmaniensis* LGP32 chez l'huître, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle ces traits de résistance auraient pu

être acquis et/ou sélectionnés dans l'environnement. En effet, dans le milieu aquatique, les *Vibrio* sont en contact avec des protozoaires environnementaux tels que les amibes ou les ciliés qui se nourrissent de micro-organismes par phagocytose. Or, la phagocytose est un processus très conservé au cours de l'évolution, plus de 73% des protéines du phagosome étant conservées des protistes jusqu'aux mammifères (Boulais et al. 2010). Notre hypothèse de travail est donc que l'émergence des traits de virulence de *V. tasmaniensis* LGP32, et notamment sa résistance à la phagocytose, pourrait provenir de la pression de sélection exercée par les phagocytes environnementaux. Cette hypothèse est soutenue par le fait qu'il a été montré dans la littérature que les vibrios pathogènes humains : *V. cholerae* (Abd et al. 2007b, Abd et al. 2009, Sandstrom et al. 2010, Valeru et al. 2014, Van der Henst et al. 2015) et *V. mimicus* (Abd et al. 2010) sont capables de résister à la phagocytose de l'amibe d'eau douce, *Acanthamoeba castellanii*. Les amibes *Acanthamoeba castellanii* présentes avec *V. cholerae* dans les zones endémiques de cholera (Sandstrom et al. 2010, Shanan et al. 2011) peuvent alors servir de réservoirs environnementaux pour ce pathogène intracellulaire facultatif (Abd et al. 2007b, Abd et al. 2007a, Abd et al. 2009, Sandstrom et al. 2010, Valeru et al. 2014, Van der Henst et al. 2015).

## Principaux résultats

Afin de tester l'hypothèse d'une conservation des mécanismes de résistance à la phagocytose du vibrio pathogène d'huître LGP32 chez les protistes environnementaux, nous avons entrepris une étude pionnière dans laquelle nous avons : (i) caractérisé la survie de LGP32 chez des amibes et autres protistes environnementaux présents dans l'environnement des huîtres, et (ii) comparé les phénotypes de survie et de cytotoxicité de LGP32 à celle d'une autre souche du clade *Splendidus* isolée d'huître mais avirulente (J2-8) (Lemire et al. 2015).

Nous avons d'abord démontré que, contrairement à *V. tasmaniensis* LGP32, la souche J2-8 ne résistait pas à la phagocytose des hémocytes d'huîtres et n'induisait pas la lise des hémocytes. En effet, à l'inverse de LGP32, la souche avirulente J2-8 n'a pas montré de croissance lorsqu'elle était en co-culture avec les hémocytes. De plus, notre test de cytotoxicité a montré que, contrairement à LGP32, J2-8 n'induisait pas la lise des hémocytes par cytotoxicité. Cette souche avirulente a donc été choisie contre contrôle négatif de résistance à la phagocytose pour la suite des manipulations.

Nous avons ensuite montré que des amibes appartenant à l'ordre des Vannellidae étaient présentes à toutes les saisons de l'année dans l'environnement direct des huîtres. Nous avons en effet pu identifier des *Vannella* sp. et des *Platyamoeba* sp. à partir d'échantillons de colonne d'eau,

de branchies d'huître et de sédiment prélevés aux 4 saisons. Une espèce d'amibe appartenant au genre *Acanthamoeba* a également été identifiée à partir de l'échantillon de branchies prélevé en été.

Enfin, nous avons montré que LGP32 résiste à la phagocytose des amibes environnementales et des *Euplotes* sp. Nous avons testé l'effet des souches J2-8 (avirulente) et LGP32 (virulente) sur la croissance d'amibes environnementales, appartenant à une espèce retrouvée aux 4 saisons et dans les 3 compartiments de prélèvement dans l'étang de Thau, ainsi que sur la croissance d'*Euplotes* sp. qui sont des ciliés abondants en milieu marin. Nous avons alors démontré que la souche LGP32 affectait la croissance de ces deux protistes hétérotrophes, en comparaison à J2-8. Ce pathogène intracellulaire facultatif d'huître résiste donc à la dégradation intracellulaire par les protistes environnementaux. De plus, nos images de microscopie confocale ont montré que les LGP32 étaient internalisés par les amibes et les *Euplotes*, suggérant que cette résistance à la phagocytose se fait de manière intracellulaire.

En conclusion, cette étude a permis d'isoler des amibes de l'étang de Thau pour la première fois et de démontrer que *V. tasmaniensis* LGP32 est capable de résister à la phagocytose des protistes hétérotrophes présents dans l'environnement direct des huîtres.

## Publication 2 :

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

Aurore C. Poirier, Cécile Roques, Carmen Lopez-Joven, Tristan P. Rubio, Jean-Christophe Auguet, Julie Nicod, Thibaud Groult, Jean-Luc Rolland, Audrey Caro, Delphine Destoumieux-Garzon and Guillaume M. Charrière. "Phagocytosis resistance against marine grazers by the facultative intracellular pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32". (en préparation)

## Phagocytosis resistance against marine grazers by the facultative intracellular pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32.

Aurore C. Poirier<sup>1,2,3,4</sup>, Cécile Roques<sup>5,1,2,3</sup>, , , Carmen Lopez-Joven<sup>1,2,3,4</sup>, Tristan P. Rubio<sup>1,2,3,4</sup>, Jean-Christophe Auguet<sup>5,1,2,3</sup>, Julie Nicod<sup>1,2,3,4</sup>, Thibaud Grout<sup>1,2,3,4</sup>, Jean-Luc Rolland<sup>1,2,3,4</sup>, Audrey Caro<sup>5,1,2,3</sup>, Delphine Destoumieux-Garzon<sup>1,2,3,4</sup> and Guillaume M. Charrière<sup>1,2,3,4</sup>.

<sup>1</sup> CNRS <sup>2</sup> Ifremer, <sup>3</sup> University of Montpellier, <sup>4</sup> University of Perpignan Via Domitia. Host-Pathogen-Environment Interactions (IHPE), UMR 5244, cc080, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

<sup>5</sup> IRD, University of Montpellier, CNRS, Ifremer. Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (Marbec), UMR 9190, cc093, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France.

To whom correspondence should be addressed: Guillaume M. Charrière. Equipe "Mécanismes d'Interaction et d'Adaptation en Milieu Marin". Laboratoire IHPE, Université de Montpellier, CC80, Place Eugène Bataillon, 34095, Montpellier, France. Tel. +33 467 14 46 25; Email: guillaume.charriere@umontpellier.fr

### ABSTRACT

Heterotrophic protists, such as amoebae and ciliates, play an important ecological role as predators in microbial communities. Because of their close interactions with bacteria they have been suggested to contribute to the evolution of virulence of numerous pathogens. While their phylogenetic diversity is starting to be documented, marine amoebae and their interactions with bacteria remains poorly understood. We previously described that the *Vibrio tasmaniensis* LGP32, an oyster pathogen, resist to phagocytosis by the oyster immune cells, the hemocytes. Here we wondered whether LGP32 also resist to phagocytes in the marine environment. First, we describe the seasonal diversity of the marine amoebae found in the oyster farming area in the Thau lagoon (South of France). Second, we characterized the interactions between environmental heterotrophic protists and two strains of *Vibrio* belonging to the Splendidus clade isolated from oysters: the virulent *Vibrio tasmaniensis* LGP32 and the avirulent *Vibrio crassostreae* J2-8. Analyses of 18S rRNA sequences from all the isolated amoebae showed that they mostly belong to Vannellidae class. In interactions studies, both vibrio strains were internalized by environmental protists, however, only the virulent *V. tasmaniensis* LGP32 resisted to degradation and created cytotoxic damages to the different types of phagocytes. Altogether, these results indicate that the phagocytosis resistance traits of the facultative intracellular pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 are conserved across phagocytes from protozoans to metazoans, and suggest this pathogen could have acquired these important virulence traits as the result of the selective pressure generated by environmental protists. The study of interactions between Vannellidae amoebae and marine vibrios represent promising model to study bacteria phagocytes interactions in marine environment.

## INTRODUCTION

Vibrios are  $\gamma$ -proteobacteria living in aquatic environments ranging from saline to freshwater. They are ubiquitous in marine coastal environments and have evolved the capacity to colonize a broad range of hosts from protozoans to metazoans. Vibrios are normally present in the tissues of healthy animals. Sometimes they become pathogenic in wild marine animals such as corals, in particular as a result of environmental changes including shifts in seawater temperature and salinity, or, for aquacultured animals, upon exposure to high animal densities or stressful farming practices (1). Currently, vibrioses are recognized as a major factor limiting the development of aquaculture. In addition, vibrios can cause severe disease outbreaks in human populations, the best-known example being cholera for which environmental drivers govern the occurrence of the disease in human populations (2). Vibrios have long been considered as extracellular pathogens. However, an increasing number of studies have demonstrated that pathogenic *Vibrio* species can adopt intracellular stages. Indeed, the capacity to invade host cells and survive in these cells were reported for several vibrios pathogenic for humans, including strains of *Vibrio cholera* (3), or *Vibrio parahaemolyticus* (4-6) but also for animal pathogens like *Vibrio shiloi* (7) and *Vibrio coralliilyticus* (8), which have the ability to invade coral epithelial cells and this ability is essential for their pathogenic process. Similarly, we found that the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 (previously assigned to *V. splendidus*) enters and survives in oyster immune cells, the hemocytes, and this intracellular stage is required for virulence in oysters (9). Entry into hemocytes was required for this pathogen to create cytotoxic damages to oyster immune cells and the molecular functions required for survival in such a hostile intracellular environment were identified (10).

LGP32 was shown to be associated with plankton fractions and found in sediment of the Goro lagoon (11). Moreover, it was found to be able to form biofilms and to adhere to chitin rich surfaces (11). Therefore we studied the interactions between LGP32 and environmental grazers. In marine environments, heterotrophic protists are major players in the regulation of microbial communities. Ciliated protozoa represent a basic component of both microplankton and the microbenthic communities of aquatic environments. Different studies have shown that ciliates are involved in the regulation of the bacterial biomass, by the removal of most of the dispersed bacteria/pathogens (12, 13). Ciliates belonging to *Euplotes* genera have been shown to be natural bacterivorous in benthic systems (13). Free living amoebae are ubiquitous (14, 15) and have been isolated from soil (16, 17, 18), freshwater (19, 20), marine/brackish water (21-27) and air (28, 29, 30). Free living amoebae feed mainly by phagocytosis, however an increasing number of studies showed that some bacteria have evolved to become resistant to protists phagocytosis, either because they are not internalized or are able to survive after

internalization. These studies demonstrated that a number of human pathogens are amoeba-resistant bacteria, resisting the phagocytosis of freshwater or soil amoebae belonging to *Acanthamoeba* and *Dyctiostelium* genera (15). Indeed, resistance to amoebae phagocytosis was demonstrated for pathogenic bacterial species *Legionella pneumophila* (31-34), *Mycobacterium avium* (35,36 Cirillo, 1997 #243), *Salmonella enterica* Typhimurium (37) and was also proposed for human pathogenic *Vibrio cholerae* et *Vibrio mimicus* (38-40). Recent studies showed that *Vibrio cholerae* can adopt intracellular stages in the freshwater amoebae *Acanthamoeba castellanii* (38) and *Acanthamoeba polyphaga* (40). Intracellular vibrios have been observed in cytoplasmic vacuoles inside amoebae (38-41). Thus, free living amoebae appear could constitute an environmental reservoir for pathogens in freshwater environments.

Marine amoebae have been recently shown to host symbiotic bacteria (42). However, it is still unknown whether they can host pathogenic strains. We used here *V. tasmaniensis* LGP32, which has evolved intracellular resistance traits required for pathogenicity in oysters (10,43), to determine whether it can adopt similar intracellular stages in marine grazers. In this study, we isolated amoebae seasonally from the direct environment of oysters. Analyses of 18S rRNA sequences showed that these amoebae mostly belong to Vannellidae class. We characterized the cellular interactions between phagocytes—both oyster hemocytes and environmental protists—and two *Vibrio* strains of the Splendidus clade, namely the oyster pathogen LGP32 and J2-8, an avirulent strain of isolated from oysters (44), which we used here as a negative control for resistance to phagocytosis. Our results indicate that, like in hemocytes, *V. tasmaniensis* LGP32 resists to predation by marine grazers and induce damages to amoebae after its internalization, indicating that the phagocytosis resistance phenotype of this facultative intracellular pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 is conserved across phagocytes. From the present study, we hypothesize that grazing pressures by marine grazers found in marine environments may select for intracellular survival traits involved in pathogenicity against marine metazoan.

## Experimental procedures

### Animals and culture conditions of bacterial strains

Adult triploid *Crassostrea gigas* were purchased from the local oyster farm in CAT de Maguelone (Palavas, France) to perform in vitro cell biology experiments.

*Vibrio tasmaniensis* LGP32 and *Vibrio crassostreae* J28 were grown in Zobell or Zobell agar, Luria-Bertani (LB) or LB-agar (LBA) + NaCl 0.5M, at 20°C. Chloramphenicol (10 µg/mL), was added as supplements when we cultured GFP mutant strains.

### Quantification of *Vibrio* phagocytosis by hemocytes

Hemolymph was withdrawn from the oyster pericardial cavity and was kept on ice before counting the hemocytes concentration. Then, freshly collected hemolymph was dispensed into a 24-well culture plate, so as to plate  $3 \times 10^5$  hemocytes/cm<sup>2</sup>. After 16h of growing in Zobell medium + 10µg/mL chloramphenicol à 20°C, *Vibrio* strains (LGP32 and J2-8) carrying high copy pMRB-GFP were incubated in 0.22 µm filtered oyster plasma for 1h, to allow opsonisation. Opsonized bacteria were then washed in SSW to remove plasma, and were added to hemocytes monolayers in SSW, at a multiplicity of infection of 50:1. Plates were centrifuged for 5 min at 400 g to synchronize binding. After 1h of phagocytosis, hemocytes were carefully washed three times with SSW and then incubated with trypsin 0.2%-EDTA 0.4% for 20 min. After incubation with trypsin 0.2%-EDTA 0.4% and flushing, the cell suspension was withdrawn and fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min. After fixation, paraformaldehyde was removed by centrifugation for 5 min at 1000 g and cell pellet was re-suspended in PBS and conserved into round bottomed test tubes (BD Falcon 734-0442). Cell suspension was then analyzed by flow cytometer FACS Canto. Within a single experiment, each condition was performed in triplicates. The depicted results are representative of three independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's t test over the independent experiments.

### *Vibrio* - hemocytes co-cultures

Hemolymph was withdrawn from the oyster pericardial cavity and was kept on ice before counting the hemocytes concentration. Then, freshly collected hemolymph was dispensed into a black 96 wells plate with transparent flat bottom, so as to plate  $6 \times 10^5$  hemocytes/cm<sup>2</sup>. In parallel, after growing *Vibrio* strains (LGP32 and J2-8) carrying high copy pMRB-GFP at 20°C in Zobell medium + 10µg/mL chloramphenicol for 16h, bacteria were washed in SSW by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of  $2 \cdot 10^9$  cfu/ml deduced from OD<sub>600</sub> reads. One hour after plating, *Vibrio* strains (LGP32 and J2-8) carrying high copy pMRB-GFP were added to hemocytes, at a multiplicity of infection of 100:1. Plates were centrifuged for 5 min at 400 g to synchronize binding. After 1h of phagocytosis, hemocytes were carefully washed three times with SSW to remove any remaining extracellular bacteria. Then GFP fluorescence was measured every 1h over 20h using a TECAN plate reader (480nm/520nm). Within a single experiment, each condition was performed in triplicates. The depicted results are representative of three independent experiments. Statistical analysis was performed using two-ways repeated measures ANOVA over the independent experiments.



### Cytotoxicity assay

Hemolymph was withdrawn from the oyster pericardial cavity and was kept on ice before counting the hemocytes concentration. Then, freshly collected hemolymph was dispensed into a black 96 wells plate with transparent flat bottom, so as to plate  $6 \times 10^5$  hemocytes/cm<sup>2</sup>. After 16h of growing in Zobell à 20°C, *Vibrio* strains (LGP32 and J2-8) were incubated in 0.22 µm filtered oyster plasma for 1h, to allow opsonisation. Opsonized bacteria were then washed in SSW to remove plasma, and were added to hemocytes monolayers in SSW containing 10µg/mL of Sytox Green (Molecular Probes) at a multiplicity of infection of 50:1. Plates were centrifuged for 5 min at 400 g to synchronize binding. Sytox Green fluorescence was measured at 480nm/550nm every 30 min over 17h30, by using a TECAN microplate reader. As controls, hemocytes were incubated in Sytox diluted in SSW in presence (positive control) or absence (negative control) of Triton X-100 (0,1%). Washed bacteria were also incubated in Sytox diluted in SSW. The depicted results are representative of three independent experiments. A two-ways repeated measures ANOVA test was used to estimate p-values for comparing cytotoxicity phenotype.

### *Vibrio* - hemocytes interactions for microscopy

Hemolymph was withdrawn from the oyster pericardial cavity and was kept on ice before counting the hemocytes concentration. Hemocytes were plated onto 13-mm glass coverslips in a 24-well culture plate to obtain monolayers of  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>. In parallel, after growing *vibrio* strains (LGP32 and J2-8) carrying high copy pMRB-GFP at 20°C in Zobell medium +10µg/mL chloramphenicol for 16h, bacteria were washed in SSW by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of  $2.10^9$  cfu/ml deduced from OD<sub>600</sub> reads. One hour after plating, hemocytes were exposed to SSW washed vibrios (LGP32 and J2-8) at a multiplicity of infection of 50:1. Plates were centrifuged for 5 min at 400 g to synchronize binding. After 1h and 6h-incubation, the hemocytes monolayer was fixed with 2% paraformaldehyde for 15 min and stained with 0.25 µg/mL DAPI (Sigma) and 0.5 µg/mL Phalloidin-TRITC (Sigma). Coverslips were then observed with 63X objective and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope.

### Grazing test with *Euplotes* sp.

Culture of *Euplotes* sp. CCAP 1624/23 was distributed in wells of a 24-well culture plate, at a concentration of 230 *Euplotes* sp./well (1mL/well). After growing *vibrio* strains (LGP32 and J2-8) carrying high copy pMRB-GFP at 20°C in Zobell medium +10µg/mL chloramphenicol for 16h, bacteria were washed in SSW by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of  $2.3 \times 10^5$  cfu/ml deduced from

OD<sub>600</sub> reads. Vibrios were then added in triplicates to *Euplotes* sp. at a rate of 10 000 bacteria/ciliates. After 0, 4 and 8 days of incubation at 20°C, in the dark, 1 mL of suspension was withdrawn and fixed in a new 24-well culture plate with formaldehyde 4%. After 24h of sedimentation, *Euplotes* sp. were counted in the whole well, using an inverted microscope OLYMPUS IX53 at 100X objective. The depicted results are representative of three independent experiments. A two-ways ANOVA test was used to estimate p-values for comparing *Euplotes* sp. growth. Images were also captured on these samples using an inverted confocal scanning laser microscope Zeiss LSM780 at 100X objective.

#### Isolation and identification of environmental amoebae from Thau Lagoon

Water, oyster and sediment from the Thau lagoon (South France) were sampling once per season in 2014. Water was collected next to oyster tables at the Bouzigues station REPHY (monitoring network of phytoplankton and phytotoxins, Ifremer) and filtered, on the boat, with a 180 µm pore size nylon filter. At the lab, the water was re-filtered with a 8.0 µm pore size MF-Millipore membrane. The 8.0 µm pore size membrane was then cut in 4 and each quarter was put upside down on an *E. coli* layer seeded on *SSW*<sub>1/2</sub>-agar. Oysters (adults) were taken on the tables of the Bouzigues station REPHY and were dissected at the lab. Oyster gills were cut in 4 and each quarter was put upside down on an *E. coli* layer seeded on *SSW*<sub>1/2</sub>-agar. Sediment was collected under the oyster tables (depth of 9 meters) by core sampling. One gram of sediment was then deposited onto an *E. coli* layer seeded on *SSW*<sub>1/2</sub>-agar, in triplicate. After 1 to 3 weeks, depending of the sampling season, sorting amoebae were observed at the periphery of the deposit (filter, oyster gills or sediment). An agar square of 0,5 x 0,5cm containing a single amoeba was then cut and deposited upside down on a fresh *E. coli* layer seeded on *SSW*<sub>1/2</sub>-agar. This was repeated several times to conserve and replicate amoebae. For DNA extraction and interaction with vibrios, amoebae were suspended into *SSW*<sub>1/2</sub> and this suspension was placed into a culture flask to let amoebae adhere during maximum 3 days. After adherence and a 24h treatment with Penicilline/ Streptomycine (Gibco), amoebae were treated with trypsin 0.2%-EDTA 0.4% for 30 min, to unstick them. After incubation of *Platyamoeba* sp. with trypsin 0.2%-EDTA 0.4%, amoebae were re-suspended and centrifuged 15 min at 800g. Amoebal pellet was then re-suspended in *SSW*<sub>1/2</sub> and amoebal DNA was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), according to the manufacturers' protocol.

In order to identify environmental amoebae by PCR and sequencing, we design primers. For that, we extracted sequences representing environmental species of amoebae from GenBank, and aligned them using the program BioEdit (45). The alignment (3815 nucleotides) included: 10 sequences of *Vannella*, 10 of *Platyamoeba*, 6 of *Neoparamoeba*, 2 of *Paravannella*, 2 of *Acanthamoeba*, 2 of *Naegleria*, 2 of *Hartmanella*, 2 of *Alexandrium*, 2 of

Euplotes, 2 of Uronema, 2 of Acartia, the sequence of *Mytilus edulis* and the sequence of *Crassostrea gigas*. Sequences representing *Alexandrium*, *Euplotes*, *Uronema*, *Acartia*, *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*, which are organisms also presents in Thau lagoon, were included as “negative control of hybridization”. The alignment file is available from the corresponding author upon request. Primers candidates were assessed by using the website <http://www.arb-silva.de/search/testprime>. The sequences of selected primers are: Amo\_AP\_1154\_F: 5' GAGRAAATTAGAGTGTTYAAAG 3' and Amo\_AP\_1470\_R: 5' TTATRGTTAAGACTA CGAOCGG 3'. These primers amplified the hypervariable region V7 of 18S rRNA gene of only 25% of Eukaryota, including Amoebozoa (36%) which includes Discosea (70%) and Tubulinea (33%) (prediction of website <http://www.arb-silva.de/>).

PCR were performed with these primers, at an annealing temperature of 54°C. PCR reactions typically contained 100 ng of template DNA, 0.4 µM of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega), 5x Taq buffer, 2 µM MgCl<sub>2</sub> and 0.4 µM of each deoxynucleotide in a total volume of 25 µl. The PCR amplicons were cloned using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), according to the manufacturers' protocol. Nucleotide sequences were determined using the Sanger technology (Plateforme Génomique Environnementale du Labex Centre "Méditerranéen Environnement Biodiversité", Montpellier, France). Sequence homology were searched for all sequences, using BLASTn available at the NCBI web site (National Centre for Biotechnology Information (46) (47)). For phylogenetic analyses, sequences were aligned in MOTHUR (Schloss et al., 2009) and imported into ARB software (Ludwig et al., 2004; <http://www.arb-home.de>) loaded with the silva database (<http://www.arb-silva.de>). A base frequency filter was applied to exclude highly variable positions before adding sequences to the maximum parsimony backbone tree using the parsimony quick add marked tool implemented in ARB, thereby maintaining the overall tree topology provided by default.

#### Grazing test with *Platyamoeba* sp.

A 3-days suspension of environmental *Platyamoeba* sp., pre-treated 24h with Penicilline/ Streptomycine (Gibco), was treated with trypsin 0.2%-EDTA 0.4% for 30 min. In parallel, after growing vibrio strains (LGP32 and J2-8) at 20°C in Zobell medium for 16h, bacteria were washed in SSW diluted at 1/2 with sterile H<sub>2</sub>O (SSW<sub>1/2</sub>) by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in SSW<sub>1/2</sub> at a working dilution of 2.10<sup>9</sup>cfu/ml deduced from OD<sub>600</sub> reads. The working solution (5 mL) was then spread onto SSW<sub>1/2</sub> agar plate to obtain regular layers of bacteria after 10min of incubation and liquid surplus elimination. Three bacterial layers were prepared for each strain. After incubation of *Platyamoeba* sp. with trypsin 0.2%-EDTA 0.4%, amoebae were re-suspended and centrifuged 15 min at 800g. Amoebal pellet was then re-suspended in SSW<sub>1/2</sub>, cells were counted and the amoebal concentration was adjusted at 5x10<sup>4</sup> amoebae/mL. Sterile paper disks (Sigma Z741310) were

loaded with 25  $\mu$ L of amoebal suspension. Using a sterile crowbar, paper disks loaded with amoeba were deposited above bacteria (3 plates for each strain) and onto 3 control plates:  $SSW_{1/2}$  agar plates without any bacteria. Grazing diameters of *Platyamoeba* sp. on the two strains were measured, after 4, 5, 7, 8 and 9 days of incubation at 20°C. Control plates didn't expose any growth of amoeba, so diameter couldn't be measured. The depicted results are representative of four independent experiments. Statistical analysis was performed using two-ways repeated measures ANOVA over the independent experiments.

#### Vibrio - *Platyamoeba* sp. interactions for microscopy

A 3-days culture of environmental *Platyamoeba* sp., pre-treated 24h with Penicilline/Streptomycine (Gibco), was treated with trypsin 0.2%+EDTA 0.4% for 30 min. In parallel, after growing vibrio strains (LGP32 and J-8) carrying high copy pMRB-GFP at 20°C in Zobell medium +10 $\mu$ g/mL chloramphenicol for 16h, bacteria were washed in  $SSW_{1/2}$  by two successive centrifugations (10min, 1000g, 20°C) and diluted in  $SSW_{1/2}$  at a working dilution of 2.10<sup>9</sup>cfu/ml deduced from OD<sub>600</sub> reads. After incubation of *Platyamoeba* sp. with trypsin 0.2%+EDTA 0.4%, amoeba were re-suspended and centrifuged 15 min at 800g. After re-suspension of the pellet in  $SSW_{1/2}$ , amoebae were counted and plated onto 13-mm glass coverslips in a 24-well culture plate to obtain monolayers of 1,5 x 10<sup>4</sup> amoebae/cm<sup>2</sup>. Washed vibrios (LGP32 GFP and J-8 GFP) were added to amoebae monolayers at a rate of 10 000 bacteria/amoeba. Plates were centrifuged for 5 min at 400 g to synchronize binding. After 24h of incubation, the cells were fixed with 20% formaldehyde for 30 min and stained with 1 $\mu$ g/mL of Blue Evans (Sigma E2129). Coverslips were then observed with 63X objective and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope.

## Results

LGP32 but not J-8 resists to phagocytosis and creates damages to oyster hemocytes. We compared the phagocytosis efficiency, cytotoxicity and percentage of oyster hemocyte lysis induced by LGP32 and J-8, two vibrio strains of the *Splendidus* clade, virulent (Gay 2004) and non-virulent for oysters (Lemire et al, 2014), respectively. Primary cultures of adherent oyster hemocytes were incubated with GFP-expressing strains at a MOI of 100:1. The phagocytosis efficiency monitored after 1h was significantly ( $p < 0.001$ ) higher for LGP32 than for J-8, as indicated by our flow cytometry measurements (Fig 1A). Indeed 50% of adherent hemocytes had internalized LGP32 when only 37% had internalized J-8. The difference of GFP fluorescence intensity/cell which reflect the number of internalized bacteria per cells was less contrasted between the two strains (Fig. 1B). We

also monitored the growth of the GFP-expressing LGP32 and J2-8 in contact with hemocytes during 20h. Primary cultures of oyster hemocytes were infected at a MOI of 100:1, and the GFP fluorescence intensity was measured every 1h. LGP32 showed a significant growth in such hemocyte co-cultures ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1C) and was unable to grow in SSW in the absence of hemocytes (Fig. 1C), confirming our recently published results (Vanhove, 2015 #3155). On the contrary, J2-8 did not show any growth when co-cultured with hemocytes. This indicated that while both strains are phagocytosed by oyster hemocytes, only LGP32 is able to survive phagocytosis killing and grow afterward. In contrast to LGP32 which has a strong cytotoxic effects (Vanhove, 2015 #3155), J2-8 did not show any cytotoxic effects towards hemocytes. Consistent with phagocytosis quantification, when we quantified the phenomenon of hemocytes cytolysis by monitoring the uptake of the cell-impermeant Sytox green DNA dye into hemocytes, only hemocyte monolayers infected with LGP32 were massively labeled by Sytox green, no significant labeling being observed with J2-8 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1D).

Growth of marine ciliates *Euplotes* sp. is affected by internalized LGP32. LGP32 was shown to be associated with plankton fractions and found in sediment of the Goro lagoon (11). Moreover, it was found to be able to form biofilms and to adhere to chitin rich surfaces (11). Therefore we studied the interactions between LGP32 and benthic grazers. *Euplotes* sp. are benthic ciliates commonly found in marine habitats, heterotrophic ciliate are hard to cultivate from environmental samples. We therefore used a culture of *Euplotes* sp. from the Scottish CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) to monitor the growth of *Euplotes* sp. in the presence of GFP-expressing LGP32 (black Fig. 2A), GFP-expressing J2-8 (light grey Fig. 2B) or in the absence of bacteria as a food source (dark grey Fig. 2A). At day 0, day 4 and day 8, *Euplotes* sp. were fixed and counted. At day 4, the amount of control *Euplotes* (no food source) had not changed compared to day 0 (Fig. 2A). *Euplotes* in contact with the strain J2-8 had significantly grown, *Euplotes* density being 1.5 time higher than in controls ( $p < 0.001$ , Fig. 2A). On the contrary, density of *Euplotes* grown with the strain LGP32 were significantly lower (1,3 time less,  $p < 0.001$ ,) than those observed with J2-8. After 8 days, the same significant difference (1,3 time less) was still observed between *Euplotes* grown with J2-8 and LGP32 (Fig. 2A). We verified that *Euplotes* were able to internalized both strains of vibrios by confocal inverted microscopy. After 4 days of interaction, GFP-expressing LGP32 and J2-8 had been both internalized by *Euplotes* sp. (Fig. 2B). These results showed that LGP32 was phagocytosed by *Euplotes* sp. like J2-8, but did not support *Euplotes* sp. growth as well as than J2-8.

Marine amoebae isolated from the oyster environment mostly belong to the Vanellidae order. As amoebae represent another important category of benthic grazers, we investigated the amoebic diversity in the direct environment of oysters. Amoebae were isolated from water column, oyster gills and sediment of the Thau

lagoon, at each season of the year 2014. Cultured amoebae were identified by sequencing the hypervariable region V7 of 18S rRNA. A total of 110 sequences were analyzed from 15 different cultures. Most of the sequences showed more than 90% of sequence homologies with *Vannella* or *Platyamoeba* genera, which both belongs to the Vannellidae order. Indeed according to sequences homologies, 103 amoebae sequences from 12 samples isolated from water column (blue squares in Fig. 3 and S1) and/or oyster gills (light green squares in Fig. 3 and S1) and/or sediment (brown squares in Fig. 3 and S1) during winter (blue circles in Fig. 3 and S1) and/or spring (green circles in Fig. 3 and S1) and/or summer (yellow circles in Fig. 3 and S1) and/or autumn (orange circles in Fig. 3 and S1) belong to these two genera of Vannellidae. By applying a 97% homology cutoff, the 103 environmental amoebae sequences could be classified into 11 different Operational Taxonomic Units (OTUs) (Fig. 3). This phylogenetic analysis confirmed that most of the isolated amoebae are deeply branched into Vannellidae order, Flabellinia subclass, Discosea class and Amoebozoa phylum and are branching into two distinct clusters of Vannellidae. (Fig. 3). An amoeba showing 98% of sequence homology with *Acanthamoeba* sp. was found in one isolate from oyster gills during summer (light green square and yellow circle in Fig. 3 and S1). For both *Vannella* and *Platyamoeba*, no correlation between species distribution and sampling season or habitats were found. Interestingly, one OTU of *Platyamoeba* sp. was found in the 3 habitats and at any seasons. As they appeared to be ubiquitous, we chose one isolate belonging to this OTU, a summer isolate of *Platyamoeba* issued from the water column, to study further amoebae-Vibrio interactions.

Growth of *Platyamoeba* sp. is affected by internalized LGP32. To study interactions between Vibrios and environmental amoeba we monitored the growth of *Platyamoeba* sp. in the presence of LGP32 or J2-8, and in the absence of any other food source (no bacteria). Diameters of halos resulting from amoebae grazing activity were measured 4, 5, 7, 8 and 9 days after the seeding amoebae onto Vibrio layers. No grazing halo was observed on control plates, indicating that amoebae could not grow in the absence of bacteria. After 8 days, the grazing halo of *Platyamoeba* sp. was significantly ( $p < 0.01$ ) smaller on LGP32 layers (3.5cm) than on J2-8 layers (4.3cm) (Fig. 4A). The difference of grazing between LGP32 and J2-8 was even more significant ( $p < 0.001$ ) after 9 days (4.4cm for LGP32 and 5.8cm for J2-8) (Fig. 4A). Because bacteria were the only source of nutrients in our experiments, these results indicate that LGP32 does not support amoebae growth as well as J2-8. To get further details at the cellular level, *Platyamoeba* sp. were observed 24 h after contact with GFP-expressing LGP32 and J2-8 by confocal microscopy. After 24h of contact, no extracellular J2-8 remained and vibrio appeared mostly degraded as the remaining GFP fluorescence was diffused in the amoebae cytosol (Fig. 4B). In contrast, intact LGP32 cells were observed both intracellular and extracellular. Numerous extracellular clumps of LGP32 were

observed in the surrounding of amoebae. Amoebae were also heavily loaded with intact brightly fluorescent bacteria (Fig. 4B). In addition, amoebae colonized by LGP32 showed important cellular alterations: they were both smaller than those in contact with J2-8 and retracted suggesting that these cells were stressed. Together, these results suggest that LGP32 resists to amoebal phagocytosis, inhibiting their growth by resisting degradation hence providing less nutrients.

## Discussion

Our results showed that *Vibrio tasmaniensis* LGP32 resistance traits are conserved between oyster hemocytes and heterotrophic protists living in the marine environment of oysters. While the virulent strain *V. tasmaniensis* LGP32 was extensively studied in our team for its capacity to survive in oyster phagocytes (43) and induce cell cytolysis in a phagocytosis-dependent manner of (10), it was still unknown whether such an intracellular phenotype could have been acquired under selective environmental pressure. To ask this question, we studied its resistance to phagocytosis by marine protozoan species present in the environment oysters and compared it to that of the avirulent strain *V. crassostreae* J2-8 also isolated during a mortality event of *C. gigas* oysters, which also belongs to the *Vibrio Splendidus* clade (44). We demonstrated here that J2-8 was efficiently phagocytosed by hemocytes but that in contrast to LGP32, it did not induce hemocyte cytolysis (Fig. 1). We then used *V. crassostreae* J2-8 as a negative control for resistance of phagocytosis by oysters hemocytes and compared the phenotypes of both strains when exposed environmental grazers.

We isolated here amoebae essentially branching in *Vannella* and *Platyamoeba* sp., which both belong to Vannellida order, in the direct environment of oysters including oyster tissues themselves but also the water column and the sediment below oyster farming tables in the Thau lagoon, south of France. Only one isolate belonged to another order (Acanthamoebae). Thus, the diversity of marine amoebae living on the environment of oyster found in the present study appears rather poor as compared to the known genera previously characterized in marine environments that includes *Gruberella*, *Vahlkampfia*, *Paratetramitus* (Heterolobosea class, Percolozoa phylum), *Nolandella*, *Hartmanella*, *Saccamoeba*, *Flabellula*, *Rhizamoeba*, *Paraflabellula* (Tubulinea class, Lobosa subphylum, Amoebozoa phylum), *Thecamoeba*, *Platyamoeba*, *Vannella*, , *Mayorella*, *Dactylamoeba*, *Paramoeba*, *Cunea*, *Pseudoparamoeba*, *Neoparamoeba*, *Vexillifera*, *Squamamoeba*, *Acanthamoeba*, *Protcanthamoeba*, , and *Vermistella*, (21,24-27,48) (Discosea class, Lobosa subphylum, Amoebozoa phylum). The presence of amoebae belonging to Lobosa subphylum (including Discosea and Tubulinea classes) and Conosa subphylum (including Variosea and Myxogastrea classes) were confirmed by

Tara ocean consortium Brum, 2015 #598 ; Villar, 2015 #599 ; de Vargas, 2015 #596 ; Sunagawa, 2015 #597; Lima-Mendez, 2015 #595}. The present inventory of marine amoebae from the Thau lagoon represent the first record from this environment, however it is not exhaustive as only a limited number of samples were collected, and only cultivable amoebae were characterized. To better investigate amoeba diversity in the Thau lagoon, a more exhaustive sampling and metagenomic analyses should be performed with any culturing step. However culturing samples was a prerequisite here to be able to study the mechanisms of interactions between marine amoebae and the vibrio LGP32.

We showed that LGP32, which resists to hemocyte phagocytosis, also resists to Euplotes sp. and Platyamoeba sp. predation. Indeed, both ciliates and amoebae grow more efficiently on J2-8 than on LGP32. It is admitted that this phenotype is indicative of bacterial resistance to phagocytosis (15,49) as in axenic medium, the only source of nutrients derives from the degradation of bacteria. As Euplotes and Platyamoeba internalized both of the vibrio strains tested, we could conclude that their lower growth on LGP32 was due to bacterial resistance to intracellular degradation. This is supported by confocal microscopy observations after 24h of interaction, in which both intracellular and extracellular LGP32 were observed while on the contrary J2-8 was apparently digested by amoebae. Intracellular LGP32 remained fluorescent, when most of J2-8 GFP were degraded by amoebae. In addition, amoebae in contact with LGP32 showed cellular alterations not observed in J2-8 controls. These results are reminiscent of the phenotype of both strains on oyster hemocytes and consequently, they suggest that like in hemocytes, LGP32 resists to amoebae phagocytosis after internalization and induces cellular alterations. Therefore, we show that LGP32 resistance traits are conserved across phagocytes from protozoans to metazoans. We hypothesize that intracellular survival phenotype such as that observed for the oyster pathogen LGP32 may have evolved in the wild under grazing pressures imposed by protozoans. Very recently, *Vibrio cholerae* was also shown to resist grazing by the freshwater *Acanthamoeba* by hyper-production of exopolysaccharide (41). It would be interesting to define whether LGP32 resist to marine grazer and oyster hemocytes using a similar mechanism. Therefore as in freshwater, marine amoebae and benthic ciliate exert strong selective pressure on marine bacteria communities that could favor the acquisition of resistance traits required for bacteria pathogenicity in metazoan hosts.



## Figure legends

Figure 1. Cellular characterization of the interaction between oyster hemocytes and *V. crassostreae* J2-8, a negative control for phagocytosis resistance. J2-8 is less phagocytosed by hemocytes than LGP32. In 3 independent experiments, (A) phagocytosis efficiency and (B) GFP fluorescence intensity/cell were measured by FACS for both LGP32 and J2-8. These analyzes were performed by infecting primary cultures of adherent oyster hemocytes maintained in sterile sea water (SSW) with GFP-expressing strains at a MOI of 100:1 during 1h before fixation. Both strains were phagocytosed by hemocytes, but phagocytosis efficiency is lower for J2-8 than for LGP32. Values are presented +/- SEM. \*\*\* p<0.001 (Student's t test). (C) J2-8 didn't grow in hemocyte co-cultures, in contrast to LGP32. In 3 independent experiments, hemocyte monolayers were incubated with a MOI of 50:1 with GFP-expressing virulent LGP32 (black triangles) or the avirulent J2-8 (light grey boxes). Control hemocytes (grey symbols) were incubated in sterile sea water (SSW) in the absence of bacteria. Controls bacteria (white symbols) were incubated in sterile sea water (SSW) in the absence of hemocytes. Growth was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. J2-8 GFP remains stable when LGP32 GFP significantly increased, indicating that LGP32 were growing in presence of hemocytes. The depicted results are representative of three independent experiments. Values are presented +/- SEM. \*\*\* p<0.001 (repeated measures two ways ANOVA). (D) J2-8 didn't induce hemocytes cytolysis, contrary to LGP32. Hemocyte monolayers were incubated with LGP32 (triangles) or J2-8 (boxes) at a MOI of 50:1. Their cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. The percentage of hemocyte lysis was obtained by comparison with lysis induce by triton X100 (100% lysed hemocytes). Percentage of hemocyte lysis induced by J2-8 wasn't significantly different from control values, whereas percentage of hemocyte lysis induced by LGP32 was significantly higher than that induce by J2-8. The depicted results are representative of three independent experiments. Values are presented +/- SEM. \*\*\* p<0.001 (repeated measures two ways ANOVA).

Figure 2. Growth of marine ciliates *Euplotes* sp. is affected by internalized LGP32. (A) Growth of marine ciliates *Euplotes* sp. is affected co-incubation with LGP32. The growth of *Euplotes* sp. was monitored in the presence of LGP32 GFP (black) or J2-8 GFP (light grey) and without bacteria (dark grey). *Euplotes* sp. were fixed and counted 0, 4 and 8 days after the contact with bacteria. After 4 and 8 days, *Euplotes* sp. growth in contact with LGP32 was significantly lower than that in presence of J2-8. The depicted results are representative of three independent experiments. Values are presented +/- SEM. \*\*\* p<0.001 (two ways ANOVA). (B) Both LGP32 and J2-8 were internalized by *Euplotes* sp. Localization of bacteria during *Euplotes*/*Vibrio* interaction was investigated by

confocal inverted microscopy, after 4 days of interaction. Bright field images acquired to visualize Euplotes cells were merged to epifluorescence images acquired to visualize GFP-expressing bacteria. Pictures showed that LGP32 GFP and J2-8 GFP had been both internalized by Euplotes sp. Scale bar: 10µm.

Figure 3. Phylogenetic relationships of our isolated amoebae belonging to Vannellidae class and Acanthamoeba genera within the Amoebozoa. Phylogenetic 18S rRNA-based trees of the Amoebozoa constructed with ARB software (Ludwig et al., 2004; <http://www.arb-home.de>) loaded with the silva database (<http://www.arb-silva.de>). A base frequency filter was applied using the parsimony quick add marked tool implemented in ARB. Our isolates are written in red. Colored squares indicate the habitat of our isolates : blue for water column, light green for oyster gills and brown for sediment. Colored circles indicate the sampling season of our isolates : blue for winter, green for spring, yellow for summer and orange for autumn. \* A detailed version of this branch is available as supplementary Figure S1. Most of our isolated amoebae were deeply branched into Vannellidae class. Only one species of Acanthamoeba was isolated and is phylogenetically closely related to the 95 Acanthamoeba species available into silva database.

Figure 4. Growth of environmental amoebae *Platyamoeba* sp. is affected by internalized LGP32. (A) The growth of isolated *Platyamoeba* sp. was monitored in the presence of LGP32 (black) or J2-8 (light grey), and without bacteria. A filter loaded with *Platyamoeba* sp. was placed upside down on layers of J2-8 and LGP32 seeded on  $SSW_{1/2}$  agar and on  $SSW_{1/2}$  agar only (control plates). Diameters of grazing halo, which correspond to amoebal migration and multiplication front, were measured after 4, 5, 7, 8 and 9 days of filter deposit. No grazing halo was observed on control plates, at any time. After 8 and 9 days, grazing halos of *Platyamoeba* sp. were significantly smaller on LGP32 layers than on J2-8 layers. The depicted results are representative of three independent experiments. Values are presented +/- SEM. \*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  (repeated measures two ways ANOVA). (B) Both LGP32 and J2-8 were internalized by *Platyamoeba* sp. Localization of bacteria during *Platyamoeba*/Vibrio interaction was investigated by confocal microscopy, after 24h of interaction. GFP-expressing LGP32 and J2-8 (green) were added to adherent *Platyamoeba* sp on glass coverslips 24h before fixation. J2-8 GFP bacteria were totally internalized by amoebae and most of the bacteria appeared to be degraded. In contrast, LGP32 GFP bacteria were both intracellular and extracellular, and amoebae colonized by LGP32 GFP showed cellular alterations. Amoebal proteins were stained with Blue evans (red). Scale bar: 5µm.

## Acknowledgments

We are grateful to Marc Leroy for technical assistance, to Eric Abadie for field trip coordination and to Michel Cantou for scuba diving allowing sediment collection. We thank the Montpellier RIO Imaging platform for access to confocal microscopy. Data used in this work were also partly produced through the technical facilities of the "Centre Méditerranéen Environnement Biodiversité" (Labex Cemeb). This work received funding from the Ifremer and Ec2Co program (Inter-Vibrio project).

## Bibliography

1. Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2012) The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* 3, 160
2. Jutla, A., Whitcombe, E., Hasan, N., Haley, B., Akanda, A., Huq, A., Alam, M., Sack, R. B., and Colwell, R. (2013) Environmental Factors Influencing Epidemic Cholera. *Am J Trop Med Hyg* 89, 597-607
3. Ma, A. T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J. J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5, 234-243
4. Ritchie, J. M., Rui, H., Zhou, X., Iida, T., Kodoma, T., Ito, S., Davis, B. M., Bronson, R. T., and Waldor, M. K. (2012) Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS Pathog* 8, e1002593
5. Zhang, L., Krachler, A. M., Broberg, C. A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C. J., and Orth, K. (2012) Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* 1, 453-460
6. de Souza Santos, M., and Orth, K. (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *MBio* 5, e01506-01514
7. Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* 58, 143-159
8. Vidal-Dupiol, J., Ladrière, O., Meistertzheim, A. L., Foure, L., Adjeroud, M., and Mitta, G. (2011) Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *J Exp Biol* 214, 1533-1545
9. Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., Lautredou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., and 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 U S A* 108, 2993-2998
10. Vanhove, A. S., Rubio, T., Nguyen, A. N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., Vergnes, A., Poirier, A. C., Disconzi, E., Bachere, E., Le Roux, F., Jacq, A., Charriere, G. M., and Destoumieux-Garzon, D.

- (2015) Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ Microbiol*
11. Vezzulli, L., Pezzati, E., Stauder, M., Stagnaro, L., Venier, P., and Pruzzo, C. (2015) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environ Microbiol* 17, 1065-1080
  12. Curds, C. R., and Cockburn, A. (1968) Studies on the growth and feeding of *Tetrahymena pyriformis* in axenic and monoxenic culture. *J Gen Microbiol* 54, 343-358
  13. Diederichs, S., Beardsley, C., and Cleven, E. J. (2003) Detection of ingested bacteria in benthic ciliates using fluorescence in situ hybridization. *Syst Appl Microbiol* 26, 624-630
  14. Rodriguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20, 225-241
  15. Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17, 413-433
  16. Anderson, O. R. (2000) Abundance of terrestrial gymnamoebae at a northeastern U. S. site: a four-year study, including the El Nino winter of 1997-1998. *J Eukaryot Microbiol* 47, 148-155
  17. Bass, P., and Bischoff, P. J. (2001) Seasonal variability in abundance and diversity of soil gymnamoebae along a short transect in southeastern USA. *J Eukaryot Microbiol* 48, 475-479
  18. Anderson, O. R. (2002) Laboratory and field-based studies of abundances, small-scale patchiness, and diversity of gymnamoebae in soils of varying porosity and organic content: evidence of microbiocoenoses. *J Eukaryot Microbiol* 49, 17-23
  19. Kyle, D. E., and Noblet, G. P. (1986) Seasonal Distribution of Thermotolerant Free-Living Amebas .1. Willards Pond. *J Protozool* 33, 422-434
  20. Grimm, D., Ludwig, W., Brandt, B. C., Michel, R., Schleifer, K. H., Hacker, J., and Steinert, M. (2001) Development of 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes for specific detection of *Hartmannella* and *Naegleria* in *Legionella* - positive environmental samples. *Syst Appl Microbiol* 24, 76-82
  21. Page, F. C. (1983) *Marine Gymnamoebae*, Institute of Terrestrial Ecology, Culture Centre of Algae and Protozoa, Cambridge
  22. Arias Fernandez, M. C., E Paniagua Crespo, M., Marti Mallen, M. P., and Penas Ares, a. M. L. C. C. (1989) Marine amoeba from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *J Protozool* 36, 239-241
  23. Hauer, G., Rogerson, A., and Anderson, O. R. (2001) *Platyamoeba pseudovannellida* N. Sp., a naked amoeba with wide salt tolerance isolated from the Salton Sea, California. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 663-669
  24. Moran, D. M., Anderson, O. R., Dennett, M. R., Caron, D. A., and Gast, R. J. (2007) A description of seven Antarctic marine gymnamoebae including a new subspecies, two new species and a new genus: *Neoparamoeba aestuarina antarctica* n. subsp., *Platyamoeba oblongata* n. sp., *Platyamoeba contorta* n. sp. and *Vermistella antarctica* n. gen. n. sp. *J Eukaryot Microbiol* 54, 169-183
  25. Nasonova, E., Smirnov, A., Fahrni, J., and Pawlowski, J. (2010) Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist* 161, 102-115

26. Kudryavtsev, A., and Pawlowski, J. (2013) *Squamamoeba japonica* n. g. n. sp. (Amoebozoa): a deep-sea amoeba from the Sea of Japan with a novel cell coat structure. *Protist* 164, 13-23
27. Kudryavtsev, A., and Pawlowski, J. (2015) *Ounea* n. g. (Amoebozoa, Dactylopodida) with two cryptic species isolated from different areas of the ocean. *Eur J Protistol* 51, 197-209
28. Kingston, D., and Warhurst, D. C. (1969) Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.* : 2, 27-36
29. Rivera, F., Lares, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Rodriguez, S., Labastida, A., Ortiz, R., and Hernandez, D. (1991) Pathogenic *Acanthamoeba* Isolated during an Atmospheric Survey in Mexico-City. *Rev Infect Dis* 13, S388-S389
30. Rodriguez-Zaragoza, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Gallegos, E., Calderon, A., Ortiz, R., and Hernandez, D. (1993) Amoebological Study of the Atmosphere of San-Luis-Potosi, Sp, Mexico. *J Expo Anal Env Epid* 3, 229-241
31. Anacarso, I., Guerrieri, E., Bondi, M., de Niederhausern, S., Iseppi, R., Sabia, C., Contri, M., Borella, P., and Messi, P. (2010) Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*. *Arch Microbiol* 192, 877-882
32. Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H., and Hechard, Y. (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* 9, 1341-1344
33. Orillo, J. D., Falkow, S., and Tompkins, L. S. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62, 3254-3261
34. Orillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S., and Bermudez, L. E. (1997) Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* 65, 3759-3767
35. Amissah, N. A., Gryseels, S., Tobias, N. J., Ravadgar, B., Suzuki, M., Vandelannoote, K., Durnez, L., Leirs, H., Stinear, T. P., Portaels, F., Ablordey, A., and Eddyani, M. (2014) Investigating the role of free-living amoebae as a reservoir for *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3148
36. Taylor, S. J., Ahonen, L. J., de Leij, F. A., and Dale, J. W. (2003) Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Appl Environ Microbiol* 69, 4316-4319
37. Wildschutte, H., and Lawrence, J. G. (2007) Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* 153, 1781-1789
38. Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G. B., and Sandstrom, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* 60, 33-39
39. Abd, H., Valeru, S. P., Sami, S. M., Saeed, A., Raychaudhuri, S., and Sandstrom, G. (2010) Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*. *Environ Microbiol Rep* 2, 166-171
40. Sandstrom, G., Saeed, A., and Abd, H. (2010) *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Exp Parasitol* 126, 65-68
41. Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., and Blokesch, M. (2015) An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Isme J*

42. Schulz, F., Tyml, T., Pizzetti, I., Dykova, I., Fazi, S., Kostka, M., and Horn, M. (2015) Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Sci Rep* 5, 13381
43. Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., Lautredou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachere, E., and Destoumieux-Garzon, 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 U S A* 108, 2993-2998
44. Lemire, A., Goudenege, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., and Le Roux, F. (2015) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *Isme J* 9, 1523-1531
45. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98
46. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410
47. Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D. M., Dicuccio, M., Edgar, R., Federhen, S., Feolo, M., Geer, L. Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Khovayko, O., Landsman, D., Lipman, D. J., Madden, T. L., Maglott, D. R., Miller, V., Ostell, J., Pruitt, K. D., Schuler, G. D., Shumway, M., Sequeira, E., Sherry, S. T., Srotkin, K., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusov, R. L., Tatusova, T. A., Wagner, L., and Yaschenko, E. (2008) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 36, D13-21
48. Suhnel, S., Ivachuk Cda, S., Schaefer, A. L., Pontinha, V. A., Martins, M. L., Figueras, A., Meyer, G. R., Jones, S. R., Stewart, J. C., Gurney-Smith, H. J., Magalhaes, A. R., and Bower, S. M. (2014) Detection of a parasitic amoeba (Order Dactylopodida) in the female gonads of oysters in Brazil. *Dis Aquat Organ* 109, 241-250
49. Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 71, 20-28

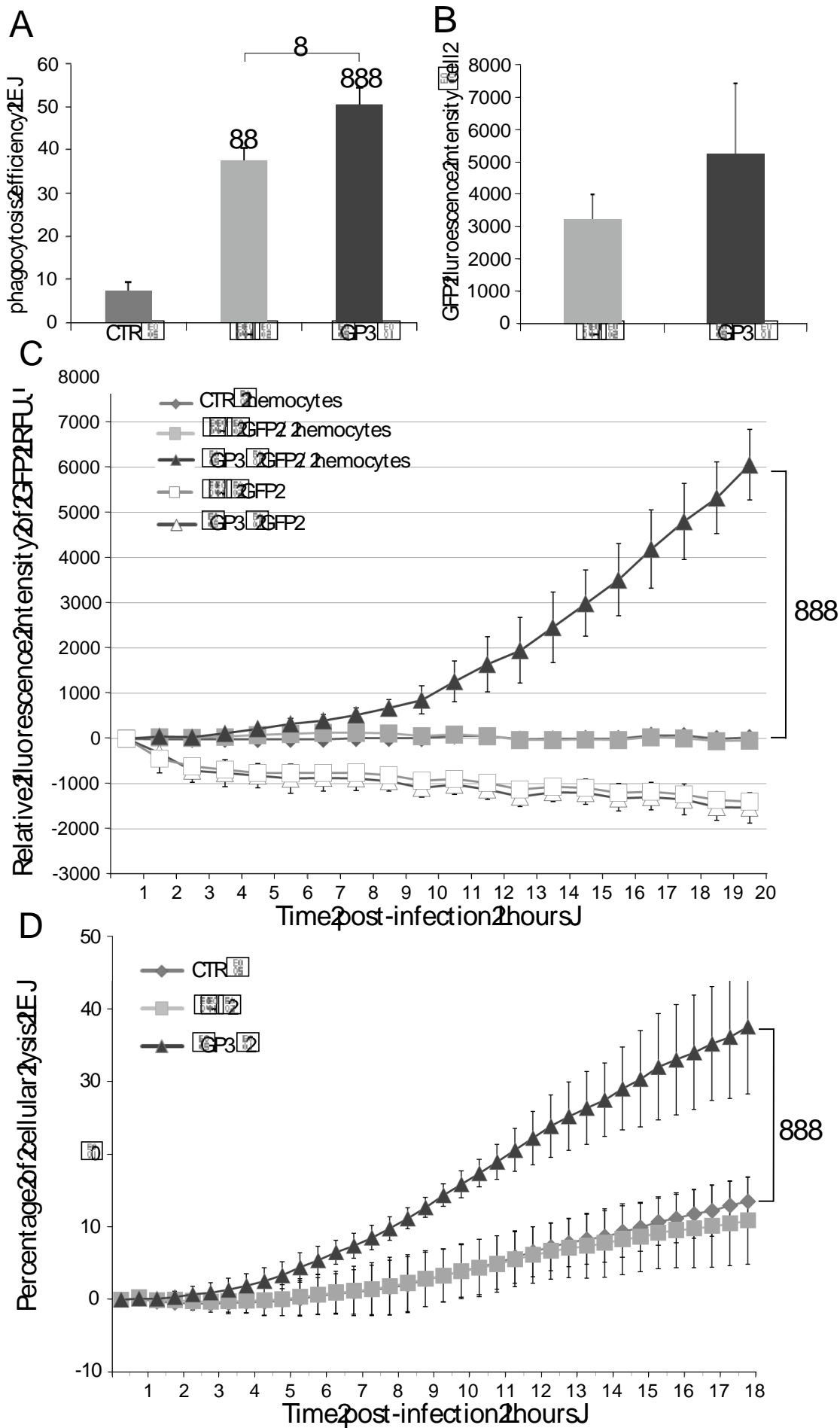


Figure 1. Cellular characterization of the interaction between oyster hemocytes and *V. crassostreae* 2-8, a negative control for phagocytosis resistance.

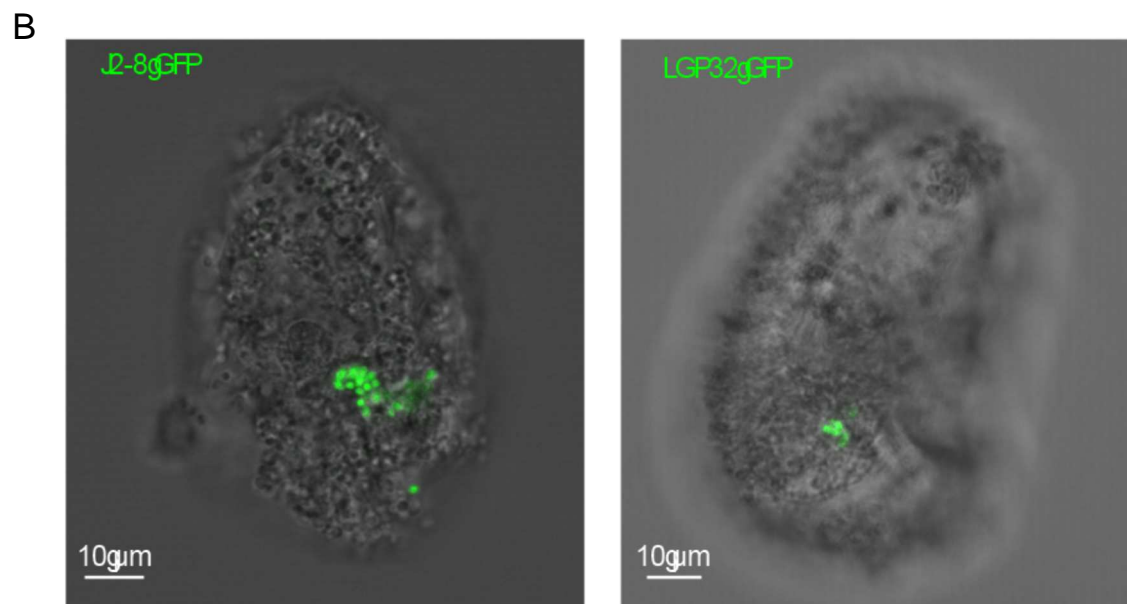
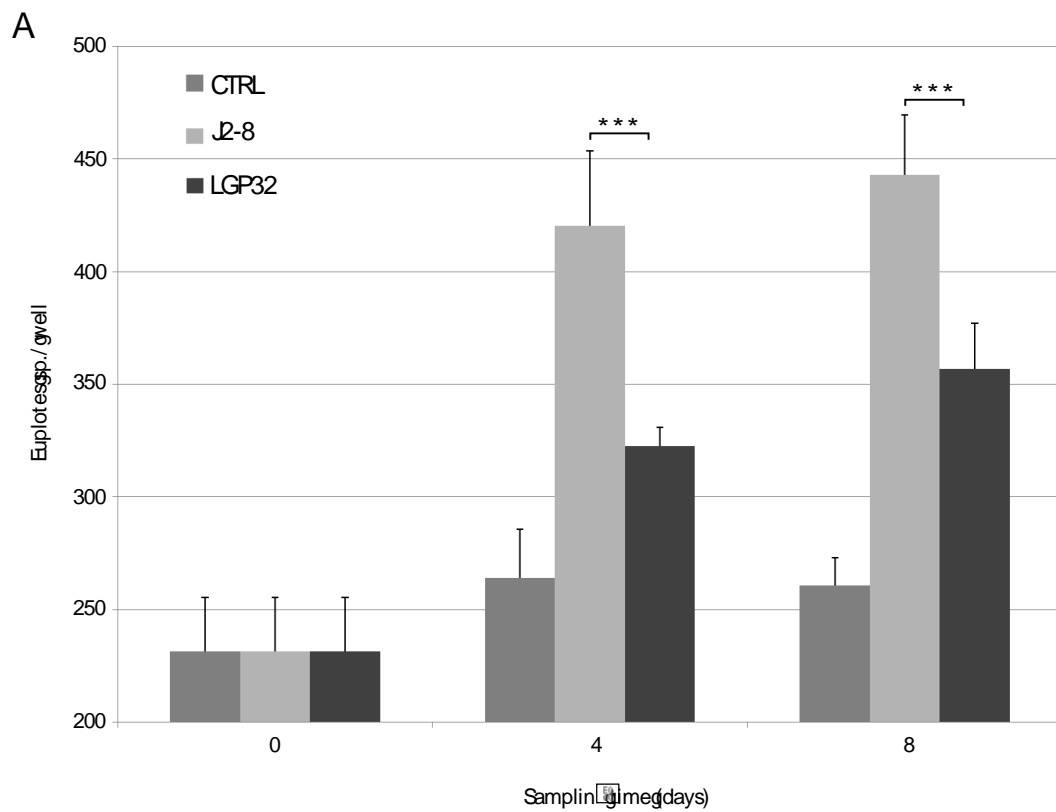
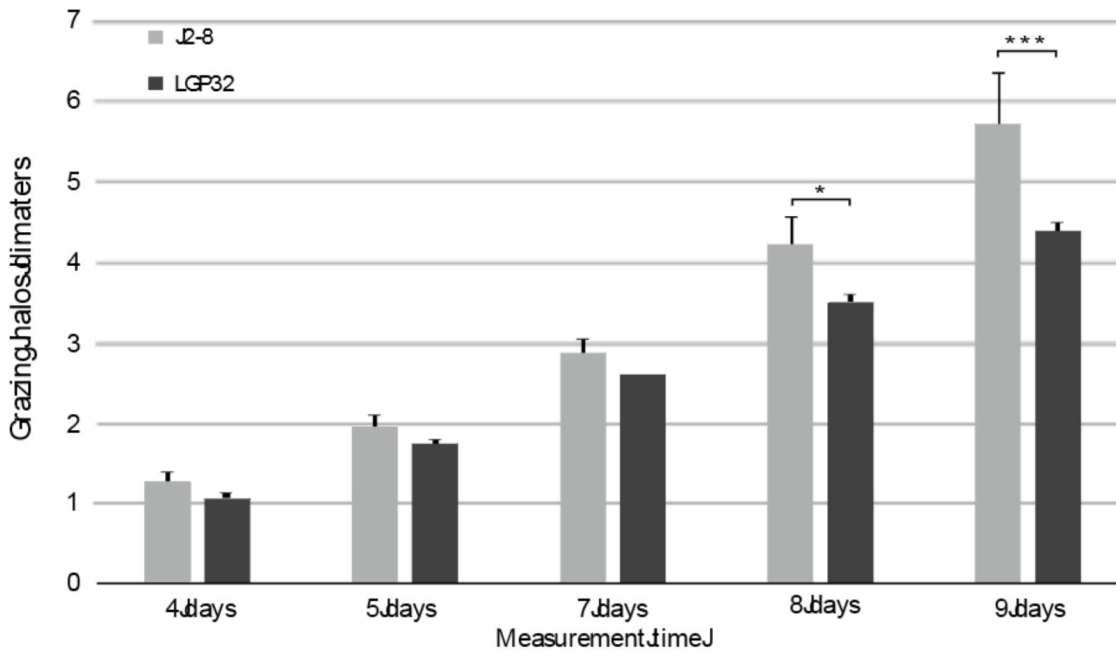


Figure 2. Growth of marine ciliates *Euplotes* sp. is affected by internalized LGP32.





A



B

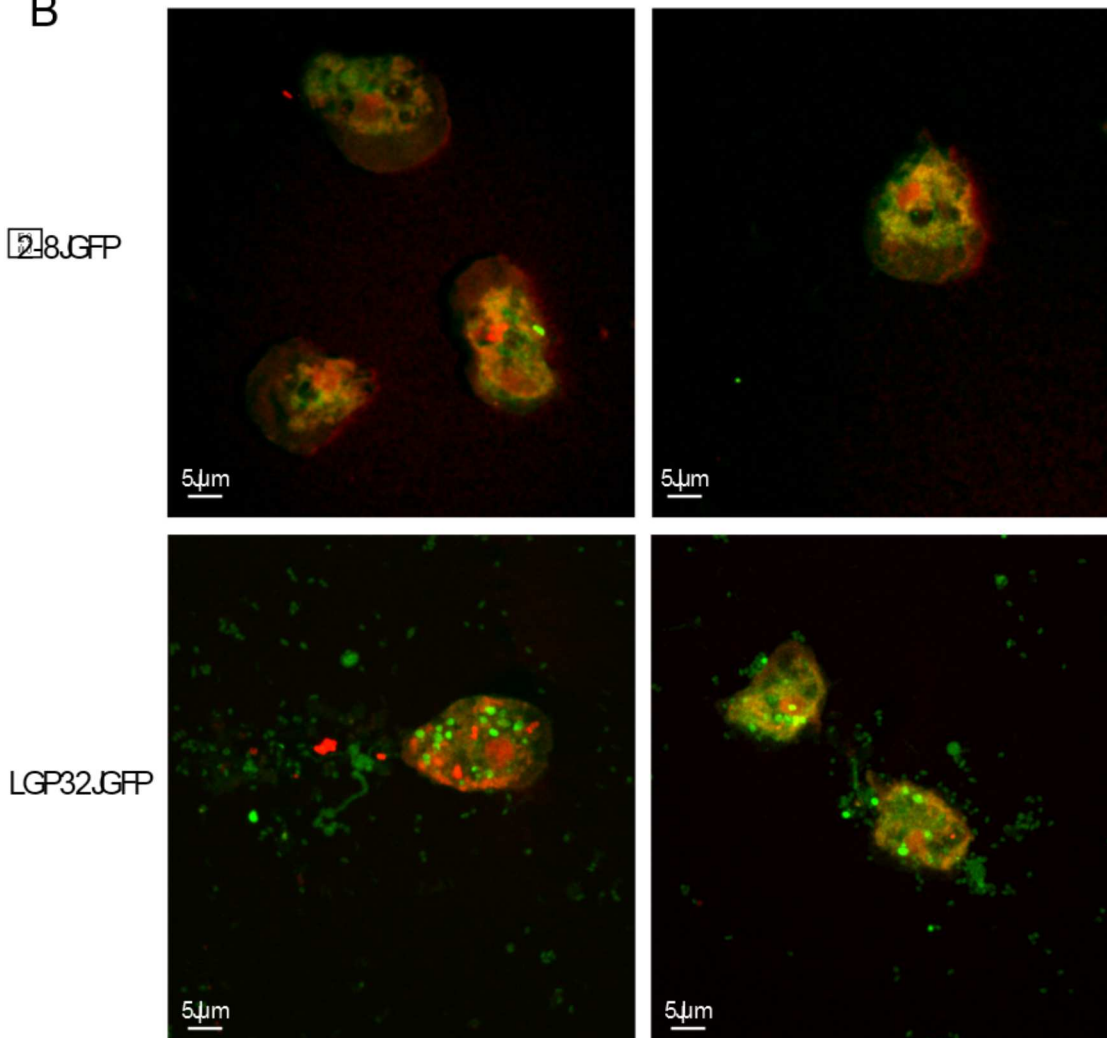


Figure 4. Growth of environmental amoebae *Platyamoeba* sp. is affected by internalized LGP32.

J

CHAPITRE III :  
DISCUSSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES

## CHAPITRE III: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à caractériser les interactions entre différents phagocytes et la souche pathogène d'huître *Vibrio tasmaniensis* LGP32 à diverses échelles (moléculaire, cellulaire et environnementale).

### Formation d'ETs par les hémocytes d'huîtres

La formation d'ETs: un mécanisme antimicrobien conservé dans le règne animal. Cette thèse a permis de démontrer la conservation chez l'huître *C. gigas* de la formation de pièges d'ADN extracellulaire (ETs), identifiée en 2004 chez les vertébrés comme un mécanisme participant à la réponse antimicrobienne. In vitro, nous avons mis en évidence la formation de ces ETs par les hémocytes d'huître *C. gigas*, en réponse à divers agents microbiens. Nous avons également démontré que cet ADN extracellulaire était associé à des histones H5, dont nous avons démontré l'activité antimicrobienne sur diverses souches bactériennes à Gram positif et négatif. In vivo, nous avons également pu observer des ETs, dans des coupes histologiques de muscle de *C. gigas*, en réponse à une blessure ou à une infection par *V. tasmaniensis* LGP32. Des histones H5 antimicrobiennes ont également été isolées à partir de tissus huitres, en réponse à une blessure ou une infection (article I). La formation d'ETs par les polynucléaires neutrophiles (NETs) a été décrite pour la première fois en 2004 par Brinkmann et collaborateurs (Brinkmann et al. 2004). Le composant structural principal des NETs est l'ADN qui est associé à des histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) mais aussi à des protéines granulaires et cytoplasmiques (Brinkmann et al. 2004). Les histones et certaines protéines granulaires contenues dans ces pièges de vertébrés vont exercer une activité antimicrobienne sur certains micro-organismes (Brinkmann et al. 2004), comme nous l'avons observé pour les histones H5 de *C. gigas*.

Si depuis 2004, de nombreuses études ont été réalisées chez les vertébrés, aucune étude n'avait démontré la présence d'ETs chez les invertébrés avant le début de cette thèse en 2012. Seule une étude, réalisée en 2008, avait suggéré que l'injection d'acides nucléiques pouvait renforcer l'immunité chez *Galleria mellonella*, et que ces acides nucléiques induisaient la coagulation de l'hémolymph (Altincicek et al. 2008). Puis, en 2013, des travaux ont montré que les hémocytes de la crevette *Litopenaeus vannamei* étaient capables de libérer des ETs en réponse au phorbol myristate acétate (PMA), au LPS et à *E. coli* (Ng et al. 2013). Les ETs de crevettes sont associés à des histones H1, dont l'activité antimicrobienne avait été démontrée antérieurement, et ces ETs sont capables de piéger des *E. coli*. Parmi les bactéries piégées, certaines apparaissent perméabilisées ou lysées,

ependant les auteurs n'avaient pas démontré que ces altérations étaient dues aux ETs, les bactéries ayant pu être altérées avant d'être piégées (Ng et al. 2013). De plus, contrairement à nos travaux, cette étude n'a montré ni mode régulation de la formation des ETs ni évidences in vivo. De manière concomitante à la publication de nos travaux, une étude montrant la formation d'ETs, par les hémocytes de crabe *Carcinus maenas*, de moule *Mytilus edulis*, et les cellules mésogléales d'anémone de mer *Actinia equina*, a été publiée en 2014 (Robb et al. 2014). Chez *C. maenas*, les auteurs ont montré que les hémocytes pouvaient libérer de l'ADN extracellulaire associé à des protéines homologues de la myéloperoxydase et à des histones H2A, en réponse au PMA et à des bactéries qui ont été retrouvées piégées dans les ETs. La dépendance de la formation de ces ETs à la production de ROS a été démontrée chez cette espèce de crabe. Ces travaux ont également montré, qu'in vivo, la « ETose » pouvait participer au phénomène d'agrégation hémocytaire (Robb et al. 2014). En 2015, le rôle antimicrobien des ETs de crevette *L. vannamei* a été exploré, par une étude réalisée par le même groupe que la première étude de 2013 (Ng et al. 2015). Cette étude a montré que le nombre d'*E. coli* viables (suivi par microscopie de la fluorescence de bactéries GFP) diminuait avec l'augmentation du temps d'incubation ETs-bactéries et qu'un traitement à la DNase permettait une augmentation significative du nombre de bactéries cultivables. De plus, les auteurs ont suggéré qu'en cas de haute densité bactérienne, les ETs avaient une activité antimicrobienne plus importante que la phagocytose. En effet, l'inhibition de la formation des ETs par un traitement à la DNase semble induire une persistance de bactéries cultivables plus importante que par l'inhibition de la phagocytose par cytochalasine D (Ng et al. 2015). Lors de nos travaux, nous n'avons pas étudié l'activité antimicrobienne des ETs d'huîtres sur les différentes bactéries permettant d'induire la formation de ces pièges d'ADN. Nous pourrions de la même façon que cela a été fait dans cette étude tester la cultivabilité de différentes bactéries à Gram positif et Gram négatif avec et sans traitement à la DNase. Il serait également possible de suivre la viabilité de bactéries GFP, par suivi de la fluorescence, au cours d'interactions avec des hémocytes, dans les conditions permettant la formation d'ETs, par vidéo-microscopie. L'activité microbicide des pièges pourrait également être bloquée avec des anticorps ciblant les histones H5 ou des AMPs de *C. gigas*. Nous pourrions ainsi évaluer l'importance des pièges d'ADN extracellulaire dans la réponse antimicrobienne de *C. gigas*.

La production de ROS: un signal conservé qui initie la formation des ETs d'huître. La présence de plages d'histones H5 autour des pièges d'ADN, nous a permis de développer une méthode de quantification de la formation des ETs, par imagerie. Grâce à cette méthode de quantification, nous avons pu montrer que la formation d'ETs chez *C. gigas* est dépendante des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De nombreuses études menées chez les vertébrés ont montré l'implication de la production de ROS, de l'autophagie et de la citrullination des histones dans la formation des ETs.

Cependant, si l'implication de la production des ROS dans la formation des ETs d'invertébrés a été démontrée par notre étude et celle de Robb et collaborateurs (article I; Robb et al. 2014), aucune donnée n'a à ce jour été publiée sur l'implication de l'autophagie ou de la citrullination des histones, chez les invertébrés. Chez les vertébrés, il a été montré que la décondensation de la chromatine nécessaire à la libération des ETs se fait principalement suite à la citrullination de l'histone H3 catalysée par la peptidylarginine déiminase 4 (PAD4) (Wang et al. 2009, Li et al. 2010, Remijnsen et al. 2011a, Remijnsen et al. 2011b, Rohrbach et al. 2012, Pisanu et al. 2015, Lewis et al. 2015). La citrullination est la conversion d'une arginine chargée positivement en une citrulline qui est un acide aminé non conventionnel polaire mais non chargé. Une étude récente menée in vivo et in vitro a montré que l'inhibition de l'activité de la PAD4 permet de prévenir la formation d'ETs par les cellules immunes humaines et murines (Lewis et al. 2015). Il est cependant apparu que l'inhibition de la PAD4 n'est pas suffisante pour prévenir complètement la formation d'ETs par les neutrophiles humains. Le rôle de l'élastase neutrophile a également été démontré dans la décondensation des histones. Cette sérine protéase dégrade partiellement les histones et conduit à la relaxation et à la décondensation de la chromatine (Amulic and Hayes). A ce jour, aucun gène codant pour une enzyme homologue de la PAD4 n'a été identifié chez *C. gigas*, malgré le récent séquençage du génome de *C. gigas* (Zhang et al. 2012). De plus, nous n'avons pas retrouvé cette modification par les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution effectuées au CEA de Grenoble (données non présentées). La régulation par citrullination ne semble donc pas exister chez l'huître (Zhang et al. 2012). Il est également intéressant de souligner que ni le(s) gène(s) codant pour la PAD4 ni la protéine n'ont été identifiés à ce jour parmi les invertébrés, la décondensation de l'ADN semble donc se faire grâce à un autre mécanisme, encore non élucidé, chez les espèces d'Ecdysozoaires et de Lophotrochozoaires.

L'autophagie semble également contribuer au processus de formation des NETs, par inhibition de la voie des caspases et décondensation de la chromatine (Remijnsen et al. 2011b, Mitroulis et al. 2011, Kambas et al. 2012). L'autophagie consiste en l'autodigestion des composants intracellulaires qui sont dégradés dans les endosomes et lysosomes. Le processus d'autophagie permet le maintien de l'homéostasie des organites et des biomolécules. L'autophagie intervient généralement lors du recyclage de ces composants cellulaires en cas de carence et lors du remplacement des organites endommagés ou des protéines mal repliées suite à un stress cellulaire (Levine and Kroemer 2008, Huang et al. 2009, Mitroulis et al. 2010, Deretic et al. 2013). La stimulation de neutrophiles avec du PMA induit une augmentation massive de la vacuolisation. L'analyse par microscopie électronique des vacuoles présentes dans ces neutrophiles révèle la présence d'autophagosomes à différents stades de maturation. De plus, l'inhibition de l'activité de la PI3-K à l'aide de wortmannine inhibe

cette hyper-vacuolisation. L'absence des autophagosomes étant corrélée avec l'inhibition de la formation d'ETs, les auteurs ont alors suggéré que l'autophagie était impliquée dans la NETose (Remijnsen et al. 2011b). La décondensation de l'ADN peut notamment être liée à la formation des vacuoles d'autophagie qui dérivent de la membrane et causent des déchirements de la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui a pour effet d'augmenter le calcium intracellulaire et donc l'activité de la PAD4 permettant la citrullination des histones. Cette étude a également montré que l'induction à la fois de l'autophagie et de la production de ROS était nécessaire pour induire la NETosis, ces deux phénomènes agissant en synergie pour décondenser l'ADN (Remijnsen et al. 2011a, Remijnsen et al. 2011b, Mitroulis et al. 2011, Kambas et al. 2012).

Chez l'huître *C. gigas*, il a récemment été démontré que l'autophagie jouait un rôle clé dans la protection contre le virus pathogène OsHV1 (ostreid herpesvirus 1) (Moreau et al. 2015, Green et al. 2015) et la bactérie pathogène *Vibrio aestuarianus* (Moreau et al. 2015). La publication du génome de *C. gigas* a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans l'immunité innée et, entre autres, dans l'autophagie (Zhang et al. 2012). De manière surprenante, la voie de l'autophagie de *C. gigas* est plus proche de la voie décrite chez l'humain que de celles de *Drosophila melanogaster* ou *Caenorhabditis elegans* (Zhang et al. 2012, Moreau et al. 2015, Green et al. 2015). Moreau et collaborateurs se sont plus particulièrement intéressés au gène codant la protéine LC3 qui, une fois diviée et lipidée (LC3-II), est retrouvée à la surface des autophagosomes. La formation des autophagosomes ainsi que leur fusion avec les lysosomes ont pu être étudiées à l'aide d'anticorps ciblant LC3-II. Les auteurs ont alors montré que les 2 pathogènes étudiés (un viral et un bactérien) induisaient l'autophagie et que l'inhibition de cette voie augmentait la susceptibilité de *C. gigas* aux infections (Moreau et al. 2015). Les auteurs de cette étude ont utilisé le NH<sub>4</sub> Cl, qui diminue l'acidification des lysosomes, pour inhiber le déclenchement du processus d'autophagie et la carbamazépine pour stimuler cette voie (Hidvegi et al. 2010). L'autophagie jouant un rôle important dans l'immunité de l'huître *C. gigas*, il pourrait être intéressant d'étudier son rôle dans la formation d'ETs, notamment en l'inhibant ou en la stimulant (réactifs utilisés par Moreau et al, 2015) afin de voir si cela module la formation d'ETs.

Populations hémocytaires productrices d'ETs. Si la formation d'ETs est clairement associée à l'infiltration hémocytaire dans les tissus d'huître blessés ou infectés, on ignore à ce jour si leur formation implique des types hémocytaires particuliers. Les hémocytes de l'huître ont été classifiés en 2 catégories : cellules agranuleuses et granulocytes (Cheng 1981, Bachere et al. 1988, Ashton-Alcox and Ford 1998, Hine 1999, Aladaileh et al. 2007). Les cellules granuleuses ou granulocytes ont été divisées en basophiles et en éosinophiles (Hine 1999, Bachere et al. 2004). Cependant, si les hémocytes ont pu être classifiés, nous ne disposons pas à ce jour de techniques permettant de trier

les différentes populations sans les fixer. Seules la taille et la granulosité des hémocytes permettent de les différencier, le tri est alors possible par cytométrie en flux. Cependant, les hémocytes vivants s'agglutinent rendant ce tri impossible pour des cellules uniques. Il faudrait alors mettre au point un protocole permettant de contrer l'agglutination des cellules immunitaires de l'huître afin d'identifier la population hémocytaire à l'origine des ETs. L'étude de Robb et al, en 2014 a montré qu'un prétraitement des hémocytes de crabe avec de la DNase-1 permettait d'inhiber l'agrégation, nous pourrions donc envisager de prélever les hémocytes de *C. gigas* en présence de cette DNase (Robb et al. 2014). La structure, les fonctions de phagocytose et l'infiltration des granulocytes rappelant les neutrophiles de vertébrés, nous pouvons supposer que c'est cette population hémocytaire qui est à l'origine des ETs de *C. gigas*.

En conclusion, la formation de pièges d'ADN extracellulaire est un mécanisme antimicrobien très nouvellement connu chez les invertébrés, qui s'ajoute chez l'huître à un arsenal antimicrobien déjà bien décrit (pour revue voir annexe II). Il a en effet été décrit que les hémocytes, cellules circulantes jouant un rôle majeur dans l'immunité de l'huître, sont capables de phagocytose. La dégradation des microorganismes phagocytés repose en partie sur le burst oxydatif qui est une réponse majeure à l'infection caractérisée depuis de nombreuses années dans cette espèce (Bachere et al. 2004). L'immunité de ces mollusques bivalves met également en jeu une réponse non oxydative très conservée dans le règne vivant, reposant sur des enzymes et des peptides possédant des propriétés antimicrobiennes. Parmi ces effecteurs, quatre lysozymes ainsi que plusieurs familles de peptides antimicrobiens produits par les hémocytes et parfois aussi par les tissus de *C. gigas* ont été identifiés (pour revue voir Schmitt P et al., 2011 et annexe II). Ces peptides antimicrobiens (AMPs), qui sont des effecteurs majeurs de la défense immunitaire des invertébrés ont été décrits pour intervenir en cas d'infection mais aussi de traumatismes mécaniques, de dommages aux tissus ou de mort cellulaire contrôlée. La libération d'histones extracellulaire via une réponse de type ETose vient donc compléter l'arsenal antimicrobien caractérisé chez l'huître.

## Résistance de *V. tasmaniensis* LGP32 à la phagocytose

*V. tasmaniensis* LGP32 résiste à la phagocytose des hémocytes de *C. gigas*. Des travaux réalisés dans l'équipe au cours de cette thèse ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène résistant à la dégradation intracellulaire par les hémocytes de *C. gigas*, du fait de ses capacités de survie intracellulaire et de sa cytotoxicité pour ces cellules immunitaires (annexe I). Si les *Vibrio* ont longtemps été considérés comme des pathogènes extracellulaires, de plus en plus d'études récentes menées sur des *Vibrio* pathogènes ont montré que ces bactéries peuvent adopter des stades de vie intracellulaire. En effet, il a été démontré que les pathogènes humains *V. cholerae* et *V.*



parahaemolyticus (de Souza Santos and Orth 2014, Ma et al. 2009a) ainsi que les pathogènes de coraux *Vibrio shiloi* (Rosenberg and Falkovitz 2004) et *Vibrio coralliilyticus* (Vidal-Dupiol et al. 2011) sont capables d'envahir des cellules épithéliales, de survivre et de se répliquer en intracellulaire. Une étude récente a également montré que le pathogène humain *V. cholerae* était capable de résister à la phagocytose par des macrophages de souris, grâce à la translocation d'effecteurs bactériens. De manière intéressante, ces effecteurs bactériens sont nécessaires à la virulence de *V. cholerae* : une fois ces effecteurs transloqués, *V. cholerae* s'était en effet montré capable d'envahir les cellules épithéliales et ainsi de coloniser leur hôte (de Souza Santos and Orth 2014). *V. tasmaniensis* LGP32 est donc à jour le seul *Vibrio* décrit pour envahir uniquement des phagocytes professionnels, que sont les hémocytes de *C. gigas*, au cours du processus infectieux.

*V. tasmaniensis* LGP32 lyse les hémocytes de *C. gigas* par cytotoxicité. De plus, ces travaux ont montré que la lyse par cytotoxicité de LGP32 était dépendante de la phagocytose. Enfin, ces travaux ont identifié la réponse anti-oxydante et l'efflux de cuivre comme des éléments majeurs dans les phénomènes de survie intracellulaire et de cytotoxicité (annexe I). Si la lyse des cellules cibles est une caractéristique commune aux pathogènes intracellulaires, la cytotoxicité des pathogènes n'est pas corrélée à leur capacité d'invasion cellulaire. Par exemple, la cytotoxicité de *Salmonella* spp. pour les macrophages ne dépend pas de l'invasion cellulaire mais de stimulus de sécrétion de type III injectant des effecteurs protéiques impliqués dans l'apoptose des cellules immunitaires (Chen, Kaniga and Galan 1996). A l'inverse, *Shigella* est capable d'induire la nécrose des macrophages de manière dépendante de l'invasion des cellules de l'hôte mais aussi l'apoptose des cellules de manière indépendante de cette invasion (Nonaka et al. 2003).

L'interaction entre *V. tasmaniensis* et LGP32 est maintenant bien décrite, cependant il n'est pas élucidé à ce jour si la lyse des hémocytes est suffisante pour causer la mort des huîtres ou si LGP32 cible d'autres tissus de *C. gigas*. De plus, une grande diversité de *Vibrio* du clade *Splendidus* a été associée aux épisodes de mortalités estivales de juvéniles de *C. gigas* (Lemire et al. 2015). Il serait intéressant d'explorer cette diversité de pathogènes et d'étudier leur tropisme tissulaire ainsi que leurs mécanismes d'interactions avec les hémocytes, afin de déterminer si certains mécanismes de virulence peuvent être communs aux *Vibrio* du clade *Splendidus* pathogènes. Cette question sera abordée dans le cadre de la thèse de Tristan Rubio.

*V. tasmaniensis* LGP32 résiste à la phagocytose de phagocytes environnementaux. Cette thèse a également montré que *V. tasmaniensis* LGP32 est capable de résister à la phagocytose de protistes environnementaux, tels que des ciliés appartenant au genre *Euplotes* sp. et des amibes appartenant à la classe des *Vannellidae*, isolées de l'environnement direct des huîtres de l'étang de Thau. De plus,

il a été montré que ce pathogène intracellulaire facultatif de l'huître était internalisé par les protistes environnementaux (article II). Nous avons en effet montré dans cette thèse que *V. tasmaniensis* LGP32 affecte la croissance des protistes hétérotrophes environnementaux que sont les *Euplotes* sp. et les amibes appartenant à la classe des Vannellidae isolées de l'étang de Thau. Or il est admis dans la littérature que la discrimination des bactéries résistantes à la phagocytose peut se faire par suivi de la croissance des protistes hétérotrophes (Greub and Raoult 2004). De plus, nos images de microscopie confocale ont montré que LGP32 avait été internalisé par les protistes. Nous avons donc conclu que *V. tasmaniensis* LGP32 est résistant à la dégradation intracellulaire par les protistes hétérotrophes, comme cela a déjà été montré pour les vibrios pathogènes humains : *V. cholerae* (Abd et al. 2007b , Abd et al. 2009, Sandstrom et al. 2010 , Valeru et al. 2014 , Van der Henst et al. 2015) et *V. mimicus* (Abd et al. 2010). Ces vibrios sont en effet capables de résister à la dégradation intracellulaire par les amibes modèles, d'eau douce, *Acanthamoeba castellanii* qui sont des régulateurs aquatiques des communautés bactériennes, présents avec *V. cholerae* dans les zones endémiques de cholera (Sandstrom et al. 2010 , Shanan et al. 2011). Ces études ont montré que *V. cholerae* est capable de survivre et de se multiplier dans les amibes, faisant d'*A. castellanii* des potentiels réservoirs environnementaux pour ce pathogène intracellulaire facultatif (Abd et al. 2007b , Abd et al. 2007a , Abd et al. 2009, Sandstrom et al. 2010 , Valeru et al. 2014 , Van der Henst et al. 2015). De plus, il a également été montré que la co-culture de *V. cholerae* avec *A. castellanii* améliore le taux de survie des bactéries en milieu contrôlé riche en glucose (Abd et al. 2007b , Abd et al. 2009 , Sandstrom, Saeed and Abd 2011 , Valeru et al. 2014) et en milieu pauvre (Van der Henst et al. 2015).

Mécanismes de résistance à la dégradation intracellulaire. Les *V. cholerae* résistants à la dégradation peuvent être libérés par exocytose dans le milieu extracellulaire ou établir une niche de répllication dans la vacuole contractile d'*A. castellanii* (Van der Henst et al. 2015). Lorsque *V. cholerae* envahit la vacuole contractile, les amibes *A. castellanii* s'enkystent avec le pathogène en intracellulaire. Après prolifération, les bactéries vont s'échapper dans le cytosol du kyste puis vont le lyser pour être libérées dans l'environnement extracellulaire (Van der Henst et al. 2015). Si les mécanismes conduisant à la lyse des vacuoles contractiles et des kystes amibiens restent inconnus, Van der Henst et collaborateurs ont démontré que l'exopolysaccharide VPS impliqué dans la formation de biofilms est nécessaire à ces phénomènes (Van der Henst et al. 2015), cette production de VPS est négativement régulée par le régulateur de quorum sensing HapR. De manière intéressante, Valeru et collaborateurs ont récemment démontré que les mutants *OmpA* produisaient plus de vésicules de membrane externe (OMVs) et que les OMVs (des mutants *OmpA* et WT) induisaient une diminution de la viabilité des amibes et une augmentation de la viabilité des

bactéries (Valeru et al. 2014). Les OMVs de *V. cholerae* ont été proposés pour favoriser la délivrance de facteurs de virulence aux cellules hôtes (Smith et al. 2007, Valeru et al. 2014). Or il a récemment été démontré par notre équipe que *V. tasmaniensis* LGP32 produisaient des OMVs à la fois en extracellulaire et en intracellulaire, dans le phagosome des hémocytes d'huître. Ces OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 jouent un rôle dans la virulence de la bactérie, notamment par encapsulation de protéases, et dans sa résistance aux défenses de l'hôte, et plus particulièrement aux peptides antimicrobiens (Vanhove et al. 2015a). Nous pourrions alors étudier le rôle des OMVs de *V. tasmaniensis* LGP32 dans l'interaction protistes - LGP32 et leur impact sur la survie des protistes, plus particulièrement des amibes environnementales *Platyamoeba* sp., que nous sommes désormais en mesure de cultiver au laboratoire.

Mécanismes d'échappement au grazing. De plus, il a été montré que les *V. cholerae* pouvaient également résister à la phagocytose en empêchant leur internalisation par les protistes. En effet, l'équipe de McDougald a montré qu'en réponse au grazing par des protistes hétérotrophes (*A. castellanii* et ciliés), ces bactéries vont d'une part subir une variation de phase (phénotype du lipopolysaccharide) pour passer des variants lisses à rugueux et d'autre part former des biofilms pour résister à l'internalisation et persister dans l'environnement. Ces variations de phase et formation de biofilms ont été corrélés à la production d'exopolysaccharide VPS et à l'expression du régulateur du quorum sensing hapR (Matz et al. 2005, Erken et al. 2011, Sun, Kjelleberg and McDougald 2013). Le régulateur du quorum sensing HapR a également été montré impliqué dans la régulation de la formation des biofilms, de l'expression de gènes de virulence chez *V. cholerae*, et a été relié à la production d'un facteur anti-protozoaire qui induit la mort de ces cellules (Hammer and Bassler 2003, Waters et al. 2008, Matz et al. 2005, Erken et al. 2011, Sun et al. 2013, Erken, Lutz and McDougald 2015). Le VPS est le composant majeur de la matrice extracellulaire des biofilms et semble protéger les bactéries en empêchant l'accès du prédateur (Erken et al. 2011, Sun et al. 2013). De manière intéressante, Van der Henst et collaborateurs ont démontré que le polysaccharide VPS était également nécessaire à la lyse des amibes lorsque les *V. cholerae* résistent à la phagocytose de manière intracellulaire (Van der Henst et al. 2015). La formation de biofilms semble donc avoir un rôle central dans la résistance de *V. cholerae* à la phagocytose des protistes hétérotrophes, que ce soit par échappement à l'internalisation ou par survie et multiplication intracellulaire puis lyse des cellules. Une récente étude menée sur *V. tasmaniensis* LGP32 a montré la capacité de cette bactérie à former des biofilms sur des surfaces PVC (Vezzulli et al. 2015). Des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation de biofilms ont également été montrés différenciellement exprimés dans des *V. tasmaniensis* LGP32 internalisés par des hémocytes de *C. gigas*, par RNA-seq (Table S1 annexe I). Ces résultats nous amènent à nous demander si *V. tasmaniensis* LGP32 présente

également ce double phénotype de résistance à la phagocytose : résistance à la dégradation intracellulaire et résistance à l'internalisation, et si la formation de biofilms joue un rôle aussi important que chez *V. cholerae* dans la résistance à la phagocytose. Pour cela, nous pourrions faire des premiers tests en vidéo-microscopie afin de voir si tous les *V. tasmaniensis* LGP32 sont internalisés par les protistes. Nous pourrions également nous intéresser à l'importance de la formation de biofilms par *V. tasmaniensis* LGP32 lors de leur mise contact avec des protistes, à l'aide de mutants *Vps* et *HapR* de LGP32.

Autres espèces bactériennes résistantes à la dégradation par les amibes. Les vibrios pathogènes humains ne sont pas les seules bactéries résistantes aux amibes décrites dans la littérature. En 2010, Thomas et collaborateurs ont établi une liste de 102 pathogènes qui ont été décrits pour leurs interactions avec des protistes environnementaux (amibes libres mais aussi *Dictyostelium discoideum* et les ciliés *Tetrahymena pyriformis*) (Thomas et al. 2010) Parmi ces pathogènes sont notamment retrouvés : *Legionella pneumophila* (Anacarso et al. 2010, Bouyer et al. 2007b, Orillo et al. 1999, Orillo et al. 1994), *Mycobacterium* spp. (Orillo et al. 1997 , Taylor et al. 2003 , Amissah et al. 2014), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Wildschutte and Lawrence 2007 , Douesnard-Malo and Daigle 2011, Sillo et al. 2011), *Francisella tularensis* (Abd et al. 2003) et *Shigella* spp. (Saeed et al. 2009). Si la croissance de ces pathogènes est toujours augmentée en présence d'amibes, leur effet sur ces protistes diffère. En effet, certains pathogènes comme *Mycobacterium* spp. et *Shigella* spp. vont uniquement résister à la phagocytose et utiliser les amibes comme réservoirs environnementaux (Orillo et al. 1997 , Taylor et al. 2003 , Amissah et al. 2014 , Saeed et al. 2009 , Thomas et al. 2010) quand d'autres pathogènes comme *Legionella pneumophila* et *Francisella tularensis* vont causer une diminution du nombre d'amibes, par lyse cellulaire (Richards et al. 2013 , Qureshi et al. 1993 , Pukatzki, Kessin and Mekalanos 2002 , Abd et al. 2003 , Abd et al. 2008). Les mécanismes induisant la lyse des amibes par *Legionella pneumophila* et *Francisella tularensis* restent à ce jour inconnus. Des travaux réalisés pendant cette thèse (annexe I) ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 induisait la lyse par cytotoxicité des hémocytes qu'il infecte. De plus, nos images de microscopie confocale ont montré que *V. tasmaniensis* LGP32 induisait des dommages cellulaires aux *Platyamoeba* sp. environnementales (article II), il serait donc intéressant d'étudier le taux de survie des amibes mises en contact avec LGP32. Pour cela, nous pourrions notamment suivre la lyse amibienne, grâce au test de cytotoxicité développé au laboratoire au cours de cette thèse (annexe I). Il pourrait également être intéressant de suivre l'interaction *V. tasmaniensis* LGP32/*Platyamoeba* sp., en eau de mer diluée au demi, pendant plusieurs jours en microscopie confocale inversée afin de voir si les bactéries se multiplient dans les amibes et/ou si elles ont toujours la même localisation au cours de l'interaction. Nos images de microscopie montrant qu'une partie des *V. tasmaniensis* LGP32

sont extracellulaires après 24h de contact avec les *Platyamoeba* sp. nous pourrions également voir si ces bactéries ont été internalisées par les amibes puis en sont ressorties ou si elles ont résisté à l'internalisation.

Rôle des an<sup>10</sup>ox<sup>10</sup> dans<sup>5</sup> le<sup>10</sup> de l'efflux de cuivre dans les mécanismes de survie. Des travaux réalisés dans l'équipe au cours de cette thèse ont montré que l'efflux de cuivre et la réponse anti-oxydante jouent un rôle important la survie intracellulaire et la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32, lorsqu'il est en contact avec des hémocytes d'huîtres (annexe I). Les mêmes observations ont été faites pour les pathogènes intracellulaires *Mycobacterium tuberculosis* (Wolschendorf et al. 2011 , Neyrolles et al. 2013), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Osman et al. 2010 , Achard et al. 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Schwan et al. 2005) et *Listeria monocytogenes* (Francis and Thomas 1997). Ceci peut s'expliquer par la grande conservation des mécanismes de dégradation des microbes phagocytés au travers des espèces. Deux revues récentes posent l'hypothèse que (i) comme cela a été observé chez les métazoaires, les amibes peuvent éliminer les bactéries grâce à des mécanismes d'influx de cuivre et de zinc et de production d'espèces réactives de l'oxygène, et que (ii) les mécanismes bactériens de résistance au cuivre ont été sélectionnés dans l'environnement par la prédation exercée par les protistes (German et al. 2013 , Hao et al. 2015). Cette hypothèse est soutenue par le fait que les amibes possèdent des systèmes d'influx de cuivre et de burst oxydant similaires à ceux des cellules immunitaires de métazoaires (Davies et al. 1991 , Burlando et al. 2002 , German et al. 2013 , Hao et al. 2015). Les amibes contiennent en effet des homologues de transporteurs de cuivre *Ctr1* et d'ATPases de type P, retrouvés chez les macrophages mais également chez les hémocytes de *C. gigas* (Wang et al. 2013b , German et al. 2013 , Hao et al. 2015). De plus, certaines bactéries résistantes à la fois aux amibes et aux macrophages, telles que *Salmonella* spp. et des souches virulentes d'*E. coli* possèdent des systèmes d'efflux de cuivre comme les ATPases de type P dénommées *CopA* (Outten et al. 2001 , Espariz et al. 2007, Sillo et al. 2011 , Chekabab et al. 2013) qui ont été retrouvées chez LGP32 (annexe I). Au vue des ces données, nous pourrions étudier l'impact de l'efflux de cuivre sur la survie de *V. tasmaniensis* LGP32 au contact des amibes environnementales *Platyamoeba* sp. Pour cela, nous envisageons de caractériser les interactions entre les *Platyamoeba* sp. et les mutants <sup>10</sup>*CopA* et <sup>10</sup>*CusAB* construits récemment au laboratoire (annexe I).

In<sup>10</sup>ractions<sup>10</sup> vibrios/ amibes dans l'environnemen<sup>10</sup> Nos travaux ont permis de démontrer les possibilités d'interaction entre les amibes environnementales de la classe des Vannellidae et les *Vibrio* du clade *Splendidus*. Cependant, les mises en contact ayant été réalisées en laboratoire, nous pouvons donc nous demander si ces micro-organismes interagissent dans leur environnement naturel. Pour étudier cela, des expériences d'Hybridation in situ en fluorescence (FISH) pourraient

être réalisées directement sur des échantillons d'eau, après filtration, en utilisant des sondes spécifiques aux *V. tasmaniensis* LGP32 et aux amibes de la classe des Vannellidae. Cette technique a récemment été utilisée pour localiser des endosymbiontes d'amibes marines (sondes spécifiques des endosymbiontes bactériens et larges pour les eucaryotes, les amibes étant isolées) (Schulz et al. 2015). Il serait également possible de cultiver les amibes isolées de l'environnement sur des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* afin de réaliser des analyses ciblant le gène codant ADN ribosomal bactérien 16S, comme cela a été fait pour étudier les associations bactériennes existant avec des amibes d'eau douce isolées de réseaux d'eau (Delafont et al. 2014, Delafont et al. 2013). Ces analyses pourraient également cibler des gènes spécifiques des *Vibrio* du clade *splendidus*.

Vers une caractérisation fine des mécanismes d'échappement à la dégradation intracellulaire. Au cours de cette thèse, nous avons également essayé de développer des interactions entre l'amibe modèle *A. castellanii* et *V. tasmaniensis* LGP32, le modèle environnemental présentant certaines limitations. Nous avons choisi *A. castellanii* car il s'agit d'une amibe libre aquatique dont le génome a récemment été séquencé (Clarke et al, 2013) et dont la culture et la biologie cellulaire sont maîtrisées. De plus, des transfections de gènes ont été réalisées sur cette amibe modèle (Peng et al, 2005), ce qui aurait pu nous permettre d'étudier les mécanismes moléculaires fins de l'interaction entre ces phagocytes et *V. tasmanienis* LGP32. Toutefois, *A. castellanii* étant adaptée à l'eau douce et *V. tasmanienis* LGP32 au milieu marin côtier, nous n'avons pas réussi à trouver des conditions expérimentales dans lesquelles ces deux organismes pouvaient présenter de bonnes conditions physiologiques. Selon les conditions testées, soit les amibes s'enkystaient, soit les *V. tasmanienis* LGP32 avaient une croissance ralentie ou devenaient viables non cultivables.

## Diversité amibienne dans l'environnement proche des huîtres

Les amibes isolées de l'environnement direct des huîtres sont majoritairement des Vannellidae. Au cours de cette thèse, nous avons pu isoler des amibes appartenant à la classe des Vannellidae, à chaque saison de l'année 2014, à partir de la colonne d'eau et du sédiment situés à proximité des tables à huîtres ainsi qu'à partir de branchies d'huîtres, tous issus de l'étang de Thau. Une amibe appartenant au genre *Acanthamoeba* a également pu être isolée de branchies d'huîtres pendant l'été (article II). Les amibes appartenant à la sous-classe des Vannellidae sont décrites depuis 1983 pour faire partie des amibes marines (Page 1983). La première étude portant sur les amibes marines est celle de Page en 1983, qui a défini 22 genres d'amibes marines en se basant sur la taille, la structure nucléaire, l'apparence de la forme locomotive (trophozoïte), les inclusions cytoplasmiques, le cycle de vie, l'ultra-structure et les caractères physiologiques de chacun de ces protistes (Page 1983). Les *Vannella* et *Platyamoeba* faisaient partie de ces 22 genres amibiens, dont 19

appartenaient aux classes des Discosea et Tubulinea du sous règne des Lobosa lui-même compris dans le règne des Amoebozoa, et 3 à la classe des Heterolobosea, du règne des Percolozoa. La présence de ces Vannellidae dans l'environnement marin a ensuite été confirmée par les données moléculaires ciblant le gène codant l'ARNr 18S (Moran et al. 2007, Nasonova et al. 2010), ainsi que le gène codant cytochrome C oxydase et les espaceurs internes de transcrits (ITS) (Nasonova et al. 2010). De plus, une étude phylogénétique réalisée à partir de l'alignement de 1906 résidus du gène codant l'ARNr 18S a montré que les genres *Platyamoeba* et *Vannella* étaient mixés et que ces deux genres peuvent se réunir en un seul (Smirnov et al. 2007). Ces travaux ont demandé un effort de mise au point pour la culture de ces amibes et leur maintien en milieu liquide. En effet, nos travaux ont permis la première isolation d'amibes à partir de l'étang de Thau. Les amibes de cette classe disponibles dans le commerce sont cultivées uniquement en présence de bactéries, sur géloses. Nous avons donc mis au point un protocole permettant le passage de ces amibes en milieu liquide, avec un traitement aux antibiotiques assurant l'absence de bactéries. Les Vannellidae ont alors pu être maintenues jusqu'à 7 jours en milieu liquide exempt de bactéries, afin de pouvoir réaliser des contacts avec *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassotreae* J2-8.

Les amorces que nous avons dessinées pendant ces travaux étaient prévues pour réaliser des expériences de métagénomique sur des échantillons environnementaux d'eau, de sédiment et de branchies d'huîtres, sans étape de culture. Elles étaient donc très stringentes et n'ont peut être pas permis d'identifier toutes les amibes présentes dans nos échantillons. Afin d'être plus exhaustifs, nous pourrions réaliser des expériences de métagénomique en prélevant des échantillons tous les mois ou utiliser le protocole mis en place par le consortium "CBOL Protist Working Group" (Pawlowski et al. 2012). Ce consortium a proposé d'identifier les protistes environnementaux par un barcoding en 2 étapes. Dans ce protocole, chaque protiste serait isolé en cellules uniques, afin de réaliser des cultures clonales. L'ADN de ces protistes serait alors extrait et le pré-barcoding pourrait être réalisé en ciblant la boucle V4 du gène codant l'ARNr 18S. Ensuite, ce consortium suggère de réaliser une deuxième étape de barcoding groupe spécifique, pour les amibes il faudrait cibler le gène codant cytochrome C oxydase (Pawlowski et al. 2012).

# CONCLUSION GENERALE



## CONCLUSION GENERALE

Les surmortalités d'huîtres *C. gigas* juvéniles, dites estivales sont le fruit d'une maladie multifactorielle qui se produit dans des milieux marins côtiers fortement anthropisés et qui met en jeu des associations de pathogènes (virus herpes OsHV-1 et vibrios du clade *Splendidus*) et des conditions climatiques particulières (température de l'eau de mer). La génétique de l'hôte joue aussi un rôle déterminant dans la susceptibilité aux mortalités estivales (Segarra et al. 2010, Lacoste et al. 2001, Gay et al. 2004b, Gay et al. 2004a, Saulnier et al. 2010). On ignore encore très largement à l'heure actuelle les mécanismes explicatifs de ces mortalités et le poids relatif de chacun des facteurs décrits ci-dessus.

Cette thèse s'est concentrée sur les interactions entre les phagocytes et une souche de *Vibrio* pathogène associée à ces mortalités : la souche *V. tasmaniensis* LGP32 isolée par Le Roux et collaborateurs en 2004 (Gay et al. 2004a, Gay et al. 2004b) et dont la capacité à envahir les hémocytes de l'huître avait été mise en évidence plus récemment dans notre équipe (Duperthuy et al. 2011). De plus, des travaux réalisés dans l'équipe au cours de cette thèse ont permis de compléter la compréhension du processus infectieux de LGP32 vis-à-vis des hémocytes de l'huître. Ces travaux ont mis en évidence une cytotoxicité de LGP32 sur les hémocytes qui s'exprime quelques heures après l'internalisation des LGP32 et qui est dépendante de la phagocytose. Cette cytotoxicité conduit à la lyse des hémocytes, les bactéries se retrouvant alors libérées dans le milieu extracellulaire (annexe I).

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à la caractérisation d'un mécanisme antimicrobien encore inconnu chez les invertébrés, qui est mis en place par les hémocytes de *C. gigas*, en réponse à *V. tasmaniensis* LGP32 mais aussi à d'autres agents microbiens. Ce mécanisme est la formation de pièges d'ADN extracellulaire, associés à des histones antimicrobiennes (ETs), qui sont capables de piéger les bactéries. Nous avons montré que, comme chez les vertébrés, la formation de ces ETs est dépendante de la production d'espèces réactives de l'oxygène. De plus, la présence de ces ETs a été confirmée *in vivo* et a été associée à une accumulation d'histones antimicrobiennes dans les tissus, suite à une blessure ou à une infection (article I). Ce mécanisme antimicrobien s'ajoute chez l'huître à un arsenal antimicrobien déjà bien décrit (pour revue voir annexe II). Au delà d'une meilleure compréhension de l'immunité de l'huître, ce mécanisme antimicrobien conservé au sein du règne animal est un nouvel élément qui montre la très grande conservation des mécanismes de l'immunité innée chez les métazoaires.

Dans le milieu aquatique, les *Vibrio* sont en contact avec des protistes hétérotrophes tels que les amibes et les ciliés, véritables phagocytes de l'environnement qui se nourrissent de micro-organismes par phagocytose. Or, la phagocytose est un processus très conservé au cours de l'évolution (Boulais et al. 2010). Nous nous sommes donc intéressés aux interactions que le pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 pouvait avoir avec ces protistes environnementaux. Un résultat important de cette thèse a été de montrer que *V. tasmaniensis* LGP32 résiste à la dégradation intracellulaire par des protistes hétérotrophes environnementaux. Les amibes que nous avons isolées étaient présentes dans l'environnement direct des huîtres et *V. tasmaniensis* LGP32 s'est montré résistant à la phagocytose de ces protistes, nous pouvons donc supposer que la pression de grazing exercée par les phagocytes environnementaux a pu permettre de sélectionner des souches résistantes à la phagocytose, comme *V. tasmaniensis* LGP32 (article II). La théorie de la reine rouge formulée par Leigh Van Valen en 1973 se base sur le fait que les interactions entre organismes conduisent à des courses évolutives permanentes pour éviter l'extinction et seraient donc le principal moteur de l'évolution (Van Valen 1973). Les interactions vibrios/amibes pourraient alors s'inscrire dans la coévolution antagoniste ou théorie de la reine rouge, reposant sur le fait que les proies ont la capacité de répondre à la pression de sélection permanente liée à la présence de prédateurs, et inversement. Dans le contexte de nos travaux, une telle course évolutive aurait pu conduire à l'émergence de phénotypes intracellulaires chez les vibrios.

La sélection de tels phénotypes peut résulter d'événements de transfert horizontal de gènes. Les bactéries sont capables d'acquérir des mécanismes de résistance par mutation, par les intégrons et par transferts génétiques horizontaux ou verticaux, grâce aux éléments génétiques. Les éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les transposons, les cassettes géniques associées aux intégrons jouent un rôle évolutif majeur dans l'adaptation des communautés microbiennes car ils sont le support, par exemple, de gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds et de gènes de virulence impliqués dans la pathogénicité. Une étude récente a montré que de nombreux gènes transférés et éléments génétiques mobiles étaient présents dans le génome des micro-organismes vivant dans les amibes. Les auteurs ont suggéré que ces protistes constituent un "melting pot" de gènes permettant l'évolution des divers micro-organismes dans la même direction, pour s'adapter à la vie intra - amibienne, ce qui peut aboutir à la création de nouveaux agents pathogènes (Moliner, Fournier and Raoult 2010). Les amibes environnementales ont donc pu favoriser par transfert de gènes l'émergence de pathogènes d'huîtres. Chez la souche LGP32, il a été montré que l'homéostasie du cuivre est un composant majeur de la capacité de survie de LGP32 dans les hémocytes d'huître (annexe I). Or les amibes utilisent également des mécanismes d'influx de cuivre pour éliminer les micro-organismes phagocytés. Nous pouvons donc nous demander si les gènes

impliqués dans l'homéostasie du cuivre qui sont essentiels à la vie des vibrios chez les invertébrés marins le sont aussi chez les protistes hétérotrophes environnementaux, et s'ils ont pu être acquis par transfert horizontal de gènes.

Enfin, l'étude des mécanismes moléculaires permettant la résistance de *V. tasmaniensis* LGP32 à la phagocytose des protistes de l'étang de Thau pourrait permettre de mieux comprendre comment LGP32 résiste aux hémocytes d'huîtres.

# BIBLIOGRAPHIE

# BIBLIOGRAPHIE

## -A-

- Abd, H., T. Johansson, I. Golovliov, G. Sandstrom & M. Forsman (2003) Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 600-606.
- Abd, H., A. Saeed, B. Advinsson & G. Sandstrom (2007a) *Acanthamoeba castellanii* is a model for eukaryote-prokaryote interaction and a human pathogen. *International journal of antimicrobial agents*, 29, S120-S120.
- Abd, H., A. Saeed, A. Weintraub, G. B. Nair & G. Sandstrom (2007b) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Fems Microbiology Ecology*, 60, 33-39.
- Abd, H., A. Saeed, A. Weintraub & G. Sandstrom (2009) *Vibrio cholerae* O139 requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 125-131.
- Abd, H., S. P. Valeru, S. M. Sami, A. Saeed, S. Raychaudhuri & G. Sandstrom (2010) Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*. *Environmental microbiology reports*, 2, 166-171.
- Abd, H., B. Wretling, A. Saeed, E. Idsund, K. Hultenby & G. Sandstrom (2008) *Pseudomonas aeruginosa* utilises its type III secretion system to kill the free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55, 235-243.
- Achard, M. E. S., S. L. Stafford, N. J. Bokil, J. Chartres, P. V. Bernhardt, M. A. Schembri, M. J. Sweet & A. G. McEwan (2012) Copper redistribution in murine macrophages in response to *Salmonella* infection. *Biochemical Journal*, 444, 51-57.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel & M. F. Taylor (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52, 399-451.
- Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell & G. H. Gudmundsson (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96, 3086-93.
- Aladaileh, S., S. V. Nair, D. Birch & D. A. Raftos (2007) Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *Journal of invertebrate pathology*, 96, 48-63.
- Alsam, S., J. Sissons, R. Dudley & N. A. Khan (2005) Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitology research*, 96, 402-9.

- Altincicek, B., S Stotzel, M. Wygrecka, K. T. Preissner & A. Vilcinskas (2008) Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. *Journal of immunology*, 181, 2705-12.
- Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, L. Charbonnier, A. Mesnil, P. S. Rainbow & W. X. Wang (2008) Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46, 2010-22.
- Amisshah, N. A., S. Gryseels, N. J. Tobias, B. Ravadgar, M. Suzuki, K. Vandellannoote, L. Durnez, H. Leirs, T. P. Stinear, F. Portaels, A. Ablordey & M. Eddyani (2014) Investigating the role of free-living amoebae as a reservoir for *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e3148.
- Amulic, B. & G. Hayes (2011) Neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB*, 21, R297-8.
- Anacarso, I., E. Guerrieri, M. Bondi, S. de Niederhausern, R. Iseppi, C. Sabia, M. Contri, P. Borella & P. Messi (2010) Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*. *Archives of microbiology*, 192, 877-82.
- Andra, J., R. Herbst & M. Leippe (2003) Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Developmental and comparative immunology*, 27, 291-304.
- Andrault, P. M., S. A. Samsonov, G. Weber, L. Coquet, K. Nazmi, J. G. Bolscher, A. C. Lalmanach, T. Juenne, D. Bromme, M. T. Pisabarro, G. Lalmanach & F. Lecaille (2015) Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L. *Biochemistry*, 54, 2785-98.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciochini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon & J. P. Gorvel (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology*, 6, 618-25.
- Armstrong, P. B. (2006) Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, 211, 263-81.
- Arruda, M. A., A. G. Rossi, M. S. de Freitas, C. Barja-Fidalgo & A. V. Graca-Souza (2004) Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *Journal of immunology*, 173, 2023-30.
- Ashton-Alcox, K. A. & S. E. Ford (1998) Variability in molluscan hemocytes: a flow cytometric study. *Tissue & cell*, 30, 195-204.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith & G. Storz (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6161-5.
- Azad, A. K., M. V. Rajaram & L. S. Schlesinger (2014) Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *Journal of cytology & molecular biology*, 1.

## -B-

- Bachali, S., M. Jager, A. Hassanin, F. Schoentgen, P. Jolles, A. Fiala-Medioni & J. S. Deutsch (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *Journal of molecular evolution*, 54, 652-64.
- Bachere, E., D. Chagot & H. Grizel (1988) Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental and comparative immunology*, 12, 549-59.
- Bachere, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier & B. Romestand (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews*, 198, 149-68.
- Bachere, E., D. Hervio, E. Mialhe & H. Grizel (1990) Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and comparative immunology*, 14, 261-8.
- Bae, H. B., J. W. Zmijewski, J. S. Deshane, J. M. Tadie, D. D. Chaplin, S. Takashima & E. Abraham (2011) AMP-activated protein kinase enhances the phagocytic ability of macrophages and neutrophils. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25, 4358-68.
- Baek, W. K., H. S. Lee, M. H. Oh, M. J. Koh, K. S. Kim & S. H. Choi (2009) Identification of the *Vibrio vulnificus* *ahpC* gene and its influence on survival under oxidative stress and virulence. *Journal of microbiology*, 47, 624-632.
- Baldauf, S. L., A. J. Roger, I. Wenk-Siefert & W. F. Doolittle (2000) A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290, 972-7.
- Bartos, M., J. O. Falkinham & I. Pavlik (2004) Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria - a review. *Veterinarni Medicina*, 49, 161-170.
- Beaven, A. E. & K. T. Paynter (1999) Acidification of the phagosome in *Crassostrea virginica* hemocytes following engulfment of zymosan. *The Biological bulletin*, 196, 26-33.
- Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J. L. Romalde & M. J. Figueras (2010) Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental microbiology reports*, 2, 34-43.
- Beck, G., T. W. Ellis, G. S. Habicht, S. F. Schluter & J. J. Marchalonis (2002) Evolution of the acute phase response: iron release by echinoderm (*Asterias forbesi*) coelomocytes, and cloning of an echinoderm ferritin molecule. *Developmental and comparative immunology*, 26, 11-26.
- Belland, R. J., G. M. Zhong, D. D. Crane, D. Hogan, D. Sturdevant, J. Sharma, W. L. Beatty & H. D. Caldwell (2003) Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8478-8483.
- Bentwood, B. J. & P. M. Henson (1980) The sequential release of granule constituents from human neutrophils. *Journal of immunology*, 124, 855-62.

- Berney, C., S. Romac, F. Mahe, S. Santini, R. Sano & D. Bass (2013) Vampires in the oceans: predatory cercozoan amoebae in marine habitats. *The ISMEjournal*, 7, 2387-99.
- Bertinato, J., E. Swist, L. J. Plouffe, S. P. Brooks & R. L'Abbe M (2008) Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *The Biochemical journal*, 409, 731-40.
- Binet, M. R. & R. K. Poole (2000) Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. *FEBSletters*, 473, 67-70.
- Binker, M. G., L. I. Cosen-Binker, M. R. Terebiznik, G. V. Mallo, S. E. McCaw, E. L. Eskelinen, M. Willenborg, J. H. Brummell, P. Saftig, S. Grinstein & S. D. Gray-Owen (2007) Arrested maturation of *Neisseria*-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2. *Cellular microbiology*, 9, 2153-66.
- Bolivar, I., J. F. Fahrni, A. Smirnov & J. Pawlowski (2001) SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Molecular biology and evolution*, 18, 2306-14.
- Borgstahl, G. E., H. E. Parge, M. J. Hickey, W. F. Beyer, Jr., R. A. Hallewell & J. A. Tainer (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*, 71, 107-18.
- Botella, H., P. Peyron, F. Levillain, R. Poindoux, Y. Poquet, I. Brandli, C. Wang, L. Tailleux, S. Tilleul, G. M. Charriere, S. J. Waddell, M. Foti, G. Lugo-Villarino, Q. Gao, I. Maridonneau-Parini, P. D. Butcher, P. R. Castagnoli, B. Gicquel, C. de Chastellier & O. Neyrolles (2011) Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages. *Cell host & microbe*, 10, 248-59.
- Botella, H., G. Stadthagen, G. Lugo-Villarino, C. de Chastellier & O. Neyrolles (2012) Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends in microbiology*, 20, 106-12.
- Boulais, J., M. Trost, C. R. Landry, R. Dieckmann, E. D. Levy, T. Soldati, S. W. Michnick, P. Thibault & M. Desjardins (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Molecular systems biology*, 6, 423.
- Bouyer, S., C. Imbert, G. Daniault, E. Cateau & M. H. Rodier (2007a) Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of *Acanthamoeba*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59, 122-4.
- Bouyer, S., C. Imbert, M. H. Rodier & Y. Hechard (2007b) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environmental microbiology*, 9, 1341-4.
- Bowers, B. & T. E. Olszewski (1972) Pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. Kinetics and morphology. *The Journal of cell biology*, 53, 681-94.
- Bozzaro, S., S. Buracco & B. Peracino (2013) Iron metabolism and resistance to infection by invasive bacteria in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 50.



- Braun, V. (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 67-79.
- Bretscher, A. J., V. Honti, O. Binggeli, O. Burri, M. Poidevin, E. Kurucz, J. Zsomboki, I. Ando & B. Lemaitre (2015) The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biology open*, 4, 355-63.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch & A. Zychlinsky (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-5.
- Brinkmann, V. & A. Zychlinsky (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology*, 5, 577-82.
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250.
- Brotz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum & H. G. Sahl (1998) Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular microbiology*, 30, 317-327.
- Brown, G. D. & S. Gordon (2005) Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cellular microbiology*, 7, 471-9.
- Bruggemann, H., C. Cazalet & C. Buchrieser (2006) Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current opinion in microbiology*, 9, 86-94.
- Brum, J. R., J. C. Ignacio-Espinoza, S. Roux, G. Doucier, S. G. Acinas, A. Alberti, S. Chaffron, C. Cruaud, C. de Vargas, J. M. Gasol, G. Gorsky, A. C. Gregory, L. Guidi, P. Hingamp, D. Iudicone, F. Not, H. Ogata, S. Pesant, B. T. Poulos, S. M. Schwendk, S. Speich, C. Dimier, S. Kandels-Lewis, M. Ficheral, S. Searson, P. Bork, C. Bowler, S. Sunagawa, P. Wincker, E. Karsenti & M. B. Sullivan (2015) Ocean plankton. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. *Science*, 348, 1261498.
- Buchanan, J. T., A. J. Simpson, R. K. Aziz, G. Y. Liu, S. A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco & V. Nizet (2006) DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB*, 16, 396-400.
- Buczynski, G., B. Grove, A. Nomura, M. Kleve, J. Bush, R. A. Firtel & J. Cardelli (1997) Inactivation of two *Dictyostelium discoideum* genes, DdPIK1 and DdPIK2, encoding proteins related to mammalian phosphatidylinositide 3-kinases, results in defects in endocytosis, lysosome to postlysosome transport, and actin cytoskeleton organization. *Journal of Cell Biology*, 136, 1271-1286.
- Bulet, P., R. Stocklin & L. Menin (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*, 198, 169-184.
- Buracco, S., B. Peracino, R. Onquetti, E. Signoretto, A. Vollero, F. Imperiali, M. Castagna, E. Bossi & S. Bozzaro (2015) *Dictyostelium* Nramp1, structurally and functionally close to mammalian DMT1 transporter, mediates phagosomal iron efflux. *Journal of cell science*.

Burlando, B., V. Evangelisti, F. Dondero, G. Pons, J. Camakaris & A. Viarengo (2002) Occurrence of Cu-ATPase in Dictyostelium: Possible role in resistance to copper. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291, 476-483.

## -G

Calafat, J., H. Janssen, A. Tool, M. A. Dentener, E. F. Knol, H. F. Rosenberg & A. Egesten (1998) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is present in specific granules of human eosinophils. *Blood*, 91, 4770-5.

Canesi, L., G. Gallo, M. Gavioli & C. Pruzzo (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*, 57, 469-76.

Cardelli, J. (2001) Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic*, 2, 311-20.

Caron, E. & A. Hall (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 282, 1717-21.

Cavalier-Smith, T. (2003) Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European journal of protistology*, 39, 338-348.

Cavalier-Smith, T. (2013) Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European journal of protistology*, 49, 115-78.

Cavalier-Smith, T., E. E. Chao & B. Oates (2004) Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *European Journal of Protistology*, 40, 21-48.

Cavalier-Smith, T., A. M. Fiore-Donno, E. Chao, A. Kudryavtsev, C. Berney, E. A. Shell & R. Lewis (2015) Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Molecular phylogenetics and evolution*, 83, 293-304.

Cellier, M. F., P. Courville & C. Campion (2007) Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9, 1662-70.

Changela, A., K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V. O'Halloran & A. Mondragon (2003) Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science*, 301, 1383-7.

Chatenoud, L. & J. F. Bach. 2012. *Immunologie - 6e édition*.

Chatfield, C. H., B. J. Mulhern, V. K. Viswanathan & N. P. Cianciotto (2012) The major facilitator superfamily-type protein LbtC promotes the utilization of the legiobactin siderophore by *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 158, 721-35.

Chekabab, S. M., F. Daigle, S. J. Charette, C. M. Dozois & J. Harel (2013) Shiga toxins decrease enterohaemorrhagic *Escherichia coli* survival within *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS microbiology letters*, 344, 86-93.

- Chen, G. K., O. Zhuchenko & A. Kuspa (2007a) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science*, 317, 678-681.
- Chen, L. M., K. Kaniga & J. E. Galan (1996) *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology*, 21, 1101-15.
- Chen, Z., K. A. Lewis, R. K. Shultzaberger, I. G. Lyakhov, M. Zheng, B. Doan, G. Storz & T. D. Schneider (2007b) Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory models. *Nucleic acids research*, 35, 6762-6777.
- Cheng, T. C. (1996) Hemocytes: Forms and functions. In *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, U.o.M.S., College Park (ed). Maryland.
- Cheng, T. C. I. R. N., Rowley AF, eds. (1981) *Invertebrate Blood Cells*. New York: Academic Press, 233–301.
- Choi, H., S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz & S. E. Ryu (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, 105, 103-13.
- Cianciotto, N. P. (2007) Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 20, 323-31.
- Orlillo, J. D., S. L. Orlillo, L. Yan, L. E. Bermudez, S. Falkow & L. S. Tompkins (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infection and immunity*, 67, 4427-34.
- Orlillo, J. D., S. Falkow & L. S. Tompkins (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and immunity*, 62, 3254-61.
- Orlillo, J. D., S. Falkow, L. S. Tompkins & L. E. Bermudez (1997) Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infection and immunity*, 65, 3759-67.
- Curea-Van Saanen, M. (1981) [Isolation of free amoebas in soil and vegetables; morphologic and pathogenic study of isolated samples]. *Revue medicale de la Suisse romande*, 101, 229-38.
- Clark, C. G. & G. A. Cross (1988) Small-subunit ribosomal RNA sequence from *Naegleria gruberi* supports the polyphyletic origin of amoebas. *Molecular biology and evolution*, 5, 512-8.
- Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green & P. Kubes (2007) Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine*, 13, 463-9.
- Clarke, M., U. Engel, J. Giorgione, A. Muller-Taubenberger, J. Prassler, D. Veltman & G. Gerisch (2010) Curvature recognition and force generation in phagocytosis. *BMCbiology*, 8, 154.

- Clarke, M., A. J. Lohan, B. Liu, I. Lagkouravdos, S. Roy, N. Zafar, C. Bertelli, C. Schilde, A. Kianianmomeni, T. R. Burglin, C. Frech, B. Turcotte, K. O. Kopec, J. M. Synnott, C. Choo, I. Paponov, A. Finkler, C. S. Heng Tan, A. P. Hutchins, T. Weinmeier, T. Rattei, J. S. Chu, G. Gimenez, M. Irimia, D. J. Rigden, D. A. Fitzpatrick, J. Lorenzo-Morales, A. Bateman, C. H. Chiu, P. Tang, P. Hegemann, H. Fromm, D. Raoult, G. Greub, D. Miranda-Saavedra, N. Chen, P. Nash, M. L. Ginger, M. Horn, P. Schaap, L. Caler & B. J. Loftus (2013) Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome biology*, 14, R11.
- Comps, M. & J. L. Duthoit (1979) Infections virales chez les huîtres *Crassostrea angulata* (Lmk) et *C. gigas* (Th.). *Haliotis*, 8, 301-308.
- Cornillon, S., L. Gebbie, M. Benghezal, P. Nair, S. Keller, B. Wehrle-Haller, S. J. Charette, F. Bruckert, F. Letourneur & P. Cosson (2006) An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium amoebae* with integrin beta features. *EMBO reports*, 7, 617-21.
- Cornillon, S., E. Pech, M. Benghezal, K. Ravel, E. Gaynor, F. Letourneur, F. Bruckert & P. Cosson (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in *dictyostelium* adhesion and phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 275, 34287-92.
- Cosson, P. & T. Soldati (2008) Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Current opinion in microbiology*, 11, 271-6.
- Coulon, C., A. Collignon, G. McDonnell & V. Thomas (2010) Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of clinical microbiology*, 48, 2689-97.
- Courville, P., R. Chaloupka & M. F. Cellier (2006) Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 84, 960-78.
- Cox, D., J. S. Berg, M. Cammer, J. O. Chingwundoh, B. M. Dale, R. E. Cheney & S. Greenberg (2002) Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nature cell biology*, 4, 469-77.
- Cox, D., D. J. Lee, B. M. Dale, J. Calafat & S. Greenberg (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 680-5.
- Cox, D., C. C. Tseng, G. Bjekic & S. Greenberg (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *The Journal of biological chemistry*, 274, 1240-7.

## -D-

- Dambuza, I. M. & G. D. Brown (2015) C-type lectins in immunity: recent developments. *Current opinion in immunology*, 32, 21-7.

- Damo, S M., T. E. Kehl-Fie, N. Sugitani, M. E. Holt, S. Rathi, W. J. Murphy, Y. Zhang, C. Betz, L. Hench, G. Fritz, E. P. Skaar & W. J. Chazin (2013) Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 3841-6.
- Daugherty, A., A. E. Suvarnapunya & L. Runyen-Janecky (2012) The role of *oxyR* and *soxRS* in oxidative stress survival in *Shigella flexneri*. *Microbiological research*, 167, 238-45.
- Davet, P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Institut national de la recherche agronomique.
- Davies, B., L. S. Chatters & S. W. Edwards (1991) Superoxide Generation during Phagocytosis by *Acanthamoeba-Castellanii* - Similarities to the Respiratory Burst of Immune Phagocytes. *Journal of General Microbiology*, 137, 705-710.
- Davies, B. W., R. W. Bogard, N. M. Dupes, T. A. I. Gerstenfeld, L. A. Simmons & J. J. Mekalanos (2011) DNA Damage and Reactive Nitrogen Species are Barriers to *Vibrio cholerae* Colonization of the Infant Mouse Intestine. *PLoS Pathogens*, 7.
- Day, R. B. & D. C. Link (2012) Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 69, 1415-23.
- de Chastellier, C., F. Forquet, A. Gordon & L. Thilo (2009) Mycobacterium requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes. *Cellular microbiology*, 11, 1190-207.
- de Lorgeril, J., R. Zenagui, R. D. Rosa, D. Flouquet & E. Bachere (2011) Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PLoS One*, 6, e23142.
- de Souza Santos, M. & K. Orth (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *mBio*, 5, e01506-14.
- de Vargas, C., S. Audic, N. Henry, J. Decelle, F. Mahe, R. Logares, E. Lara, C. Berney, N. Le Bescot, I. Probert, M. Carmichael, J. Poulain, S. Romac, S. Colin, J. M. Aury, L. Bittner, S. Chaffron, M. Dunthorn, S. Engelen, O. Flouquet, L. Guidi, A. Horak, O. Jaillon, G. Lima-Mendez, J. Lukes, S. Malviya, R. Morard, M. Mulot, E. Scalco, R. Sano, F. Vincent, A. Zingone, C. Dimier, M. Picheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, S. G. Acinas, P. Bork, C. Bowler, G. Gorsky, N. Grimsley, P. Hingamp, D. Iudicone, F. Not, H. Ogata, S. Pesant, J. Raes, M. E. Seracki, S. Speich, L. Stemmann, S. Sunagawa, J. Weissenbach, P. Wincker & E. Karsenti (2015) Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348, 1261605.
- DeCoursey, T. E. (2010) Voltage-gated proton channels find their dream job managing the respiratory burst in phagocytes. *Physiology*, 25, 27-40.
- DeFranco, A. L., M. Robertson, R. M. Locksley & R. Quin. 2009. Immunité: la réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires. De Boeck Supérieur.
- Delafont, V., A. Brouke, D. Bouchon, L. Moulin & Y. Hechard (2013) Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water research*, 47, 6958-65.

- Delafont, V., F. Mougari, E. Cambau, M. Jbyeux, D. Bouchon, Y. Hechard & L. Moulin (2014) First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environmental science & technology*, 48, 11872-82.
- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quere, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard & J. F. Samain (2003) Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species--*Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *The Journal of experimental biology*, 206, 3053-64.
- Delorme-Walker, V. D., J. R. Peterson, J. Chernoff, C. M. Waterman, G. Danuser, C. DerMardirossian & G. M. Bokoch (2011) Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. *The Journal of cell biology*, 193, 1289-303.
- Deretic, V., T. Saitoh & S. Akira (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*, 13, 722-37.
- Desjardins, M., M. Houde & E. Gagnon (2005) Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunological reviews*, 207, 158-65.
- Diacovich, L. & J. P. Gorvel (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 117-28.
- Diakonova, M., G. Bokoch & J. A. Swanson (2002) Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Molecular biology of the cell*, 13, 402-11.
- Donaghy, L., E. Kraffe, N. Le Goic, C. Lambert, A. K. Volety & P. Soudant (2012) Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One*, 7, e46594.
- Dorrington, T., L. Villamil & M. Gomez-chiarri (2011) Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish & shellfish immunology*, 30, 94-101.
- Douesnard-Malo, F. & F. Daigle (2011) Increased persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in the presence of *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7640-6.
- Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopoulou, A. Descoteaux, H. Stenmark & M. Desjardins (2000) Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *Journal of cell science*, 113 Pt 19, 3531-41.
- Duits, L. A., B. Ravensbergen, M. Rademaker, P. S. Hiemstra & P. H. Nibbering (2002) Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*, 106, 517-25.
- Duperthuy, M., J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, A. Givaudan, D. Mazel, E. Bachere & D. Destoumieux-Garzon (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental microbiology*, 12, 951-63.

Duperthuy, M., P. Schmitt, E. Garzon, A. Caro, R. D. Rosa, F. Le Roux, N. Lautredou-Audouy, P. Got, B. Romestand, J. de Lorgeril, S. Kieffer-Jaquinod, E. Bachère & D. Destoumieux-Garzón (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2993-8.

Dupuy, A. G. & E. Caron (2008) Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *Journal of cell science*, 121, 1773-83.

## -E-

Eckert, J. K., Y. J. Kim, J. I. Kim, K. Gurtler, D. Y. Oh, S. Sur, L. Lundvall, L. Hamann, A. van der Ploeg, P. Pickkers, E. Giamarellos-Bourboulis, A. V. Kubarenko, A. N. Weber, M. Kabesch, O. Kumpf, H. J. An, J. O. Lee & R. R. Schumann (2013) The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity. *Immunity*, 39, 647-60.

Eichinger, L., S. S. Lee & M. Schleicher (1999) *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microscopy research and technique*, 47, 124-34.

Ellis, R. E., D. M. Jacobson & H. R. Horvitz (1991) Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 129, 79-94.

Erod-Erickson, M., S. Mishra & D. Schneider (2000) Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology*, 10, 781-784.

Erken, M., C. Lutz & D. McDougald (2015) Interactions of *Vibrio* spp. with Zooplankton. *Microbiology spectrum*, 3.

Erken, M., M. Weitere, S. Kjelleberg & D. McDougald (2011) In situ grazing resistance of *Vibrio cholerae* in the marine environment. *Fems Microbiology Ecology*, 76, 504-12.

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

Estes, R. M., C. S. Friedman, R. A. Elston & R. P. Herwig (2004) Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of aquatic organisms*, 58, 223-30.

Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly & A. Warner (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine*, 172, 1785-94.

## -F-

Fahrni, J. F., I. Bolivar, C. Berney, E. Nasonova, A. Smirnov & J. Pawlowski (2003) Phylogeny of lobose amoebae based on actin and small-subunit ribosomal RNA genes. *Molecular biology and evolution*, 20, 1881-6.

- Fang, F. C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews. Microbiology*, 2, 820-32.
- Faurschou, M. & N. Borregaard (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5, 1317-27.
- Flannagan, R. S., G. Cosio & S. Grinstein (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature reviews. Microbiology*, 7, 355-66.
- Flannagan, R. S., V. Jaumouille & S. Grinstein (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology*, 7, 61-98.
- Forbes, J. R. & P. Gros (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends in microbiology*, 9, 397-403.
- Forbes, J. R. & P. Gros (2003) Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood*, 102, 1884-1892.
- Forget, L., J. Ustinova, Z. Wang, V. A. Huss & B. F. Lang (2002) *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Molecular biology and evolution*, 19, 310-9.
- Forsyth, C. B., E. F. Plow & L. Zhang (1998) Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *Journal of immunology*, 161, 6198-205.
- Fouque, E., M. C. Trouilhe, V. Thomas, P. Hartemann, M. H. Rodier & Y. Hechard (2012) Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic cell*, 11, 382-7.
- Fowler, T., E. R. Wann, D. Joh, S. Johansson, T. J. Foster & M. Hook (2000) Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *European journal of cell biology*, 79, 672-9.
- Franc, N. C. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7, d1298-313.
- Franc, N. C., J. L. Dimarco, M. Lagueux, J. Hoffmann & R. A. Ezekowitz (1996) Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, 4, 431-43.
- Franc, N. C., P. Heitzler, R. A. Ezekowitz & K. White (1999) Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science*, 284, 1991-4.
- Francis, M. S. & C. J. Thomas (1997) Mutants in the QpA copper transporting P-type ATPase reduce virulence of *Listeria monocytogenes*. *Microbial Pathogenesis*, 22, 67-78.
- Franke, S., G. Grass, C. Rensing & D. H. Nies (2003) Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 185, 3804-3812.



Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann & A. Zychlinsky (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, 176, 231-41.

Fuller, G. L., J. A. Williams, M. G. Tomlinson, J. A. Eble, S. L. Hanna, S. Pohlmann, K. Suzuki-Inoue, Y. Ozaki, S. P. Watson & A. C. Pearce (2007) The C-type lectin receptors CLEC2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade. *The Journal of biological chemistry*, 282, 12397-409.

## -G-

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

Gabbiani, C., F. Scaletti, L. Massai, E. Michelucci, M. A. Gnelli & L. Messori (2012) Medicinal gold compounds form tight adducts with the copper chaperone Atox-1: biological and pharmacological implications. *Chemical communications*, 48, 11623-5.

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

Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3, 710-20.

Ganz, T. (2004) Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *Comptes rendus biologiques*, 327, 539-49.

Garate, M., Z. Cao, E. Bateman & N. Panjwani (2004) Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of *Acanthamoeba*. *The Journal of biological chemistry*, 279, 29849-56.

Garnier, M., Y. Labreuche, C. Garcia, M. Robert & J. L. Nicolas (2007) Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial ecology*, 53, 187-96.

Garnier, M., Y. Labreuche & J. L. Nicolas (2008) Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and applied microbiology*, 31, 358-65.

Gay, M., F. C. Berthe & F. Le Roux (2004a) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, 59, 49-56.

Gay, M., T. Renault, A. M. Pons & F. Le Roux (2004b) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of aquatic organisms*, 62, 65-74.

Genthner, F. J., A. K. Volety, L. M. Oliver & W. S. Fisher (1999) Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology*, 65, 3015-20.

- German, N., D. Doyscher & C. Rensing (2013) Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiology*, 8, 1257-64.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, G. Desserre, J. de Lorgeril, B. Romestand & E. Bachere (2007a) Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and comparative immunology*, 31, 332-9.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugnieri, F. Roquet, J. M. Escoubas, F. Vandembulcke, O. Levy, L. Saune, P. Bulet & E. Bachere (2007b) Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17759-64.
- Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M. C. Lebart, Y. Gueguen & E. Bachere (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and biophysical research communications*, 338, 1089-97.
- Goswami, T., A. Bhattacharjee, P. Babal, S. Searle, E. Moore, M. Li & J. M. Blackwell (2001) Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochemical Journal*, 354, 511-519.
- Gotthardt, D., V. Blancheteau, A. Bosserhoff, T. Ruppert, M. Delorenzi & T. Soldati (2006) Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 5, 2228-43.
- Gotthardt, D., H. J. Warnatz, O. Henschel, F. Bruckert, M. Schleicher & T. Soldati (2002) High-resolution dissection of phagosome maturation reveals distinct membrane trafficking phases. *Molecular biology of the cell*, 13, 3508-20.
- Gough, P. J. & S. Gordon (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 2, 305-11.
- Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C. G. Pfeifer, S. L. Marcus, S. D. Mills, D. J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B. B. Finlay & P. Gros (1999) Functional expression of Nrap1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infection and immunity*, 67, 2225-32.
- Grass, G., B. Fan, B. P. Rosen, S. Franke, D. H. Nies & C. Rensing (2001) ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183, 4664-7.
- Greaves, D. R. & S. Gordon (2009) The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S282-6.
- Green, T. J., D. Raftos, P. Speck & C. Montagnani (2015) Antiviral immunity in marine molluscs. *The Journal of general virology*, 96, 2471-82.
- Green, T. J., N. Robinson, T. Chataway, K. Benkendorff, W. O'Connor & P. Speck (2014) Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral research*, 110, 168-74.

- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy & B. Dimple (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6181-5.
- Greub, G. & D. Raoult (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*, 17, 413-33.
- Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins & P. Gros (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *The Journal of experimental medicine*, 185, 717-30.
- Gudipaty, S. A., A. S. Larsen, C. Rensing & M. M. McEvoy (2012) Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS. *FEMS microbiology letters*, 330, 30-37.
- Gueguen, Y., R. Bernard, F. Julie, S. Paulina, D. G. Delphine, V. Franck, B. Philippe & B. Evelyne (2009) Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular immunology*, 46, 516-22.
- Gueguen, Y., J. P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A. L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere & J. M. Escoubas (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303, 139-45.
- Gumienny, T. L. & M. O. Hengartner (2001) How the worm removes corpses: the nematode *C. elegans* as a model system to study engulfment. *Cell death and differentiation*, 8, 564-8.
- Gunderson, J. H. & M. L. Sogin (1986) Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists *Acanthamoeba castellanii* and *Euglena gracilis*. *Gene* 44, 63-70.



- Hammer, B. K. & B. L. Bassler (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 50, 101-4.
- Han, J. W., L. Leeper, F. Rivero & C. Y. Chung (2006) Role of RacC for the regulation of WASP and phosphatidylinositol 3-kinase during chemotaxis of *Dictyostelium*. *The Journal of biological chemistry*, 281, 35224-34.
- Hantke, K. (2005) Bacterial zinc uptake and regulators. *Current opinion in microbiology*, 8, 196-202.
- Hao, X., F. L. Luthje, Y. Qin, S. F. McDevitt, N. Lutay, J. L. Hobman, K. Asiani, F. C. Soncini, N. German, S. Zhang, Y. G. Zhu & C. Rensing (2015) Survival in amoeba--a major selection pressure on the presence of bacterial copper and zinc resistance determinants? Identification of a "copper pathogenicity island". *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 5817-24.
- Hardison, S. E. & G. D. Brown (2012) C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature immunology*, 13, 817-22.
- Harris-Young, L., M. L. Tamplin, J. W. Mason, H. C. Aldrich & J. K. Jackson (1995) Viability of *Vibrio vulnificus* in Association with Hemocytes of the American Oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology*, 61, 52-7.

- Harrison, R. E., C. Bucci, O. V. Vieira, T. A. Schroer & S. Grinstein (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Molecular and cellular biology*, 23, 6494-506.
- He, X., Y. Zhang & Z. Yu (2011) An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: molecular characterization and gene expression. *Fish & shellfish immunology*, 30, 870-6.
- Hebrard, M., J. P. M. Viala, S. Meresse, F. Barras & L. Aussel (2009) Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance. *Journal of bacteriology*, 191, 4605-4614.
- Heimberger, A. & A. Eisenstark (1988) Compartmentalization of Catalases in *Escherichia-Coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 154, 392-397.
- Heise, T. & P. Dersch (2006) Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 3375-80.
- Herweg, J. A., N. Hansmeier, A. Otto, A. C. Geffken, P. Subbarayal, B. K. Prusty, D. Becher, M. Hensel, U. E. Schaible, T. Rudel & H. Hilbi (2015) Purification and proteomics of pathogen-modified vacuoles and membranes. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5.
- Hibbetts, K., B. Hines & D. Williams (1999) An overview of proteinase inhibitors. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 13, 302-8.
- Hidvegi, T., M. Ewing, P. Hale, C. Dippold, C. Beckett, C. Kemp, N. Maurice, A. Mukherjee, C. Goldbach, S. Watkins, G. Michalopoulos & D. H. Perlmutter (2010) An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science*, 329, 229-32.
- Higgs, H. N. & T. D. Pollard (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annual review of biochemistry*, 70, 649-76.
- Hilbi, H. & A. Haas (2012) Secretive bacterial pathogens and the secretory pathway. *Traffic*, 13, 1187-97.
- Hine, P. M. (1999) The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*, 9, 367-385.
- Hirsch, J. G. (1958) Bactericidal action of histones. *J. Exp. Med.*, 108, 925-944.
- Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway & R. A. Ezekowitz (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284, 1313-8.
- Hoppe, A. D. & J. A. Swanson (2004) Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Molecular biology of the cell*, 15, 3509-19.
- Houssay, D. & M. Prenant (1970) [Microsurgical technics in the determination of the respective roles of the nucleus and of cytoplasm in the growth and duration of interphase of *Thecamoeba sphaeronucleolus*]. *Experimental cell research*, 61, 347-56.

- Huan, P., G. Liu, H. Wang & B. Liu (2014) Multiple ferritin subunit genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their distinct expression patterns during early development. *Gene*, 546, 80-8.
- Huang, B., L. Zhang, L. Li, X. Tang & G. Zhang (2015) Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 43, 485-90.
- Huang, J., V. Canadien, G. Y. Lam, B. E. Steinberg, M. C. Dinauer, M. A. Magalhaes, M. Glogauer, S. Grinstein & J. H. Brummel (2009) Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6226-31.
- Huvet, A., A. Herpin, L. Degremont, Y. Labreuche, J. F. Samain & C. Cunningham (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211-20.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, C. C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig & S. Grinstein (2007) LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO journal*, 26, 313-24.
- Huynh, K. K. & S. Grinstein (2007) Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 71, 452-62.
- Hybiske, K. & R. S. Stephens (2007) Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11430-5.
- Hybiske, K. & R. S. Stephens (2008) Exit strategies of intracellular pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 6, 99-110.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.

-|-

- Ikeda, J. S., A. Janakiraman, D. G. Kehres, M. E. Maguire & J. M. Sauch (2005) Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar typhimurium by MntR and Fur. *Journal of bacteriology*, 187, 912-922.
- Imlay, J. A. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature reviews. Microbiology*, 11, 443-54.
- Imlay, J. A. & S. Linn (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240, 1302-9.
- Imlay, K. R. & J. A. Imlay (1996) Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 178, 2564-71.
- Isberg, R. R., T. J. O'Connor & M. Heidtman (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 12-24.
- Itoh, N., Y. Okada, K. G. Takahashi & M. Osada (2010) Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 29, 126-35.

- Itoh, N. & K. G. Takahashi (2007) cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 148, 160-6.
- Itoh, N. & K. G. Takahashi (2008) Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 150, 409-17.
- Itoh, N. & K. G. Takahashi (2009) A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular immunology*, 46, 1768-74.
- Itoh, N., Q. G. Xue, K. L. Schey, Y. Li, R. K. Cooper & J. F. La Peyre (2011) Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 158, 9-22.
- Iwanaga, S., S. Kawabata & T. Muta (1998) New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *Journal of biochemistry*, 123, 1-15.



- Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein & P. Gros (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *The Journal of experimental medicine*, 192, 1237-48.
- Jahn, T. L. & E. C. Bovee (1965) Movement and locomotion of microorganisms. *Annual review of microbiology*, 19, 21-58.
- Jankowski, A., P. Zhu & J. G. Marshall (2008) Capture of an activated receptor complex from the surface of live cells by affinity receptor chromatography. *Analytical biochemistry*, 380, 235-48.
- Jeffries, V. E. (1982) Three vibrio strains pathogenic to larvae of *C. gigas* and *O. edulis*. *Aquaculture*, 29, 201-226.
- Jemaa, M., N. Morin, P. Cavellier, J. Cau, J. M. Strub & C. Delsert (2014) Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *The Journal of experimental biology*, 217, 3067-77.
- Johansson, M., N. Rocha, W. Zwart, I. Jordens, L. Janssen, C. Kuijl, V. M. Olkkonen & J. Neefjes (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betaIII spectrin. *The Journal of cell biology*, 176, 459-71.
- Jung, G., K. Remmert, X. Wu, J. M. Volosky & J. A. Hammer, 3rd (2001) The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *The Journal of cell biology*, 153, 1479-97.

- Kambas, K., I. Mitroulis, E. Apostolidou, A. Girod, A. Chrysanthopoulou, I. Pneumatikos, P. Skendros, I. Kourtzelis, M. Koffa, I. Kotsianidis & K. Ritis (2012) Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS one*, 7, e45427.
- Kang, I. H., J. S. Kim & J. K. Lee (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17, 1399-402.
- Kenneth, T. (2009) Bacterial Defense against Phagocytosis. In *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Bacteriology, U.o.W.-M.D.o. (ed).
- Kierszenbaum, A. L., P. Validire-Charpy & P. Validire. 2006. *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- Kim, J. S., M. H. Sung, D. H. Kho & J. K. Lee (2005) Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *Journal of bacteriology*, 187, 5984-95.
- Kim, S., Y. J. Bang, D. Kim, J. G. Lim, M. H. Oh & S. H. Choi (2014) Distinct characteristics of OxyR2, a new OxyR-type regulator, ensuring expression of Peroxiredoxin 2 detoxifying low levels of hydrogen peroxide in *Vibrio vulnificus*. *Molecular microbiology*, 93, 992-1009.
- Kimoto, R., T. Funahashi, N. Yamamoto, S. Miyoshi, S. Narimatsu & S. Yamamoto (2001) Identification and characterization of the *sodA* genes encoding manganese superoxide dismutases in *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio vulnificus*. *Microbiology and Immunology*, 45, 135-142.
- Kinchen, J. M. & K. S. Ravichandran (2010) Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature*, 464, 778-82.
- Klebanoff, S. J. & R. A. Clark. 1978. *The neutrophil: function and clinical disorders*. North-Holland Publishing Company.
- Klomp, A. E., B. B. Tops, I. E. Van Denberg, R. Berger & L. W. Klomp (2002) Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *The Biochemical journal*, 364, 497-505.
- Knodler, L. A. & O. Steele-Mortimer (2003) Taking possession: Biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*, 4, 587-599.
- Knutson, M. D., M. Oukka, L. M. Koss, F. Aydemir & M. Wessling-Resnick (2005) Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1324-8.
- Kocks, C., J. H. Cho, N. Nehme, J. Ulvila, A. M. Pearson, M. Meister, C. Strom, S. L. Conto, C. Hetru, L. M. Stuart, T. Stehle, J. A. Hoffmann, J. M. Reichhart, D. Ferrandon, M. Ramet & R. A. Ezekowitz (2005) Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123, 335-46.

- Kohen, R. & A. Nyska (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30, 620-50.
- Kuchel, R. P., S. Aladaileh, D. Birch, N. Vella & D. A. Raftos (2010) Phagocytosis of the protozoan parasite, *Marteilia sydneyi*, by Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes. *Journal of invertebrate pathology*, 104, 97-104.
- Kudryavtsev, A. & J. Pawlowski (2013) *Squamamoeba japonica* n. g. n. sp. (Amoebozoa): a deep-sea amoeba from the Sea of Japan with a novel cell coat structure. *Protist*, 164, 13-23.
- Kudryavtsev, A. & J. Pawlowski (2015) *Qunea* n. g. (Amoebozoa, Dactylopodida) with two cryptic species isolated from different areas of the ocean. *European journal of protistology*, 51, 197-209.
- Kumar, V., A. K. Abbas, N. Fausto & J. A. Aster. 2007. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition. 1464. Elsevier.
- Kurucz, E., R. Markus, J. Zsomboki, K. Folkl-Medzihradzky, Z. Darula, P. Vilmos, A. Udvardy, I. Krausz, T. Lukacsovich, E. Gateff, C. J. Zettervall, D. Hultmark & I. Ando (2007) Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Current biology : CB*, 17, 649-54.

-L-

- Labreuche, Y., C. Lambert, P. Soudant, V. Boulo, A. Huet & J. L. Nicolas (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., F. Le Roux, J. Henry, C. Zatylny, A. Huet, C. Lambert, P. Soudant, D. Mazel & J. L. Nicolas (2010) *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish & shellfish immunology*, 29, 753-8.
- Labreuche, Y., P. Soudant, M. Goncalves, C. Lambert & J. L. Nicolas (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 and comparative immunology*, 30, 367-379.
- Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Oueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange & S. A. Poulet (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of aquatic organisms*, 46, 139-45.
- Lambert, C., P. Soudant, G. Choquet & C. Paillard (2003) Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & shellfish immunology*, 15, 225-40.
- Lambeth, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology*, 4, 181-9.



- Larsen, E. C., T. Ueyama, P. M. Brannock, Y. Shirai, N. Saito, C. Larsson, D. Loegering, P. B. Weber & M. R. Lennartz (2002) A role for PKC-epsilon in Fc gammaR-mediated phagocytosis by RAW 264.7 cells. *The Journal of cell biology*, 159, 939-44.
- Le Cabec, V., S. Carreno, A. Moisand, C. Bordier & I. Maridonneau-Parini (2002) Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *Journal of immunology*, 169, 2003-9.
- Lee, W. L., M. K. Kim, A. D. Schreiber & S. Grinstein (2005) Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. *Molecular biology of the cell*, 16, 2077-90.
- Lemire, A., D. Goudenege, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche & F. Le Roux (2015) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISMEjournal*, 9, 1523-31.
- Levine, B. & G. Kroemer (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Levy, O., G. Canny, C. N. Serhan & S. P. Colgan (2003) Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochemical Society transactions*, 31, 795-800.
- Lewis, H. D., J. Liddle, J. E. Coote, S. J. Atkinson, M. D. Barker, B. D. Bax, K. L. Bicker, R. P. Bingham, M. Campbell, Y. H. Chen, C. W. Chung, P. D. Craggs, R. P. Davis, D. Eberhard, G. Joberty, K. E. Lind, K. Locke, C. Maller, K. Martinod, C. Patten, O. Polyakova, C. E. Rise, M. Rudiger, R. J. Sheppard, D. J. Slade, P. Thomas, J. Thorpe, G. Yao, G. Drewes, D. D. Wagner, P. R. Thompson, R. K. Prinjha & D. M. Wilson (2015) Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nature chemical biology*, 11, 189-91.
- Li, P., M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong & Y. Wang (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *The Journal of experimental medicine*, 207, 1853-62.
- Li, Y., Y. Qiu, H. Gao, Z. Guo, Y. Han, Y. Song, Z. Du, X. Wang, D. Zhou & R. Yang (2009) Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC microbiology*, 9, 128.
- Lichten, L. A. & R. J. Cousins (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual review of nutrition*, 29, 153-76.
- Lienard, J. & G. Greub (2011) Discovering new pathogens: amoebae as tools to isolate amoeba-resisting microorganisms from environmental samples. *Environmental Microbiology: Current technology and water applications*, 143-162.
- Lima-Mendez, G., K. Faust, N. Henry, J. Decelle, S. Colin, F. Carcillo, S. Chaffron, J. C. Ignacio-Espinosa, S. Roux, F. Vincent, L. Bittner, Y. Darzi, J. Wang, S. Audic, L. Berline, G. Bontempi, A. M. Cabello, L. Coppola, F. M. Cornejo-Castillo, F. d'Ovidio, L. De Meester, I. Ferrera, M. J. Garet-Delmas, L. Guidi, E. Lara, S. Pesant, M. Royo-Llonch, G. Salazar, P. Sanchez, M. Sebastian, C. Souffreau, C. Dimier, M. Ficheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, G. Gorsky, F. Not, H. Ogata, S. Speich, L. Stemmann, J. Weissenbach, P. Wincker, S. G. Acinas, S. Sunagawa, P. Bork, M. B. Sullivan, E. Karsenti, C. Bowler, C. de Vargas & J. Raes (2015) Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*, 348, 1262073.

- Limmon G. V., M. Arredouani, K. L. McCann, R. A. Corn Minor, L. Kobzik & F. Imani (2008) Scavenger receptor class-A is a novel cell surface receptor for double-stranded RNA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22, 159-67.
- Limthammahisorn, S., Y. J. Brady & C. R. Arias (2008) Gene expression of cold shock and other stress-related genes in *Vibrio vulnificus* grown in pure culture under shellstock temperature control conditions. *Journal of food protection*, 71, 157-64.
- Linehan, S. A. & D. W. Holden (2003) The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunology letters*, 85, 183-92.
- Linz, R. & S. Lutsenko (2007) Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39, 403-7.
- Liu, L., J. Yang, L. Qiu, L. Wang, H. Zhang, M. Wang, S. S. Vinu & L. Song (2011) A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding. *Developmental and comparative immunology*, 35, 227-39.
- Liu, P. T. & R. L. Modlin (2008) Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Current opinion in immunology*, 20, 371-6.
- Liu, Q. A. & M. O. Hengartner (1999) Human CED-6 encodes a functional homologue of the *Caenorhabditis elegans* engulfment protein CED-6. *Current biology : CB*, 9, 1347-50.
- Loftin, I. R., S. Franke, S. A. Roberts, A. Weichsel, A. Heroux, W. R. Montfort, C. Rensing & M. M. McEvoy (2005) A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry*, 44, 10533-10540.
- Lorenzo-Morales, J., N. A. Khan & J. Walochnik (2015) An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22, 10.
- Lutsenko, S., A. Gupta, J. L. Burkhead & V. Zuzel (2008) Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 476, 22-32.
- Lyck, R. & G. Enzmann (2015) The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Current opinion in hematology*, 22, 53-9.

## -M-

- Ma, A. T., S. McAuley, S. Pukatzki & J. J. Mekalanos (2009a) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell host & microbe*, 5, 234-43.
- Ma, Z., F. E. Jacobsen & D. P. Gedroc (2009b) Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chemical Reviews*, 109, 4644-4681.
- Machesky, L. M. & A. Hall (1997) Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *The Journal of cell biology*, 138, 913-26.

- Macomber, L. & J. A. Imlay (2009) The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 8344-8349.
- Madejczyk, M. S. & N. Ballatori (2012) The iron transporter ferroportin can also function as a manganese exporter. *Biochimica et biophysica acta*, 1818, 651-7.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, T. W. Kuijpers & D. Roos (2004) Apoptosis of neutrophils. *Acta haematologica*, 111, 56-66.
- Maniak, M. (2001) Fluid-phase uptake and transit in axenic *Dictyostelium* cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1525, 197-204.
- Marakalala, M. J., L. M. Graham & G. D. Brown (2010) The role of Syk/CARD9-coupled C-type lectin receptors in immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clinical & developmental immunology*, 2010, 567571.
- Marciano-Cabral, F. (2004) Introductory remarks: bacterial endosymbionts or pathogens of free-living amoebae. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 51, 497-501.
- Marciano-Cabral, F. & G. Cabral (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16, 273-307.
- Marcos, V., Z. Zhou, A. O. Yildirim, A. Bohla, A. Hector, L. Vitkov, E. M. Wiedenbauer, W. D. Krautgartner, W. Stoiber, B. H. Belohradsky, N. Rieber, M. Kormann, B. Koller, A. Roscher, D. Roos, M. Griese, O. Eckelberg, G. Doring, M. A. Mall & D. Hartl (2010) CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nature medicine*, 16, 1018-23.
- Mary, J. Y. (1985) Normal human granulopoiesis revisited. II. Bone marrow data. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 39, 66-77.
- Master, S. S., B. Springer, P. Sander, E. C. Boettger, V. Deretic & G. S. Timmins (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology-Sgm*, 148, 3139-3144.
- Matsumoto, T., A. M. Nakamura & K. G. Takahashi (2006) Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 145, 325-30.
- Matz, C., D. McDougald, A. M. Moreno, P. Y. Yung, F. H. Yildiz & S. Kjelleberg (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16819-24.
- May, R. C., E. Caron, A. Hall & L. M. Machesky (2000) Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature cell biology*, 2, 246-8.
- Mazur, T., E. Hadas & I. Iwanicka (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit*, 46, 106-8.

- McBride, H. M., V. Rybin, C. Murphy, A. Giner, R. Teasdale & M. Zerial (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell*, 98, 377-86.
- McCarroll, R., G. J. Olsen, Y. D. Stahl, C. R. Woese & M. L. Sogin (1983) Nucleotide sequence of the *Dictyostelium discoideum* small-subunit ribosomal ribonucleic acid inferred from the gene sequence: evolutionary implications. *Biochemistry*, 22, 5858-5868.
- McGreal, E. P., M. Rosas, G. D. Brown, S. Zamze, S. Y. Wong, S. Gordon, L. Martinez-Pomares & P. R. Taylor (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology*, 16, 422-30.
- Mealman, T. D., N. J. Blackburn & M. M. McEvoy (2012) Metal Export by CusCFBA, the Periplasmic Cu(I)/Ag(I) Transport System of *Escherichia coli*. *Metal Transporters*, 69, 163-196.
- Melcher, A. H. & J. Chan (1981) Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. *Journal of ultrastructure research*, 77, 1-36.
- Messier-Solek, C., K. M. Buckley & J. P. Rast (2010) Highly diversified innate receptor systems and new forms of animal immunity. *Seminars in immunology*, 22, 39-47.
- Michalek, M., F. D. Sonnichsen, R. Wechselberger, A. J. Dingley, C. W. Hung, A. Kopp, H. Wienk, M. Smanski, R. Herbst, I. Lorenzen, F. Marciano-Cabral, C. Gelhaus, T. Gutschmann, A. Tholey, J. Grotzinger & M. Leippe (2013) Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic acanthamoeba. *Nature chemical biology*, 9, 37-42.
- Midega, J., J. Blight, F. Lombardo, M. Povelones, F. Kafatos & G. K. Christophides (2013) Discovery and characterization of two Nimrod superfamily members in *Anopheles gambiae*. *Pathogens and global health*, 107, 463-74.
- Miller, B. F., Abrams, R., Dorfman, A. & Klein, M. (1942). Antibacterial properties of protamine and histone. *Science* 96, 428-430.
- Mitroulis, I., K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G. I. Drosos, D. T. Boumpas & K. Ritis (2011) Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 $\beta$  and autophagy-related signaling in gout. *PLoSone*, 6, e29318.
- Mitroulis, I., I. Kourtzelis, K. Kambas, S. Rafail, A. Chrysanthopoulou, M. Speletas & K. Ritis (2010) Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *European journal of immunology*, 40, 1461-72.
- Mitsiadis, T. A., O. Barrandon, A. Rochat, Y. Barrandon & C. De Bari (2007) Stem cell niches in mammals. *Experimental cell research*, 313, 3377-85.
- Mogensen, T. H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22, 240-73, Table of Contents.
- Moliner, C., P. E. Fournier & D. Raoult (2010) Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS microbiology reviews*, 34, 281-94.

- Moller, J., T. Luehmann, H. Hall & V. Vogel (2012) The race to the pole: how high-aspect ratio shape and heterogeneous environments limit phagocytosis of filamentous *Escherichia coli* bacteria by macrophages. *Nano letters*, 12, 2901-5.
- Montagnani, C., J. C. Avarre, J. de Lorgeril, M. Quiquand, V. Boulo & J. M. Escoubas (2007) First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of Pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental and comparative immunology*, 31, 1-11.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe & J. M. Escoubas (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 letters*, 500, 64-70.
- Moran, D. M., O. R. Anderson, M. R. Dennett, D. A. Caron & R. J. Gast (2007) A description of seven Antarctic marine gymnamoebae including a new subspecies, two new species and a new genus: *Neoparamoeba aestuarina antarctica* n. subsp., *Platyamoeba oblongata* n. sp., *Platyamoeba contorta* n. sp. and *Vermistella antarctica* n. gen. n. sp. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 54, 169-83.
- Moreau, P., K. Moreau, A. Segarra, D. Tourbiez, M. A. Travers, D. C. Rubinsztein & T. Renault (2015) Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy*, 11, 516-26.
- Moynault, A., M. F. Luciani & G. Chimini (1998) ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene *ced-7*, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochemical Society transactions*, 26, 629-35.
- Mullins, R. D., J. A. Heuser & T. D. Pollard (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6181-6.
- Murphy, J. E., P. R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam, J. H. Walker & S. Ponnambalam (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, 182, 1-15.
- Murti, C. R. & O. P. Shukla (1984) Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni* - a model *Journal of Biosciences*, 6, 475-489.

-N-

- Nairz, M., D. Ferring-Appel, D. Casarrubea, T. Sonnweber, L. Viatte, A. Schroll, D. Haschka, F. C. Fang, M. W. Hentze, G. Weiss & B. Galy (2015) Iron Regulatory Proteins Mediate Host Resistance to *Salmonella* Infection. *Cell host & microbe*, 18, 254-61.
- Nasser, W., B. Santhanam, E. R. Miranda, A. Parikh, K. Juneja, G. Rot, C. Dinh, R. Chen, B. Zupan, G. Shaulsky & A. Kuspa (2013) Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Current biology : CB*, 23, 862-72.

- Nassonova, E., A. Smirnov, J. Fahrni & J. Pawlowski (2010) Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist*, 161, 102-15.
- Nemerow, G. R. & D. A. Cheresh (2002) Herpesvirus hijacks an integrin. *Nature cell biology*, 4, E69-71.
- Netea, M. G., G. D. Brown, B. J. Kullberg & N. A. Gow (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature reviews. Microbiology*, 6, 67-78.
- Neyrolles, O., E. Mintz & P. Catty (2013) Zinc and copper toxicity in host defense against pathogens: *Mycobacterium tuberculosis* as a model example of an emerging paradigm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
- Ng, T. H., S. H. Chang, M. H. Wu & H. C. Wang (2013) Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Developmental and comparative immunology*, 41, 644-51.
- Ng, T. H., M. H. Wu, S. H. Chang, T. Aoki & H. C. Wang (2015) The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. *Developmental and comparative immunology*, 48, 229-33.
- Ng, V. H., J. S. Cox, A. O. Sousa, J. D. MacMicking & J. D. McKinney (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Molecular microbiology*, 52, 1291-1302.
- Nonaka, T., T. Kuwabara, H. Mimuro, A. Kuwae & S. Imajoh-Ohmi (2003) Shigella-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology*, 149, 2513-27.
- Nourshargh, S. & R. Alon (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41, 694-707.

## -O-

- Olafsen, J. A., T. C. Fletcher & P. T. Grant (1992) Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. *Developmental and comparative immunology*, 16, 123-38.
- Osman, D., K. J. Waldron, H. Denton, C. M. Taylor, A. J. Grant, P. Mastroeni, N. J. Robinson & J. S. Cavet (2010) Copper Homeostasis in *Salmonella* Is Atypical and Copper-CueP Is a Major Periplasmic Metal Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 25259-25268.
- Outten, F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale & T. V. O'Halloran (2001) The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 30670-30677.

## -P-

- Padlan, E. A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology*, 31, 169-217.
- Page, F. C. (1974) A further study of taxonomic criteria for limaxamoebae, with description of new species and a key to genera. *Archiv fur Protistenkunde*, 116, 149-184.

- Page, F. C. (1976) *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae*. Freshwater Biol Assoc, Ambleside, UK
- Page, F. C. 1983. *Marine Gymnamoebae*. Institute of Terrestrial Ecology, Culture Centre of Algae and Protozoa, Cambridge.
- Page, F. C. (1987) The classification of 'naked' amoebae (Phylum Rhizopoda). *Archiv für Protistenkunde*, 133, 199-217.
- Page, F. C. (1988) *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biol Assoc, Ambleside, UK
- Panek, T., J. D. Silberman, N. Yubuki, B. S. Leander & I. Cepicka (2012) Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/microaerophilic heteroloboseans (excavata: discoba). *Protist*, 163, 807-31.
- Papayannopoulos, V., K. D. Metzler, A. Hakim & A. Zychlinsky (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, 191, 677-91.
- Papayannopoulos, V. & A. Zychlinsky (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology*, 30, 513-21.
- Park, C. B., H. S. Kim & S. C. Kim (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 244, 253-7.
- Park, H. & D. Cox (2009) Cdc42 regulates Fc gamma receptor-mediated phagocytosis through the activation and phosphorylation of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and neural-WASP. *Molecular biology of the cell*, 20, 4500-8.
- Park, N. Y., J. H. Lee, M. W. Kim, H. G. Jeong, B. C. Lee, T. S. Kim & S. H. Choi (2006) Identification of the *Vibrio vulnificus* wbpP gene and evaluation of its role in virulence. *Infection and immunity*, 74, 721-8.
- Patrzykat, A., C. L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza & R. E. Hancock (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 605-14.
- Patzer, S. I. & K. Hantke (2001) Dual repression by Fe<sup>2+</sup>-Fur and Mn<sup>2+</sup>-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn<sup>2+</sup> transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183, 4806-4813.
- Pawlowski, J., S. Audic, S. Adl, D. Bass, L. Belbahri, C. Berney, S. S. Bowser, I. Cepicka, J. Decelle, M. Dunthorn, A. M. Fore-Donno, G. H. Gile, M. Holzmann, R. Jahn, M. Jirku, P. J. Keeling, M. Kostka, A. Kudryavtsev, E. Lara, J. Lukes, D. G. Mann, E. A. Mitchell, F. Nitsche, M. Romeralo, G. W. Saunders, A. G. Simpson, A. V. Smirnov, J. L. Spouge, R. F. Stern, T. Stoeck, J. Zimmermann, D. Schindel & C. de Vargas (2012) CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS biology*, 10, e1001419.

- Pearson, A., A. Lux & M. Krieger (1995) Expression Cloning of Dsr-C, a Class-C Macrophage-Specific Scavenger Receptor from *Drosophila-Melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4056-4060.
- Peiser, L., P. J. Gough, T. Kodama & S. Gordon (2000) Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infection and immunity*, 68, 1953-63.
- Peracino, B., J. Borleis, T. Jin, M. Westphal, J. M. Schwartz, L. Wu, E. Bracco, G. Gerisch, P. Devreotes & S. Bozzaro (1998) G protein beta subunit-null mutants are impaired in phagocytosis and chemotaxis due to inappropriate regulation of the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 141, 1529-37.
- Peracino, B., S. Buracco & S. Bozzaro (2013) The Nramp (Sc11) proteins regulate development, resistance to pathogenic bacteria and iron homeostasis in *Dictyostelium discoideum*. *Journal of cell science*, 126, 301-11.
- Petris, M. J., K. Smith, J. Lee & D. J. Thiele (2003) Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *The Journal of biological chemistry*, 278, 9639-46.
- Pfeiffer, A., A. Bottcher, E. Orso, M. Kapinsky, P. Nagy, A. Bodnar, I. Spreitzer, G. Liebisch, W. Drobnik, K. Gempel, M. Horn, S. Holmer, T. Hartung, G. Multhoff, G. Schutz, H. Schindler, A. J. Ulmer, H. Heine, F. Stelter, C. Schutt, G. Rothe, J. Szollosi, S. Damjanovich & G. Schmitz (2001) Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *European journal of immunology*, 31, 3153-64.
- Philips, J. A. (2008) Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cellular microbiology*, 10, 2408-2415.
- Piau, C., J. Jehan, R. Lederocq & C. Daurel (2008) Catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain with point mutations in the *katA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 2060-1.
- Pisanu, S., T. Qubeddu, D. Pagnozzi, S. Rocca, C. Cacciotto, A. Alberti, G. Marogna, S. Uzzau & M. F. Addis (2015) Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis. *Veterinary research*, 46, 59.
- Pomposiello, P. J. & B. Dimple (2001) Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in biotechnology*, 19, 109-14.
- Portier, E., H. Zheng, T. Sahr, D. M. Burnside, C. Mallama, C. Buchrieser, N. P. Cacciotto & Y. Hechard (2015) *IroT/mavN*, a new iron-regulated gene involved in *Legionella pneumophila* virulence against amoebae and macrophages. *Environmental microbiology*, 17, 1338-50.
- Prashar, A., S. Bhatia, D. Gigliozzi, T. Martin, C. Duncan, C. Guyard & M. R. Terebiznik (2013) Filamentous morphology of bacteria delays the timing of phagosome morphogenesis in macrophages. *The Journal of cell biology*, 203, 1081-97.
- Price, L. S., J. Leng, M. A. Schwartz & G. M. Bokoch (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell*, 9, 1863-71.
- Ptáčková, E., A. Kostýlov, L. V. Chistáková, L. Falteisek, A. O. Frolov, D. J. Patterson, G. Walker & I. Cepicka (2013) Evolution of Archamoebae: morphological and molecular evidence for pelobionts including *Rhizomastix*, *Entamoeba*, *Iodamoeba*, and *Endolimax*. *Protist*, 164, 380-410.



Pukatzki, S, R. H. Kessin & J. J. Mekalanos (2002) The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3159-64.

## -Q-

Qureshi, M. N., A. A. Perez, 2nd, R. M. Madayag & E. J. Bottone (1993) Inhibition of *Acanthamoeba* species by *Pseudomonas aeruginosa*: rationale for their selective exclusion in corneal ulcers and contact lens care systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1908-10.

## -R-

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

Reddien, P. W. & H. R. Horvitz (2004) The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, 193-221.

Remijnsen, Q., T. W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandenabeele & T. Vanden Berghe (2011a) Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell death and differentiation*, 18, 581-8.

Remijnsen, Q., T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems & P. Vandenabeele (2011b) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell research*, 21, 290-304.

Rensing, C. & G. Grass (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS microbiology reviews*, 27, 197-213.

Reynolds, L. E., L. Wyder, J. C. Lively, D. Taverna, S. D. Robinson, X. Huang, D. Sheppard, R. O. Hynes & K. M. Hodivala-Dilke (2002) Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nature medicine*, 8, 27-34.

Richards, A. M., J. E. Von Dwingelo, C. T. Price & Y. Abu Kwaik (2013) Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence*, 4, 307-14.

Richards, T. A. & T. Cavalier-Smith (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature*, 436, 1113-8.

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

Rivera, F., G. Roy-Ocotla, I. Rosas, E. Ramirez, P. Bonilla & F. Lares (1987) Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environmental research*, 42, 149-54.

- Rizki, M. T. & R. M. Rizki (1959) Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 5, 235-40.
- Rizki, T. M. & R. M. Rizki (1980) Properties of the Larval Hemocytes of *Drosophila-Melanogaster*. *Experientia*, 36, 1223-1226.
- Robb, C. T., E. A. Dyrinda, R. D. Gray, A. G. Rossi & V. J. Smith (2014) Invertebrate extracellular phagocyte traps show that chromatin is an ancient defence weapon. *Nature communications*, 5, 4627.
- Roberts, S., G. Goetz, S. White & F. Goetz (2009) Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine biotechnology*, 11, 24-44.
- Rodriguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Critical reviews in microbiology*, 20, 225-41.
- Rohrbach, A. S., D. J. Stade, P. R. Thompson & K. A. Mowen (2012) Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in immunology*, 3, 360.
- Romalde, J. L., A. L. Dieguez, A. Lasa & S. Balboa (2014) New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, 4, 413.
- Rosa, R. D., A. Santini, J. Fievet, P. Bulet, D. Destoumieux-Garzón & E. Bachère (2011) Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS one*, 6, e25594.
- Rosenberg, E. & L. Falkovitz (2004) The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annual Review of Microbiology*, 58, 143-159.

## -S-

- Saeed, A., H. Abd, B. Edvinsson & G. Sandstrom (2009) *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. *Archives of Microbiology*, 191, 83-8.
- Saito-Nakano, Y., T. Yasuda, K. Nakada-Tsukui, M. Leippe & T. Nozaki (2004) Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *The Journal of biological chemistry*, 279, 49497-507.
- Samain, J. F. & H. McCombie (2008) Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Quae (ed). *Versailles*, 379.
- Samanovic, M. I., C. Ding, D. J. Thiele & K. H. Darwin (2012) Copper in Microbial Pathogenesis: Meddling with the Metal. *Cell host & microbe*, 11, 106-115.
- Sanchez, J. F., J. Lescar, V. Chazalet, A. Audfray, J. Gagnon, R. Alvarez, C. Breton, A. Imberty & E. P. Mitchell (2006) Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. *The Journal of biological chemistry*, 281, 20171-80.
- Sandstrom, G., A. Saeed & H. Abd (2010) *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. *Experimental Parasitology*, 126, 65-68.

- Sandstrom, G., A. Saeed & H. Abd (2011) Acanthamoeba-Bacteria: A Model to Study Host Interaction with Human Pathogens. *Current Drug Targets*, 12, 936-941.
- Sarrias, M. R., J. Gronlund, O. Padilla, J. Madsen, U. Holmskov & F. Lozano (2004) The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. *Critical reviews in immunology*, 24, 1-37.
- Saulnier, D., S. De Decker & P. Haffner (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, 191-7.
- Saulnier, D., S. De Decker, P. Haffner, L. Cobret, M. Robert & C. Garcia (2010) A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial ecology*, 59, 787-98.
- Schaeffer, A. A. (1926) Do Ciliated Organisms Rotate Counter-Clockwise While Swimming? *Science*, 64, 40.
- Schapiro, J. M., S. J. Libby & F. C. Fang (2003) Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8496-501.
- Schikorski, D., N. Faury, J. F. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez & T. Renault (2011) Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus research*, 155, 28-34.
- SCHMITT, P. 2010. Diversité moléculaire des effecteurs antimicrobiens chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: mise en évidence et rôle dans la réponse antimicrobienne. Thèse de doctorat en Microbiologie, Parasitologie. Montpellier: Université Montpellier 2.
- Schmitt, P., J. de Lorgeril, Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzón & E. Bachère (2012) Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and comparative immunology*, 37, 363-70.
- Schmitt, P., M. Wilmes, M. Pugnieri, A. Aumelas, E. Bachère, H. G. Sahl, T. Schneider & D. Destoumieux-Garzon (2010) Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *The Journal of biological chemistry*, 285, 29208-16.
- Schmitt P., D. M., Montagnani C., Bachère E and Destoumieux-Garzón D. (2011). Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. An overview with focus on summer mortalities. In An overview with focus on summer mortalities. , ed. J. G. Qin. Nova Science Publishers Inc.
- Schroeder, G. N. & H. Hilbi (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clinical microbiology reviews*, 21, 134-56.
- Schulz, F., T. Tjml, I. Fizzetti, I. Dykova, S. Fazi, M. Kostka & M. Horn (2015) Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Scientific reports*, 5, 13381.

- Schwan, W. R., P. Warrener, E. Keunz, C. K. Stover & K. R. Folger (2005) Mutations in the *cueA* gene encoding a copper homeostasis P-type ATPase reduce the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 237-242.
- Schwarz, E. C., E. M. Neuhaus, C. Kistler, A. W. Henkel & T. Soldati (2000) Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis. *Journal of cell science*, 113 ( Pt 4), 621-33.
- Scotti, P. D., S. C. Dearing & D. R. Greenwood (2007a) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 41, 91-101.
- Scotti, P. D., S. C. Dearing & D. R. Greenwood (2007b) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *NZ J Mar Freshwater Res* 41, 91-101.
- Searle, S., N. A. Bright, T. I. Roach, P. G. Atkinson, C. H. Barton, R. H. Melen & J. M. Blackwell (1998) Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *Journal of cell science*, 111 ( Pt 19), 2855-66.
- Seastone, D. J., E. Harris, L. A. Temesvari, J. E. Bear, C. L. Saxe & J. Cardelli (2001) The WASp-like protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium. *Journal of cell science*, 114, 2673-83.
- Seastone, D. J., L. Zhang, G. Buczynski, P. Reibstein, G. Weeks, G. Spiegelman & J. Cardelli (1999) The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in Dictyostelium discoideum. *Molecular biology of the cell*, 10, 393-406.
- Seaver, L. C. & J. A. Imlay (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 183, 7173-7181.
- Segarra, A., L. Baillon, D. Tourbiez, A. Benabdelmouna, N. Faury, N. Bourgougnon & T. Renault (2014) Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary research*, 45, 103.
- Segarra, A., J. F. Pepin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury & T. Renault (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.
- Seo, J. K., M. J. Lee, B. H. Nam & N. G. Park (2013) ogMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 35, 480-8.
- Seo, J. K., J. Stephenson, J. M. Crawford, K. L. Stone & E. J. Noga (2010) American oyster, *Crassostrea virginica*, expresses a potent antibacterial histone H2B protein. *Marine biotechnology*, 12, 543-51.
- Seo, J. K., J. Stephenson & E. J. Noga (2011) Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 158, 223-9.

- Seper, A., A. Hosseinzadeh, G. Gorkiewicz, S. Lichtenegger, S. Roier, D. R. Leitner, M. Rohm, A. Grutsch, J. Reidl, C. F. Urban & S. Schild (2013) *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS pathogens*, 9, e1003614.
- Shanan, S., H. Abd, I. Hedenstrom, A. Saeed & G. Sandstrom (2011) Detection of *Vibrio cholerae* and *Acanthamoeba* species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC research notes*, 4, 109.
- Shi, B., X. Xiang, Y. Ke, L. Zhou & C. Ke (2015) *Abcb1* gene expression pattern and function of copper detoxification in Fujian oyster, *Crassostrea angulata*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 190, 8-15.
- Shyu, Y. C. & F. P. Lin (1999) Cloning and characterization of manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio parahaemolyticus* and application to preliminary identification of *Vibrio* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 48, 345-352.
- Silberman, J. D., C. G. Clark, L. S. Diamond & M. L. Sogin (1999) Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular biology and evolution*, 16, 1740-51.
- Sillo, A., J. Matthias, R. Konertz, S. Bozzaro & L. Eichinger (2011) *Salmonella typhimurium* is pathogenic for *Dictyostelium* cells and subverts the starvation response. *Cellular Microbiology*, 13, 1793-811.
- Smeone, R., A. Bobard, J. Lippmann, W. Bitter, L. Majlessi, R. Brosch & J. Enninga (2012) Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS pathogens*, 8, e1002507.
- Singh, B. N. (1951) Nuclear division in amoebae and its bearing on classification. *Nature*, 167, 582-4.
- Sinha, B., P. P. Francois, O. Nusse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann & K. H. Krause (1999) Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin  $\alpha 5\beta 1$ . *Cellular Microbiology*, 1, 101-17.
- Sminia, T. & W. P. van der Knaap (1987) Cells and molecules in molluscan immunology. *Developmental and comparative immunology*, 11, 17-28.
- Smirnov, A., E. Nasonova, C. Berney, J. Fahrni, I. Bolivar & J. Pawlowski (2005) Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist*, 156, 129-42.
- Smirnov, A. V., E. Chao, E. S. Nasonova & T. Cavalier-Smith (2011) A revised classification of naked lobose amoebae (*Amoebozoa: lobosa*). *Protist*, 162, 545-70.
- Smirnov, A. V. & A. V. Goodkov (1999) An illustrated list of basic morphotypes of *Gymnamoebia* (*Rhizopoda, Lobosea*). *Protistology*, 1, 20-29.
- Smirnov, A. V. & R. Michel (1999) New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (*Lobosea, Gymnamoebia*). *Protistology*, 1, 82-85.
- Smirnov, A. V., E. S. Nasonova, E. Chao & T. Cavalier-Smith (2007) Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist*, 158, 295-324.

- Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert & R. P. Fagan (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters*, 273, 1-11.
- Smith, V. J. & E. A. Dyrzynda (2015) Antimicrobial proteins: From old proteins, new tricks. *Molecular immunology*.
- Smits, E., W. Van Orliekinge, G. Plaetinck & T. Bogaert (1999) The human homologue of *Caenorhabditis elegans* CED-6 specifically promotes phagocytosis of apoptotic cells. *Current biology* : CB, 9, 1351-4.
- Soldati, T. & O. Neyrolles (2012) Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic*, 13, 1042-1052.
- Sorensen, O., K. Arnljots, J. B. Cowland, D. F. Bainton & N. Borregaard (1997) The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, 90, 2796-803.
- Sow, F. B., W. C. Florence, A. R. Satoskar, L. S. Schlesinger, B. S. Zwillig & W. P. Lafuse (2007) Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of leukocyte biology*, 82, 934-45.
- Srinivasan, S., R. M. Beema Shafreen, P. Nithyanand, P. Manisankar & S. K. Pandian (2010) Synthesis and in vitro antimicrobial evaluation of novel fluoroquinolone derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 45, 6101-5.
- Stafford, S. L., N. J. Bokil, M. E. Achard, R. Kapetanovic, M. A. Schembri, A. G. McEwan & M. J. Sweet (2013) Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Bioscience reports*, 33.
- Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, 513-25.
- Stuart, L. M. & R. A. Ezekowitz (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22, 539-50.
- Stuart, L. M. & R. A. Ezekowitz (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nature reviews. Immunology*, 8, 131-41.
- Suhnel, S., S. Ivachuk Cda, A. L. Schaefer, V. A. Pontinha, M. L. Martins, A. Figueras, G. R. Meyer, S. R. Jones, J. C. Stewart, H. J. Gurney-Smith, A. R. Magalhaes & S. M. Bower (2014) Detection of a parasitic amoeba (Order Dactylopodida) in the female gonads of oysters in Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, 109, 241-50.
- Sun-Wada, G. H., H. Tabata, N. Kawamura, M. Aoyama & Y. Wada (2009) Direct recruitment of H<sup>+</sup>-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *Journal of cell science*, 122, 2504-13.
- Sun, S., S. Kjelleberg & D. McDougald (2013) Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists. *PLoS one*, 8, e56338.

Sunagawa, S., L. P. Coelho, S. Chaffron, J. R. Kultima, K. Labadie, G. Salazar, B. Djahanschiri, G. Zeller, D. R. Mende, A. Alberti, F. M. Cornejo-Castillo, P. I. Costea, C. Cruaud, F. d'Ovidio, S. Engelen, I. Ferrera, J. M. Gasol, L. Guidi, F. Hildebrand, F. Kokoszka, C. Lepoivre, G. Lima-Mendez, J. Poulain, B. T. Poulos, M. Royo-Llonch, H. Sarmiento, S. Vieira-Silva, C. Dimier, M. Ficheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, C. Bowler, C. de Vargas, G. Gorsky, N. Grimsley, P. Hingamp, D. Iudicone, O. Jaillon, F. Not, H. Ogata, S. Pesant, S. Speich, L. Stemmann, M. B. Sullivan, J. Weissenbach, P. Wincker, E. Karsenti, J. Raes, S. G. Acinas & P. Bork (2015) Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348, 1261359.

Swanson, J. A. & A. D. Hoppe (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Journal of leukocyte biology*, 76, 1093-103.

## -T-

Tainer, J. A., E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson & D. C. Richardson (1982) Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of molecular biology*, 160, 181-217.

Tak, T., K. Tesselaar, J. Pillay, J. A. Borghans & L. Koenderman (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of leukocyte biology*, 94, 595-601.

Tan, S. Y. & M. K. Dee (2009) Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore medical journal*, 50, 456-7.

Tanguy, A., X. Guo & S. E. Ford (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene*, 338, 121-31.

Tanguy, A. & D. Moraga (2001) Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene*, 273, 123-30.

Tanguy, A., C. Mura & D. Moraga (2001) Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquatic toxicology*, 55, 35-47.

Tateno, H. (2010) SJEL-related lectins, a lectin family widely distributed throughout organisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74, 1141-4.

Taylor, M. E., J. T. Conary, M. R. Lennartz, P. D. Stahl & K. Drickamer (1990) Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *The Journal of biological chemistry*, 265, 12156-62.

Taylor, S. J., L. J. Ahonen, F. A. de Leij & J. W. Dale (2003) Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Applied and environmental microbiology*, 69, 4316-9.

Tepass, U., L. I. Fessler, A. Aziz & V. Hartenstein (1994) Embryonic Origin of Hemocytes and Their Relationship to Cell-Death in *Drosophila*. *Development*, 120, 1829-1837.

- Terahara, K., K. G. Takahashi, A. Nakamura, M. Osada, M. Yoda, T. Hiroi, M. Hirasawa & K. Mori (2006) Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "*Crassostrea gigas*". *Developmental and comparative immunology*, 30, 667-83.
- Thomas, C. A., Y. Li, T. Kodama, H. Suzuki, S. C. Silverstein & J. E. Khoury (2000) Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *The Journal of experimental medicine*, 191, 147-56.
- Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret & Y. Levi (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of applied microbiology*, 97, 950-63.
- Thomas, V., G. McDonnell, S. P. Denyer & J. Y. Maillard (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS microbiology reviews*, 34, 231-59.
- Thurlow, L. R., M. L. Hanke, T. Fritz, A. Angle, A. Aldrich, S. H. Williams, I. L. Engebretsen, K. W. Bayles, A. R. Horswill & T. Kielian (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *Journal of immunology*, 186, 6585-96.
- Tissieres, P. & J. Pugin (2009) The role of MD-2 in the opsonophagocytosis of Gram-negative bacteria. *Current opinion in infectious diseases*, 22, 286-91.
- Titus, M. A. (1999) A class VII unconventional myosin is required for phagocytosis. *Current biology : CB*, 9, 1297-303.
- Tomlinson, G. & E. A. Jones (1962) Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochimica et biophysica acta*, 63, 194-200.
- Tran Van Nhieu, G. & R. R. Isberg (1993) Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *The EMBO journal*, 12, 1887-95.
- Travers, M. A., R. Mersni Achour, P. Haffner, D. Tourbiez, 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*, 123, 38-48.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley & E. Leifson (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *Journal of bacteriology*, 90, 1036-44.
- Tubiash, H. S., R. R. Colwell & R. Sakazaki (1970) Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *Journal of bacteriology*, 103, 271-2.

-U-

- Urwyler, S., Y. Nyfeler, C. Ragaz, H. Lee, L. N. Mueller, R. Aebersold & H. Hilbi (2009) Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic*, 10, 76-87.



-V-

- Valeru, S P., S Shanan, H. Alossimi, A. Sæed, G. Sandstrom & H. Abd (2014) Lack of Outer Membrane Protein A Enhances the Release of Outer Membrane Vesicles and Survival of *Vibrio cholerae* and Suppresses Viability of *Acanthamoeba castellanii*. *International journal of microbiology*, 2014, 610190.
- Van der Henst, C., T. Scrinari, C. Madachlan & M. Blokesch (2015) An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *The ISME journal*.
- van der Straaten, T., A. van Diepen, K. Kwappenberg, S. van Voorden, K. Franken, R. Janssen, J. G. Kusters, D. L. Granger & J. T. van Dissel (2001) Novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infection and immunity*, 69, 7413-8.
- van Holde, K. E. & K. I. Miller (1995) Hemocyanins. *Advances in protein chemistry*, 47, 1-81.
- van Holde, K. E., K. I. Miller & H. Decker (2001) Hemocyanins and invertebrate evolution. *The Journal of biological chemistry*, 276, 15563-6.
- Van Valen, L. (1973) A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1, 1-30.
- Vanhove, A. S., M. Duperthuy, G. M. Charriere, F. Le Roux, D. Goudenege, B. Gourbal, S. Kieffer-Jaquinod, Y. Coute, S. N. Wai & D. Destoumieux-Garzon (2015a) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental microbiology*, 17, 1152-65.
- Vanhove, A. S., T. Rubio, A. N. Nguyen, A. Lemire, D. Roche, J. Nicod, A. Vergnes, A. C. Poirier, E. Disconzi, E. Bachere, F. Le Roux, A. Jacq, G. M. Charriere & D. Destoumieux-Garzon (2015b) Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environmental microbiology*.
- Verma, K., Y. Saito-Nakano, T. Nozaki & S. Datta (2015) Insights into endosomal maturation of human holo-transferrin in the enteric parasite *Entamoeba histolytica*: essential roles of Rab7A and Rab5 in biogenesis of giant early endocytic vacuoles. *Cellular microbiology*.
- Vertuani, S., A. Angusti & S. Manfredini (2004) The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10, 1677-94.
- Vezzulli, L., E. Pezzati, M. Stauder, L. Stagnaro, P. Venier & C. Pruzzo (2015) Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environmental microbiology*, 17, 1065-80.
- Vidal-Dupiol, J., O. Ladriere, A. L. Meistertzheim, L. Foure, M. Adjeroud & G. Mitta (2011) Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. *Journal of Experimental Biology*, 214, 1533-1545.
- Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley & S. Grinstein (2001) Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *The Journal of cell biology*, 155, 19-25.

Vieira, O. V., R. E. Harrison, C. C. Scott, H. Stenmark, D. Alexander, J. Liu, J. Gruenberg, A. D. Schreiber & S. Grinstein (2004) Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria. *Molecular and cellular biology*, 24, 4593-604.

Villar, E., G. K. Farrant, M. Follows, L. Garczarek, S. Speich, S. Audic, L. Bittner, B. Blanke, J. R. Brum, C. Brunet, R. Casotti, A. Chase, J. R. Dolan, F. d'Ortenzio, J. P. Gattuso, N. Grima, L. Guidi, C. N. Hill, O. Jahn, J. L. Jamet, H. Le Goff, C. Lepoivre, S. Malviya, E. Pelletier, J. B. Romagnan, S. Roux, S. Santini, E. Scalco, S. M. Schwenck, A. Tanaka, P. Testor, T. Vannier, F. Vincent, A. Zingone, C. Dimier, M. Ficheral, S. Searson, S. Kandels-Lewis, S. G. Acinas, P. Bork, E. Boss, C. de Vargas, G. Gorsky, H. Ogata, S. Pesant, M. B. Sullivan, S. Sunagawa, P. Wincker, E. Karsenti, C. Bowler, F. Not, P. Hingamp & D. Iudicone (2015) Ocean plankton. Environmental characteristics of Agulhas rings affect interocean plankton transport. *Science*, 348, 1261447.

Virji, M. (1996) Microbial utilization of human signalling molecules. *Microbiology*, 142 ( Pt 12), 3319-36.

Vogel, G., L. Thilo, H. Schwarz & R. Steinhart (1980) Mechanism of Phagocytosis in *Dictyostelium-Discoideum* - Phagocytosis Is Mediated by Different Recognition Sites as Disclosed by Mutants with Altered Phagocytotic Properties. *Journal of Cell Biology*, 86, 456-465.

## -W-

Waechter, M., F. Le Roux, J. L. Nicolas, E. Marissal & F. Berthe (2002) [Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*]. *Comptes rendus biologies*, 325, 231-8.

Wagner, D., J. Maser, B. Lai, Z. Cai, C. E. Barry, 3rd, K. Honer Zu Bentrup, D. G. Russell & L. E. Bermudez (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *Journal of immunology*, 174, 1491-500.

Wang, D. & C. A. Fierke (2013) The *BaeSR* regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomics : integrated biometal science*, 5, 372-83.

Wang, D., O. Hosteen & C. A. Fierke (2012a) *ZntR*-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *Journal of inorganic biochemistry*, 111, 173-81.

Wang, H., S. Chen, J. Zhang, F. P. Rothenbacher, T. Jang, B. Kan, Z. Zhong & J. Zhu (2012b) Catalases promote resistance of oxidative stress in *Vibrio cholerae*. *PLoSone*, 7, e53383.

Wang, H. W., C. H. Chung, T. Y. Ma & H. C. Wong (2013a) Roles of Alkyl Hydroperoxide Reductase Subunit C (AhpC) in Viable but Nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and environmental microbiology*, 79, 3734-3743.

Wang, L., L. Qiu, Z. Zhou & L. Song (2013b) Research progress on the mollusc immunity in China. *Developmental and comparative immunology*, 39, 2-10.

- Wang, W., R. Liu, T. Zhang, R. Zhang, X. Song, L. Wang & L. Song (2015) A novel phagocytic receptor (CgNimC) from Pacific oyster *Crassostrea gigas* with lipopolysaccharide and gram-negative bacteria binding activity. *Fish & shellfish immunology*, 43, 103-110.
- Wang, X. C., L. Guo, L. F. Shangguan, C. Wang, G. Yang, S. C. Qu & J. G. Fang (2012c) Analysis of expressed sequence tags from grapevine flower and fruit and development of simple sequence repeat markers. *Molecular biology reports*, 39, 6825-34.
- Wang, Y., M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, R. Hayama, L. Leonelli, H. Han, S. A. Grigoryev, C. D. Allis & S. A. Coonrod (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of cell biology*, 184, 205-13.
- Warner, D. M. & S. B. Levy (2012) SoxS increases the expression of the zinc uptake system *ZnuABC* in an *Escherichia coli* murine pyelonephritis model. *Journal of bacteriology*, 194, 1177-85.
- Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark & B. Henriques-Normark (2007) Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. *Cellular Microbiology*, 9, 1162-71.
- Waters, C. M., W. Lu, J. D. Rabinowitz & B. L. Bassler (2008) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *Journal of bacteriology*, 190, 2527-36.
- Weiss, J. & I. Olsson (1987) Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood*, 69, 652-9.
- Whitworth, T., V. L. Popov, X. J. Yu, D. H. Walker & D. H. Bouyer (2005) Expression of the *Rickettsia prowazekii* *pld* or *tlyC* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediates phagosomal escape. *Infection and immunity*, 73, 6668-73.
- Wildschutte, H. & J. G. Lawrence (2007) Differential *Salmonella* survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology*, 153, 1781-9.
- Wilmes, M., B. P. Cammue, H. G. Sahl & K. Thevissen (2011) Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Natural product reports*, 28, 1350-8.
- Wink, D. A., J. A. Cook, R. Pacelli, J. Liebmann, M. C. Krishna & J. B. Mitchell (1995) Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicology letters*, 82-83, 221-6.
- Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, 4, 278-86.
- Wolschendorf, F., D. Ackart, T. B. Shrestha, L. Hascall-Dove, S. Nolan, G. Lamichhane, Y. Wang, S. H. Bossmann, R. J. Basaraba & M. Niederweis (2011) Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1621-6.
- Wong, K. W. & R. R. Isberg (2005) Emerging views on integrin signaling via *Rac1* during invasion-promoted bacterial uptake. *Current opinion in microbiology*, 8, 4-9.

Wu, Y. C. & H. R. Horvitz (1998) *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature*, 392, 501-504.

-X-

Xue, Q., M. E. Hellberg, K. L. Schey, N. Itoh, R. I. Eytan, R. K. Cooper & J. F. La Peyre (2010) A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evolutionary biology*, 10, 213.

-Y-

Yamaura, K., K. G. Takahashi & T. Suzuki (2008) Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 149, 168-75.

Yang, B., F. Pu, J. Qin, W. You & C. Ke (2014) Characterization of receptor of activated C kinase 1 (RACK1) and functional analysis during larval metamorphosis of the oyster *Crassostrea angulata*. *Gene*, 537, 294-301.

Yipp, B. G., B. Petri, D. Salina, C. N. Jenne, B. N. Scott, L. D. Zbytniuk, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H. C. Meijndert, S. E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly & P. Kubersky (2012) Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine*, 18, 1386-93.

Yonekawa, A., S. Saijo, Y. Hoshino, Y. Miyake, E. Ishikawa, M. Suzukawa, H. Inoue, M. Tanaka, M. Yoneyama, M. Oh-Hora, K. Akashi & S. Yamasaki (2014) Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*, 41, 402-13.

-Z-

Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P. W. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Looso, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, Q. Wang, C. E. Steinberg, H. Wang, L. Qian, X. Liu & Y. Yin (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49-54.

Zhang, L., L. Li, X. Guo, G. W. Litman, L. J. Dishaw & G. Zhang (2015) Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific reports*, 5, 8693.

- Zhang, Y., X. He, X. Li, D. Fu, J. Chen & Z. Yu (2011) The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 30, 954-63.
- Zhang, Y., X. He, F. Yu, Z. Xiang, J. Li, K. L. Thorpe & Z. Yu (2013) Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoSone*, 8, e76464.
- Zhou, L., H. Hashimi, L. M. Schwartz & J. R. Nambu (1995) Programmed Cell-Death in the *Drosophila* Central-Nervous-System Midline. *Current Biology*, 5, 784-790.
- Zhou, Z., E. Caron, E. Hartweig, A. Hall & H. R. Horvitz (2001) The *C.elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway. *Developmental Cell*, 1, 477-489.

# ANNEXES

Annexe I : Copper homeostasis at the  
host vibrio interface: lessons from  
intracellular vibrio transcriptomics

# Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics

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

<sup>1</sup>Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements (IHPE), UMR 5244, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, Université de Montpellier, Montpellier 34095, France.

<sup>2</sup>Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay Cedex 91405, France.

<sup>3</sup>Unité Physiologie Fonctionnelle des Organismes Marins, Ifremer, ZI de la Pointe du Diable, CS 10070, Plouzané 29280, France.

<sup>4</sup>UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, Integrative Biology of Marine Models, Station Biologique de Roscoff, Sorbonne Université, CS 90074, Roscoff cedex 29688, France.

<sup>5</sup>Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), Institut de Génomique (IG), Génoscope, Evry cedex 91057, France.

<sup>6</sup>CNRS, UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatiques en Génomique et Métabolisme (LABGeM), Evry cedex 91057, France.

## Summary

Recent studies revealed that several vibrio species have evolved the capacity to survive inside host cells. However, it is still often ignored if intracellular stages are required for pathogenicity. Virulence of *Vibrio tasmaniensis* LGP32, a strain pathogenic for *Crassostrea gigas* oysters, depends on entry into hemocytes, the oyster immune cells. We investigated here the mechanisms of LGP32 intracellular survival and their consequences on the host–pathogen inter-

action. Entry and survival inside hemocytes were required for LGP32-driven cytolysis of hemocytes, both in vivo and in vitro. LGP32 intracellular stages showed a profound boost in metabolic activity and a major transcription of antioxidant and copper detoxification genes, as revealed by RNA sequencing. LGP32 isogenic mutants showed that resistance to oxidative stress and copper efflux are two main functions required for vibrio intracellular stages and cytotoxicity to hemocytes. Copper efflux was also essential for host colonization and virulence in vivo. Altogether, our results identify copper resistance as a major mechanism to resist killing by phagocytes, induce cytolysis of immune cells and colonize oysters. Selection of such resistance traits could arise from vibrio interactions with copper-rich environmental niches including marine invertebrates, which favour the emergence of pathogenic vibrios resistant to intraphagosomal killing across animal species.

## Introduction

Vibrios have long been considered extracellular organisms. However, an increasing number of studies show that some vibrio strains have evolved cell invasive properties. The capacity to survive in host cells was reported for vibrio strains pathogenic for humans. Examples include *Vibrio cholerae*, which survives in mouse cell lines (Duperthuy et al., 2010), and *V. parahaemolyticus*, which disrupts the intestinal epithelium (Ritchie et al., 2012) and can also invade and replicate in human HeLa cell line (Zhang et al., 2012; de Souza Santos and Orth, 2014). Interestingly, in a few animal species, such vibrio intracellular stages have been associated with diseases. For example, the coral pathogens *V. shiloi* (Rosenberg and Falkovitz, 2004) and *V. coralliilyticus* (Vidal-Dupiol et al., 2011) enter coral epithelial cells as part of their pathogenic process. Similarly, the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 enters oyster immune cells, the hemocytes, and this is required for virulence in oysters (Duperthuy et al., 2011).

Survival in professional phagocytes requires evading or resisting the phagosome hostile environment. Multiple stresses are used by professional phagocytes to kill phagocytosed microorganisms (Flannagan et al., 2009).

Received 4 August, 2015; revised 24 September, 2015; accepted 27 September, 2015. \*For correspondence. E-mail: ddestoum@ifremer.fr; Tel. +33 467 14 46 25; Fax: +33 468 66 22 81. †Audrey S. Vanhove and Tristan P. Rubio contributed equally in this study. ‡Guillaume M. Charrière and Delphine Destoumieux-Garzón contributed equally in this study.



The NADPH oxidase produces potent reactive oxygen species (ROS) which are delivered into the phagolysosome during its maturation together with a series of hydrolytic enzymes and antimicrobial peptides. Moreover, an acidic environment is created by accumulating protons in the lumen of the phagosome. This environment is both aggressive to the phagocytosed bacteria and optimal for the activity of the hydrolytic enzymes. Such microbicidal mechanisms are broadly conserved throughout evolution (Boulais et al., 2010) and they have been well described in oyster hemocytes (Bachere et al., 2015).

While vibrio intracellular stages have been associated with the expression of key virulence factors (Ma et al., 2009; Zhang et al., 2012), it is still often unknown whether those stages play an essential role in pathological processes induced by vibrios. In the *V. tasmaniensis* LGP32/oyster interaction, where vibrios behave as facultative intravacuolar pathogens (Vanhove et al., 2015), a tight correlation has been found between entry into host immune cells and virulence in experimental infections (Duperthuy et al., 2010; 2011). We indeed previously showed (i) that the major outer membrane protein OmpU of LGP32 was required for efficient plasma opsonization,  $\beta$ -integrin recognition and subsequent entry into oyster hemocytes (Duperthuy et al., 2011) and (ii) that ompU-deletion mutants were strongly attenuated in terms of virulence (Duperthuy et al., 2010). We also observed important cell damages in hemocytes heavily loaded with LGP32 (Vanhove et al., 2015), suggesting that phagocytosed LGP32 could be cytotoxic to oyster hemocytes. Supporting this hypothesis, some virulence factors were shown to be secreted by outer membrane vesicles released by LGP32 inside the phagosome (Vanhove et al., 2015). To the best of our knowledge, it is so far the only model in which invasion of professional phagocytes by vibrios has been so clearly associated with disease expression *in vivo*. Therefore, this model offers a great opportunity to decipher the causal relationships between intracellular stages and virulence in vibrios and decipher the molecular bases of vibrio survival in the hostile environment of the phagosome.

Here, we took advantage of this model to characterize vibrio intracellular stages and identify key functions required for vibrio intracellular survival in immune cells. LGP32 cytotoxicity was found to depend upon entry and survival in oyster hemocytes. By comparative transcriptomics, we identified antioxidant responses and copper efflux as functions highly induced intracellularly. Their key role in intracellular survival and cytotoxicity to host immune cells was demonstrated genetically. Altogether, our results identify copper homeostasis as a key player in the vibrio/phagocyte interaction and copper efflux as a major vibrio adaptive trait for oyster tissue

colonization and virulence in oyster experimental infections.

## Results

Phagocytosis and intracellular survival of LGP32 are required to induce cytolysis

Characterization of the *V. tasmaniensis* strain LGP32/hemocyte interactions at the cellular level was performed by infecting primary cultures of oyster hemocytes maintained in sterile sea water (SSW) with GFP-expressing strains opsonized in oyster plasma. Plasma-opsonized LGP32 grew significantly in hemocyte co-cultures ( $P < 0.001$ ), unlike the phylogenetically related LMG 20012<sup>T</sup> (Thompson et al., 2003), an avirulent control strain used in our previous study (Duperthuy et al., 2011; Fig. 1A). However, plasma-opsonized LGP32 was unable to grow in SSW in the absence of hemocytes (Fig. 1A), which showed that hemocytes are required to support the growth of LGP32 in such a nutrient-poor environment. The hemocyte/vibrio interaction was then monitored over the first 5 h of contact by epifluorescence microscopy. After a 1 h contact, oyster hemocytes were already heavily loaded with either LGP32 or LMG 20012<sup>T</sup>. After 3 h, most LGP32 were intravacuolar but some bacteria-containing hemocytes harbouring cellular alterations had lost adherence: they were found in the culture supernatant together with some extracellular vibrios. After 5 h, no more LGP32-containing hemocytes were adherent; several hemocytes were present in the supernatant and most of the LGP32 were extracellular (Figs 1B, Supporting Information Fig. S1). On the contrary, LMG 20012<sup>T</sup> remained within hemocytes over the course of the experiment without any sign of hemocyte alteration. Therefore, LGP32 entry into hemocytes triggers a loss of hemocyte integrity leading to the release of LGP32 through cytolysis ~5 h after phagocytosis.

To quantify the LGP32-induced cytolysis of hemocytes, we used the cell impermeant Sytox green DNA dye. In agreement with our microscopy data (Fig. 1B), 5 to 7 h after LGP32 phagocytosis, hemocyte monolayers generated a massive Sytox green fluorescent signal as opposed to LMG 20012<sup>T</sup> ( $P < 0.001$ ; Fig. 1C). Thus, alteration of hemocyte membrane integrity is observed after LGP32 phagocytosis. Remarkably, cytochalasin D, an inhibitor of F-actin polymerization that prevents phagocytosis, abolished LGP32-induced hemocyte cytolysis (Fig. 1C). We concluded that cytotoxicity of LGP32 towards oyster hemocytes is strictly dependent on phagocytosis. Altogether, those results show that intracellular LGP32 resists to the hemocyte killing machinery, and within few hours becomes cytotoxic, thereby promoting a hemocyte cytolysis that could sustain its own growth.

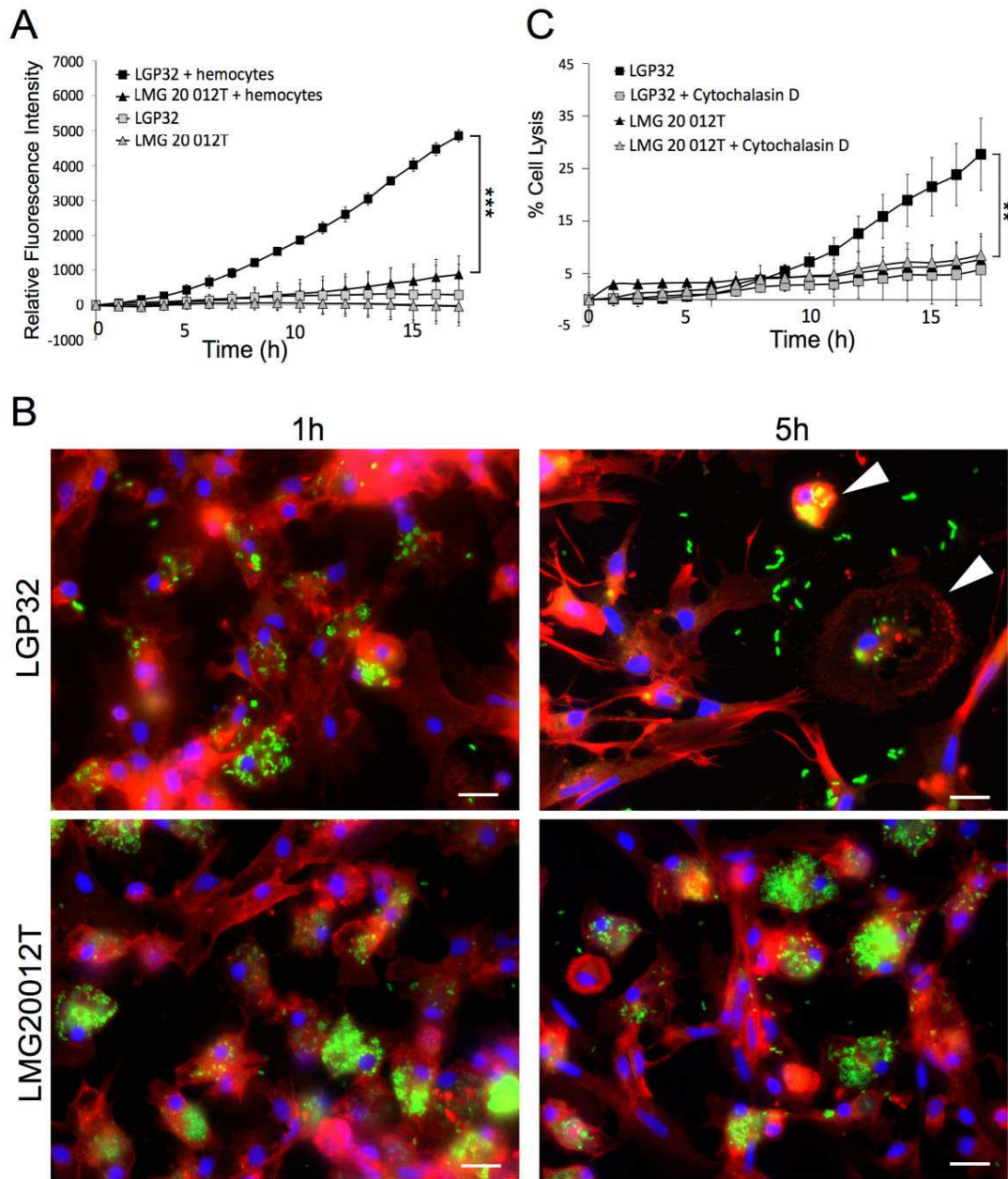


Fig. 1. Hemocyte phagocytosis and cytolysis support efficient replication of LGP32.

A. Phagocytosis-dependent growth of LGP32 in hemocyte co-cultures. In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LGP32 or the avirulent control LMG 20012<sup>T</sup>. In controls, vibrios were incubated in SSW in the absence of hemocytes. Growth was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. Values are presented  $\pm$  SEM \*\*\*P < 0.001 (two-way rANOVA).

B. LGP32-induced hemocyte cytolysis and extracellular release of bacteria. Monolayers of hemocytes infected at a MOI of 50:1 with GFP-expressing LGP32 or LMG20012<sup>T</sup> were observed 1 h and 5 h after contact. Both strains were rapidly phagocytosed. Major hemocyte lysis and release of extracellular vibrios was observed after 5 h upon exposure to LGP32 but not LMG 20012<sup>T</sup>. Nuclei were stained with DAPI and actin cytoskeleton with phalloidin-TRIC. Scale bar: 5  $\mu$ m.

C. Phagocytosis-dependent cytolysis of hemocytes. Hemocyte monolayers were incubated with LGP32 or LMG 20012<sup>T</sup> at a MOI of 50:1 for phagocytosis in the presence/absence of cytochalasin D. Hemocyte cytolysis was monitored by using cell impermeant Sytox green DNA dye. The percentage of hemocyte lysis was obtained by comparison with a Triton X100-incubated lysis (100% lysed hemocytes). Values are presented  $\pm$  SEM. \*\*P < 0.01 (RM-ANOVA).

Antioxidant responses and metal homeostasis genes are highly expressed intracellularly

To identify the mechanisms involved in LGP32 resistance to the hemocyte killing machinery and phagocytosis-dependent cytotoxicity, we used a global comparative RNAseq approach early after vibrio entry into hemocytes (1 h after phagocytosis). Transcripts of intracellular LGP32 were obtained from hemocyte monolayers and their relative level of expression was compared with that of transcripts of extracellular LGP32 obtained from vibrios kept in SSW alone. Out of 3230 genomic elements (not including rRNA genes), transcript levels of 1280 genes varied by more than fourfold in the intracellular condition, with a false detection rate of 5% in all triplicate conditions (Supporting Information Table S1; GEO Submission GSE73260). The RNAseq results were validated by qRT-PCR for 84% of the tested genes on another set of three independent experiments (Supporting Information Fig. S2). RNAseq revealed a massive activation of LGP32 metabolism inside the hemocytes. Indeed, the three functional categories that gathered most of the differentially expressed genes were protein synthesis, carbon compound utilization and transport, and amino acid transport and metabolism. An important up-regulation of genes involved in glycogenesis, gluconeogenesis, TCA cycle, as well as in envelope, LPS and capsule biogenesis was also observed (Supporting Information Table S1; Table 1).

Table 1. Functional categories referring to gene transcripts over/sub-represented in the intracellular condition.

Functional category	Number of genes
Protein synthesis	105/12
Carbon compound utilization and transport	83/31
Amino acid metabolism and transport	93/19
Transport (others)	22/41
Energy production and respiration	34/28
Stress response	25/32
Metal homeostasis	39/9
Nucleoside and nucleotide metabolism	30/5
Cofactor and small molecule carrier biogenesis	23/8
DNA replication, recombination and repair	21/9
Signalization	8/21
LPS and capsule biogenesis	21/7
Pilus biogenesis	18/10
Glycolysis/gluconeogenesis/TCA cycle	26/1
Virulence	10/13
Envelope biogenesis	15/6
Fatty acid and phospholipid metabolism	12/9
Central intermediary metabolism	13/3
Transcriptional regulation	6/7
Chemotaxis	9/3
Mobile genetic elements	0/11
Protein and peptide degradation	5/5
Cell division	6/0
DNA metabolism	2/3
Transcription	3/1
Motility	3/0

Finally, stress response and metal homeostasis were functions highly impacted by the intracellular environment.

Copper efflux and antioxidant genes were the most highly induced in the intracellular environment. Indeed, among 34 genes overexpressed more than 50 times (i.e. 0.8% of the transcriptome; Table 2), five genes were involved in copper efflux: *cusCBAF* (VS\_II0514, VS\_II0515, VS\_II0516, VS\_II0517) and *copA* (VS\_0768), which encode a RND-transporter and a P-type ATPase respectively. Three additional genes were involved in the antioxidant response, namely *sodA* (VS\_2918) and *ahpC/ahpF* (VS\_2126, VS\_2127), which encode a superoxide dismutase and an alkyl hydroperoxide reductase complex respectively. As RNAseq was performed in whole hemolymph, we evaluated the respective role of plasma versus the intracellular environment on the expression of candidate genes. As a control, vibrios were incubated in SSW for the same times. While the antioxidant genes *ahpC* and *sodA* were induced only after entry into hemocytes ( $P < 0.01$ ), copper efflux genes *copA* and *cusB* were already induced in oyster plasma ( $P < 0.01$ ). Still, after 1 h, *copA* expression remained 20 times higher in the intracellular condition than in the extracellular controls ( $P < 0.01$ ; Fig. 2).

The antioxidant *sodA* gene is required for intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes

To determine whether the antioxidant response was necessary for LGP32 intracellular survival and phagocytosis-dependent cytotoxicity, we constructed deletion mutants lacking *sodA* (VS\_2918) and *ahpC* (VS\_2126). As a second copy of *ahpC* (VS\_2126) referred to as *tsa* (VS\_0593) was found in LGP32 genome (39.8% amino acid identity), we also constructed a  $\Delta$ *ahpC/tsa* double mutant. Deletions were confirmed by PCR and sequencing (Supporting Information Fig. S3). Growth in Zobell medium or plasma and phagocytosis efficiency did not significantly differ from the wild-type LGP32 (Supporting Information Figs S4 and S5). Interestingly, for  $\Delta$ *sodA*, but not  $\Delta$ *ahpC* nor  $\Delta$ *ahpC/tsa* (Supporting Information Fig. S6), we observed a strongly attenuated phagocytosis-dependent growth ( $P < 0.001$ ) and cytotoxicity ( $P < 0.001$ ) compared with the wild-type LGP32 (Fig. 3A and B). Complementation of  $\Delta$ *sodA* with pMRB plasmids encoding *sodA* led to a dose-dependent restoration of the LGP32 cytotoxicity to hemocytes (Fig. 3B). Altogether, those results show the essential role of *sodA* in LGP32 resistance to phagocyte killing and subsequent cytotoxicity to hemocytes. However, the  $\Delta$ *sodA* deletion mutant did not show any significant virulence attenuation in oyster experimental infections (Fig. 3C).

Table 2. List of the 34 transcripts enriched by more than 50 times in the intracellular condition.

Label	Product	log2 fold change
VS_II0905	Putative endoribonuclease, translation inhibitor	9.49
VS_II0514	Copper efflux outer membrane protein, cusC	9.2
VS_II0517	Periplasmic copper-binding protein, cusF	8.15
VS_II0904	Aldehyde dehydrogenase	7.65
VS_1283	Conserved hypothetical protein	7.26
VS_II0149	Phospholipase	6.96
VS_II1062	Secreted metalloprotease PrtV/InhA prtV	6.94
VS_2126	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C, ahpC	6.9
VS_2127	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F, ahpF	6.84
VS_II0515	Copper efflux membrane fusion protein, cusB	6.76
VS_1282	Putative methylcobalamin:homocysteine methyltransferase, metE	6.73
VS_2591	Maltodextrin transport system permease protein, malC	6.58
VS_1145	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate-homocysteine methyltransferase	6.55
VS_1068	Outer membrane protein	6.39
VIBSP2_misc_RNA_19	IGR VS_II0219-VS_II0220, vsr217	6.37
VS_2589	Cytoplasmic membrane-associated tetrahaem c-type cytochrome, cymA	6.33
VS_3121	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit, purK	6.33
VS_0992	Oligopeptide transport system permease protein oppC	6.28
VS_2246	Putative succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit	6.13
VS_1313	Putative tricarboxylate transport, tctC	6.12
VS_2244	succinate dehydrogenase, sdhB	6.06
VS_II0903	Putative dipeptidase	6
VS_1461	Cytochrome c oxidase subunit, ccoQ	5.93
VS_2585	Cyclomaltodextrin glucanotransferase precursor	5.92
VS_0768	Copper-exporting P-type ATPase A, copA	5.87
VS_0175	Cold shock protein, cspA	5.84
VS_1967	Anthranilate synthase beta subunit, trpD	5.81
VS_2927	Aspartate carbamoyltransferase, catalytic chain, pyrB	5.72
VS_II0545	Putative glycine betaine transporter, betT	5.71
VS_2382	D-methionine transport ATP-binding protein, metN	5.7
VS_2241	Succinyl-CoA synthetase beta chain, sucC	5.7
VS_II0516	Copper efflux membrane component, cusA	5.69
VS_2918	Superoxide dismutase, sodA	5.69
VS_2242	Dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase	5.66

See Supporting Information Table S1 for extensive list of differentially represented transcripts. Genes characterized in the present study are in boldface.

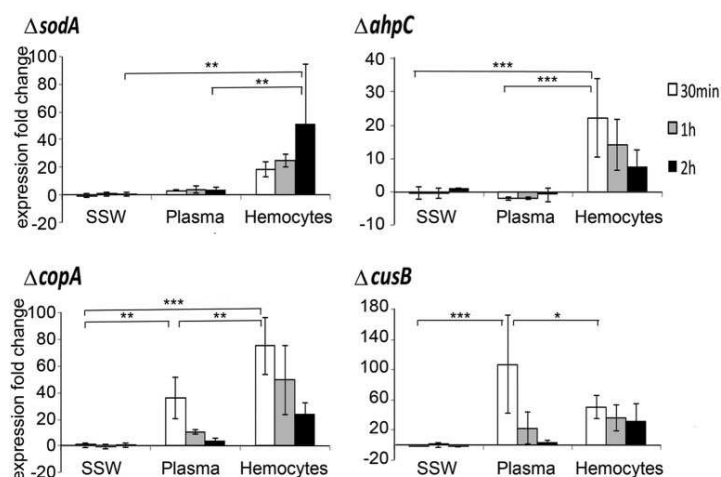


Fig. 2. Time-course of LGP32 antioxidant and copper efflux gene expression monitored by qRT-PCR. *Vibrio* gene expression was analysed for every time point in three independent experiments. Conditions included vibrios in SSW (control), vibrios in oyster plasma (opsonization) and intracellular vibrios in oyster hemocytes. Three incubation times were tested (30 min, 1 h, 2 h). Relative expression was calculated by normalization using three constitutively expressed genes VS\_2913, VS\_0852 and VS\_II1055. Results were standardized relative to the control condition (vibrios in SSW). Data are the mean of gene expression in the three independent experiments  $\pm$  SEM. Data were analysed by two-way ANOVA and Tukey's post-test for multiple comparison, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



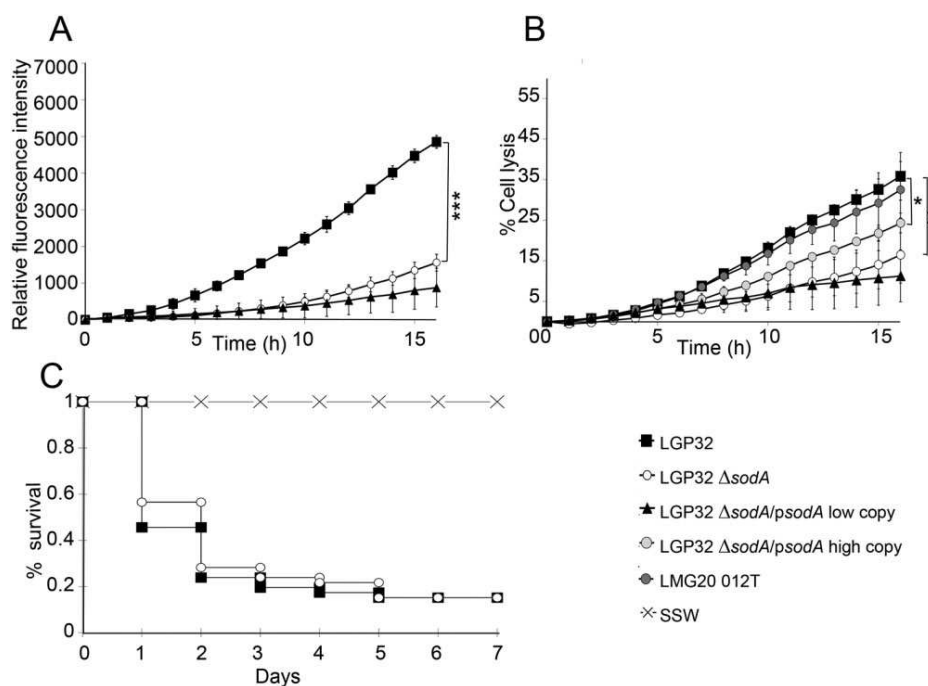


Fig. 3. *sodA* is required for intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes. In three independent experiments, hemocyte monolayers were incubated at a MOI of 50:1 with LMG 20012<sup>T</sup> (control), wild-type LGP32 or its  $\Delta$ sodA isogenic mutants complemented or not with a low or high copy plasmid carrying *sodA*.

A. Phagocytosis-dependent growth of LGP32 was monitored by the fluorescence of the GFP-expressing bacteria. \*\*\* $P < 0.001$  (RM-ANOVA). B. Cytotoxicity to hemocytes was monitored by the Sytox green assay. Values are presented  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  (RM-ANOVA). C. Kaplan–Meier survival curves were generated from oysters injected with  $4 \times 10^7$  cfu per animal of the wild-type LGP32 or the  $\Delta$ sodA isogenic mutant. An injection of sterile seawater (SSW) was used as control. Groups of 45 oysters (15 per seawater tank) were monitored for 7 days after infection. One experiment representative of three independent experiments is shown.

*copA* is required for copper resistance, intracellular survival and cytotoxicity in phagocytes

Isogenic mutants lacking *copA* (VS\_0768) or *cusAB* (VS\_II0515, VS\_II0516) were constructed (Supporting Information Fig. S3) to study the role of copper efflux in the intracellular survival and virulence of LGP32. Growth in Zobell medium or plasma and phagocytosis efficiency did not significantly differ from the wild-type LGP32 (Supporting Information Figs S4 and S5). Both deletion mutants were then tested for resistance to copper and zinc (as a control of metal specificity) by zone inhibition assay.  $\Delta$ copA showed a major increase in susceptibility to copper compared with the wild-type LGP32, but remained equally susceptible to zinc (Supporting Information Fig. S7). Complementation with a pMRB plasmid carrying *copA* restored resistance to high copper concentrations. No significant difference was observed for the  $\Delta$ cusAB mutant in our in vitro assays (Supporting Information Figs S7 and S8). In hemocyte co-cultures, the phagocytosis-dependent growth of LGP32 was strongly attenuated in the  $\Delta$ copA mutant ( $P < 0.001$ ; Fig. 4A). Moreover, the  $\Delta$ copA mutant was two times less cytotoxic

than the wild-type LGP32 ( $P < 0.001$ ; Fig. 4B). Importantly, complementation restored the cytotoxicity in hemocytes to wild-type levels (Fig. 4B). This confirmed the essential role of *copA* in LGP32 resistance to copper, intracellular survival and subsequent cytolysis of host cells.

*copA* is required for host colonization and virulence in experimental infections

In vivo studies were performed to characterize the role of *copA* in LGP32 pathogenesis. In experimental infections of juvenile oysters, the  $\Delta$ copA mutant showed a significantly attenuated virulence. Indeed, mortalities at day 7 dropped from 85% for wild-type LGP32 down to 65% ( $P < 0.01$ ) for the  $\Delta$ copA mutant (Fig. 4C). To investigate the behaviour of the  $\Delta$ copA mutant in vivo, colonization was tested by injecting juvenile oysters with GFP-labelled LGP32 or  $\Delta$ copA. The  $\Delta$ copA mutant showed a significant colonization defect with only  $5757 \pm 4096$  cfu g<sup>-1</sup> of oyster flesh as opposed to  $26700 \pm 4096$  cfu g<sup>-1</sup> for LGP32 ( $P < 0.05$ ), as soon as 2 h after injection (Fig. 4D). Importantly, confirming our in vitro data (Fig. 1B), LGP32

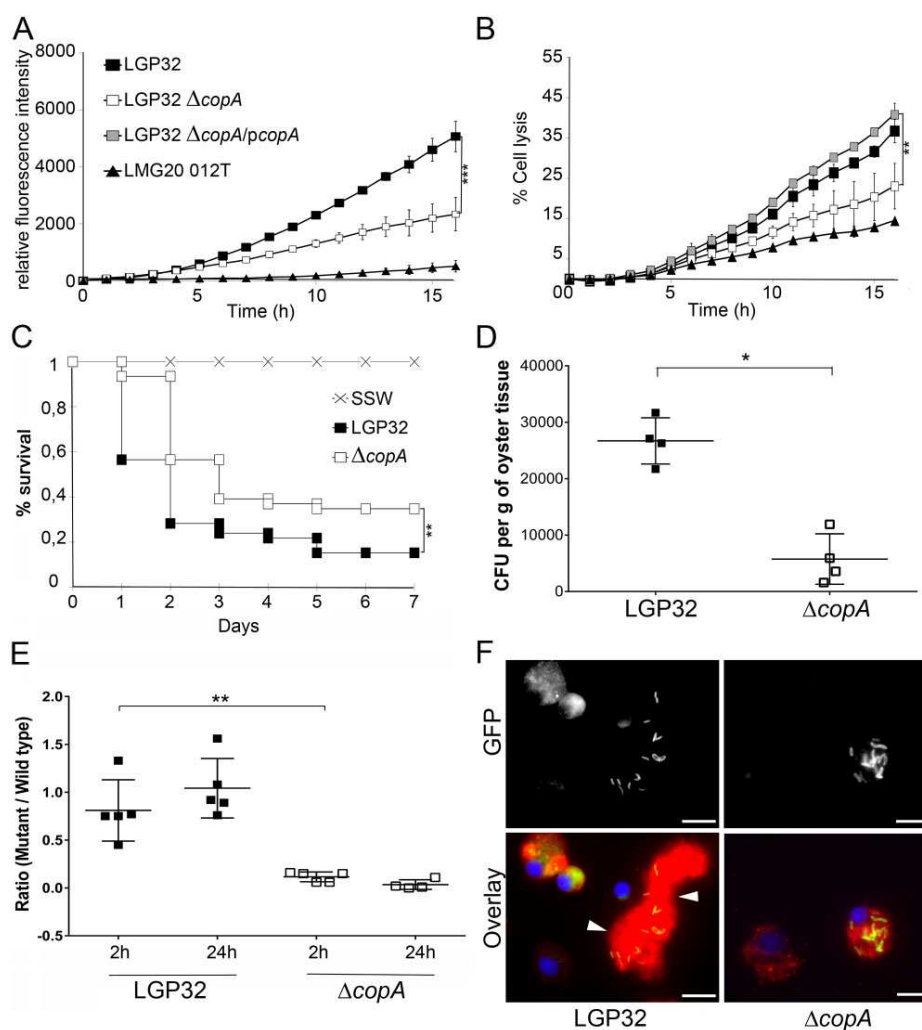


Fig. 4. *copA* is required for intracellular survival, cytotoxicity in phagocytes, host colonization and virulence. Phagocytosis-dependent growth (A), cytotoxicity (B) and virulence (C) of bacteria were monitored. In (C), Kaplan–Meier survival curves were generated from oysters injected with  $4 \times 10^7$  cfu per animal of the wild-type LGP32 or the  $\Delta copA$  isogenic mutant. One experiment representative of three independent experiments is shown. \*\* $P < 0.05$  (log-rank test). Colonization (D) and competitive indexes (E) were tested by injecting juvenile oysters with fluorescent vibrios at  $7 \times 10^7$  cfu per oyster and counting cfus from total oyster flesh either 2 h or 24 h after injection. Each dot represents one animal. For competitive indexes (E), the ratio between GFP-expressing  $\Delta copA$  and mCherry-expressing LGP32 is shown in white boxes while the ratio between GFP-expressing LGP32 and mCherry-expressing LGP32 is shown in black boxes. For photographs of oyster hemolymph containing GFP-labelled vibrios 2 h after injection (F), oyster hemolymph was cytospun on a glass slide and stained with DAPI and TRITC-WGA. Arrowheads indicate LGP32 associated with cell debris.

induced a major cytolysis of oyster hemocytes and the release of extracellular bacteria in vivo (Fig. 4F), whereas  $\Delta copA$  remained intracellular with most hemocytes showing preserved cell integrity (Fig. 4F). In agreement with the observed  $\Delta copA$  colonization defect,  $\Delta copA$  was massively and significantly ( $P < 0.01$ ) outcompeted by the wild-type LGP32 in co-infection assays where oysters were injected with identical doses of GFP-expressing LGP32 and mCherry-expressing LGP32 or  $\Delta copA$ . We indeed measured very low competitive indexes

(CI) =  $0.12 \pm 0.05$  and  $0.03 \pm 0.05$ , 2h and 24 h after injection respectively (Fig. 4E). Co-injection of GFP- and mCherry-expressing wild-type LGP32 gave CI~1 ( $0.81 \pm 0.31$  and  $1.04 \pm 0.31$  at 2 h and 24 h, respectively), confirming the absence of bias due to the fluorescent protein expression plasmids used here (Fig. 4E). Altogether, these data show that copper efflux is essential for LGP32 survival in hemocytes, expression of intracellular cytotoxicity, host colonization and virulence in experimental infections.

## Discussion

As an increasing number of pathogenic vibrio species have been shown to adopt intracellular stages (Rosenberg and Falkovitz, 2004; Duperthuy et al., 2011; Zhang et al., 2012; de Souza Santos and Orth, 2014) understanding the mechanisms by which vibrios survive intracellularly has become a priority. Here, we developed a transcriptomic analysis coupled to *in vitro* and *in vivo* functional genomics, through which we identified functions essential for vibrio intracellular survival. Overall, our study provides important insights in several aspects. First, it is to our knowledge the first global characterization of the molecular functions sustaining intracellular life in a vibrio strain whose virulence depends on its intracellular survival in phagocytes. Second, we functionally characterized the antioxidant response and metal homeostasis as two major functions widely conserved among vibrios and essential for vibrio intracellular stages. Third, we identified copper tolerance as a major determinant of vibrio fitness at the host-pathogen interface.

*Vibrio tasmaniensis* LGP32 was chosen in this study as it has evolved the capacity to survive in oyster hemocytes (Duperthuy et al., 2011). Our present study showed that a phagocytosis step was required for LGP32 to finally induce cytolysis of oyster immune cells. Such an intracellular LGP32-driven cytolysis of hemocytes was dependent on LGP32 entry and survival inside hemocytes, as demonstrated with phagocytosis-inhibiting drugs or mutants impaired in intracellular survival. Since circulating phagocytes were highly damaged in infected oysters, the LGP32-driven cytolysis of oyster hemocytes could cause a dramatic immune suppression of oyster defences promoting pathogenesis.

Oyster hemocytes are immune cells equipped with a complete panel of microbicidal functions (Bachere et al., 2015). In particular, they respond to phagocytosis by a rapid and massive oxidative burst highly toxic to phagocytosed microorganisms (Poirier et al., 2014). Consistently, the antioxidant response was essential to LGP32 survival in the phagosome hostile environment. *sodA* (VS\_2918) and *ahpC/ahpF* (VS\_2126, VS\_2127) were among the genes most highly induced intracellularly. Moreover, MnSOD (*sodA* gene product) was essential for LGP32 intracellular survival and cytotoxicity in oyster phagocytes. By catalysing the conversion of the highly toxic superoxide ion ( $O_2^{\cdot-}$ ) to  $H_2O_2$  and dioxygen ( $O_2$ ) SODs contribute to tolerance to oxidative stress (Kang et al., 2007) and resistance to acidic pH (Kim et al., 2005) in diverse vibrio species. In *V. vulnificus*, signals inducing MnSOD expression include low iron and acidic pH (Kim et al., 2005), which are signals likely encountered by LGP32 in the phagosome as an active influx of iron and

efflux of cations is observed (Supporting Information Table S1).

We report here the essential role of a MnSOD in the intracellular survival of a vibrio species, whereas in the coral pathogen *V. shiloi*, a FeSOD contributes to survival in coral ectodermal cells (Banin et al., 2003). Interestingly, in *Escherichia coli*, MnSOD is expressed under iron-limiting conditions, when FeSOD is repressed (Niederhoffer et al., 1990). This may explain why MnSOD plays a crucial role in LGP32 intraphagosomal stages, where iron is scarce as indicated by the intracellular activation of iron uptake (Supporting Information Table S1). From our present data and studies on *V. shiloi* (Banin et al., 2003), Fe and MnSODs, which share a common ancestor, are required for intracellular survival of at least two pathogenic vibrio species. As they are highly conserved across vibrios, they could be involved in the intracellular survival of additional vibrio species.

One major result of our work is the identification of the essential role of metal homeostasis and copper efflux in particular in vibrio intracellular life and subsequent cytotoxicity, colonization and virulence in oyster experimental infections. However, in the last decade metal homeostasis has been highlighted to play a role in different bacterial pathogenesis in vertebrates (Becker and Skaar, 2014). Among the different metals involved at the host-pathogen interface, the toxicity of copper appears to be mainly used as a defence mechanism by hosts. Hence, copper efflux is an important mechanism for pathogens to avoid copper toxicity. Indeed, free copper enhances the production of reactive oxygen species (ROS) that create damages to a broad series of macromolecules and largely contribute to copper antimicrobial properties (Hodgkinson and Petris, 2012). In  $H_2O_2$ -rich environments like the phagosome, the redox properties of Cu(I) catalyse the generation of highly toxic hydroxyl radicals ( $OH^{\cdot}$ ). Consistent with its major protective role against hemocyte intracellular killing, CopA (VS\_0768) of LGP32, a member of the P-type ATPase family exporting Cu(I) across the plasma membrane (Hodgkinson and Petris, 2012), was highly transcribed in the phagosome. P-type ATPases homologous to CopA have been described in diverse species of intracellular bacteria like *Salmonella* (CopA; Espariz et al., 2007) and *Mycobacterium* (CtpV) that invade mammalian phagocytes (Rowland and Niederweis, 2012). As in oyster hemocytes, genes encoding copper-exporting P-type ATPase are upregulated by such pathogens when they enter phagosomes of macrophages (Chaturvedi and Henderson, 2014) in which copper concentration increases up to several hundred micromolar (Wagner et al., 2005).

The major role of CopA in LGP32 intracellular survival strongly suggests that phagosomes of oyster hemocytes accumulate copper to control phagocytosed pathogens

and supports recent findings showing that both hosts and pathogens manipulate copper content in infected host niches (Chaturvedi and Henderson, 2014; Chaturvedi et al., 2014). In particular, mammalian phagocytes have been shown to modulate the intraphagosomal concentration of metals, by depriving microorganisms from essential metals like iron or accumulating toxic metals like copper (Hood and Skaar, 2012). Thus, in human macrophages, metal homeostasis is essential for the control of phagocytosed bacteria (Soldati and Neyrolles, 2012). The main effectors of copper influx in phagosomes of macrophages are CTR1 and ATP7A (Hodgkinson and Petris, 2012) whose expression is essential for the copper-mediated bactericidal activity of the phagosome (White et al., 2009). Interestingly, three ATP7A and two CTR1 genes are found in the genome of *Crassostrea gigas* (Genbank accession numbers gbIEKC33905.1, gbIEKC18325.1, gbIEKC28422.1 and gbIEKC31900.1, gbIEKC33878.1). Thus, like mycobacteria replicating inside phagosomes (Neyrolles et al., 2015), LGP32 uses copper efflux to resist the high copper concentrations to which it is exposed after phagocytosis. It has been hypothesized that copper detoxification has been conserved during evolution to provide protection against phagocytosis (Raimunda et al., 2011; German et al., 2013). This hypothesis is supported by the present data, which show that pathogens capable to survive inside phagocytes of invertebrates (here the oyster) use strategies similar to pathogens surviving inside macrophages of vertebrates. This high degree of conservation is consistent with the high conservation of the phagocytotic machinery that intracellular pathogens have to face, from protozoan to metazoan phagocytic cells (Boulais et al., 2010). The major role of copper homeostasis at the host-pathogen interface may well go beyond its role in intracellular survival. Indeed, copper efflux was induced as soon as LGP32 entered oyster plasma and was essential for oyster colonization. This is consistent with the copper-rich composition of marine invertebrate plasma, which is characterized by abundant copper-containing proteins like Zn/Cu SODs in the oyster (Gonzalez et al., 2005; Duperthuy et al., 2011) or hemocyanin in crustaceans and cephalopods (Terwilliger and Dumler, 2001) to which squid-colonizing vibrios resist (Kremer et al., 2014). A recent study suggested that *copA* is required for the colonization of the squid light organ by *V. fischeri* (Brooks et al., 2014). We show here for the first time the central role of *copA* in the pathogenic potential of a vibrio.

The gene *copA* is highly conserved among vibrios and to a broader extent among bacteria (Hernandez-Montes et al., 2012). Hence, *copA* has been used to evaluate the impact of copper-rich environments on bacterial communities, suggesting that *copA* is under selection in copper-rich environments (Besaury et al., 2013). In the wild,

copper accumulation often originates from human-related activities and numerous aquatic animals can accumulate copper in their tissues, including oysters (Luo et al., 2014). Therefore, copper abundance in different environmental niches, including invertebrates as well as copper of natural or anthropogenic sources, may represent an important driver for the emergence of copper resistant pathogens. In conclusion, this study demonstrates the essential role of copper efflux and antioxidants in vibrio survival inside host cells and suggests that interactions of vibrios with different copper-rich environmental niches could select important adaptive traits favouring emergence of water-borne pathogens.

## Experimental procedures

### Animals

Adult diploid *C. gigas* were purchased from the local oyster farm in Le Petit Mas (Mèze, France) and used for RNAseq and qRT-PCR analyses. Adult triploid *C. gigas* were purchased from the local oyster farm at the 'CAT de Maguelone' (Palavas, France) to perform in vitro cell biology experiments. For experimental infections, juvenile diploid *C. gigas* oysters were provided by the Ifremer oyster hatcheries of Argenton and Bouin (France).

### Bacterial strains and culture conditions

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

### Plasmid construction and mutagenesis

Mutagenesis was performed by gene replacement, as described in (Lemire et al., 2014). Two independent PCR amplifications of the regions (500 bp) flanking the gene to delete were performed using two primer pairs (1 + 2 and 3 + 4; Supporting Information Table S2). An inside out PCR was performed using the pSW7848T suicide vector DNA (Val et al., 2012) and primer pair pSW-F and pSW-R (Supporting Information Table S2). The recombinant plasmid was then assembled by the Gibson assembly method using the Gibson assembly master mix (New England Biolabs, NEB) according to the manufacturer's instructions. Mutants were screened by PCR using external primer 5 + 6 listed in Supporting Information Table S2. For complementation experiment, the gene of interest was cloned under the control of a constitutive P<sub>LAC</sub> promoter in a pMRB plasmid (Le Roux et al., 2011). Two independent PCR amplifications of the gene and plasmid were performed using the primers gene-F + R and pMRB-



F + R reciprocally. After purification and quantification, 100 ng of the PCR products were mixed with the Gibson assembly Master Mix and incubated for 60 min at 50°C. Samples were diluted 1/3 before *E. coli* transformation. Clones were controlled by digestion with restriction enzyme and sequencing of PCR products obtained using the primers described in Supporting Information Table S2. Strains  $\pi$ 3813 and  $\beta$ 3914 were used as plasmid hosts for cloning and conjugation respectively (Le Roux et al., 2007). Conjugation was carried out as described in Goudenège et al., 2014. Plasmids and strains used and/or constructed in the present study are presented in Supporting Information Table S2.

#### Preparation of vibrios and oyster hemocytes for in vitro assays

Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 ml syringe with a 23-G needle. After cell counting, freshly collected hemolymph was dispensed in wells to obtain hemocytes monolayers in the desired plate format (see below). In parallel, after growing vibrio strains at 20°C in Zobell medium for 14 h, bacteria were washed in sterile sea water (SSW) by two successive centrifugations (10 min, 1000 g, 20°C) and diluted in SSW at a working dilution of  $2.10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> as deduced from OD<sub>600</sub> reads. When needed, bacteria were opsonized for one hour in 0.22 µm filtered oyster plasma.

#### In vitro assay for vibrio intracellular survival

Hemocytes ( $2 \times 10^5$  hemocytes per well) were plated in Black 96-wells plate with transparent flat bottom and kept in plasma. Vibrio strains carrying high copy pMRB-GFP plasmid (Supporting Information Table S2) were opsonized in oyster plasma. Opsonized vibrio strains were then added to the hemocyte monolayers at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 g. After 1 h of phagocytosis, hemocytes were carefully washed three times with SSW to remove any remaining extracellular bacteria. Then, GFP fluorescence was measured every hour over 20 h using a TECAN plate reader ( $\lambda_{ex}$  480 nm/ $\lambda_{em}$  520 nm). In each experiment, each condition was performed in triplicates and the depicted results are the average of three independent experiments. Statistical analysis was performed using RM-ANOVA over the independent experiments.

#### In vitro cytotoxicity assay

Hemocytes ( $2 \times 10^5$  hemocytes per well) were plated in Black 96-wells plate with transparent flat bottom. After 1 h of adhesion and plasma removal, 10 µg ml<sup>-1</sup> of Sytox Green (Molecular Probes) diluted in 200 µl SSW was added to each well. Opsonized vibrio strains were then added to the hemocyte monolayers at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 g. Sytox Green fluorescence was determined ( $\lambda_{ex}$  480 nm/ $\lambda_{em}$  550 nm) every 30 min over 14 h using a TECAN microplate reader. For controls, washed bacteria were incubated in Sytox Green diluted in

SSW. Maximum cytolysis was determined by incubating hemocytes in Sytox Green in presence of 0.1% Triton X-100. To determine the role of phagocytosis in vibrio-induced cytolysis of hemocytes, hemocytes were incubated with 5 µg ml<sup>-1</sup> of cytochalasin D, an actin polymerization inhibitor, 30 min before adding vibrios. The results are representative of three independent experiments. The RM-ANOVA test was used to estimate the P-values of the comparison.

#### Fluorescence microscopy

Hemocytes were plated onto glass coverslips in a 24-well plate to obtain monolayers of  $5 \times 10^5$  cells. After adhesion, hemocytes were exposed to GFP-expressing vibrios (washed in SSW) at a multiplicity of infection of 50:1. Binding of bacteria to hemocytes was synchronized by a brief centrifugation of 5 min at 400 g. After 1 h, 3 h and 5 h-incubation time, culture supernatants were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and cytospun on glass slides for 5 min at 1000 g. The cell monolayers (coverslips from bottom of the wells), were also fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Glass slides and coverslips were then washed in PBS and stained with 0.25 µg ml<sup>-1</sup> DAPI (Sigma) and 0.5 µg ml<sup>-1</sup> Phalloidin-TRITC (Sigma). Fluorescence imaging was performed using a Zeiss Axioimager fluorescence microscope and a Zeiss 63x Plan-Apo 1.4 oil objective equipped with a Zeiss MRC black and white camera for image acquisition.

#### Vibrio transcriptomic analysis by RNAseq

LGP32 was grown at 20°C in Zobell medium for 10 h and washed twice in SSW by centrifugations (10 min, 1000 g, 20°C). Bacteria were then resuspended in SSW at OD<sub>600</sub> of 0.5 ( $1.10^9$  cfu ml<sup>-1</sup> equivalent). Hemolymph was collected from the adductor muscle of oysters using a 2 ml syringe with a 23-G needle. Freshly collected hemolymph was dispensed in a 6-well plate to obtain monolayers of  $6 \times 10^6$  hemocytes per well. One hour after plating, vibrios were added at a multiplicity of infection of 100:1, and plates were centrifuged for 5 min at 400 g for binding synchronization. After 1 h of co-incubation, wells were washed extensively three times with SSW to remove extracellular bacteria and 500 µl Trizol reagent (Invitrogen) was added to every well for total RNA extraction. The efficiency of vibrios internalization in hemocytes was verified by microscopy showing that about 40% of hemocytes internalized about 50–70 bacteria, with rare bacteria remaining extracellular. As a control, washed bacteria were incubated in triplicates in SSW for 1 h and resuspended in Trizol after centrifugation. RNA from three independent experiments of LGP32 phagocytosis by hemocytes was extracted using the Trizol reagent protocol (Life Technologies). RNA concentration was measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) and RNA quality was monitored by agarose gel electrophoresis and a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). The bioanalyser analysis showed that bacterial RNAs represented approximately 10% of the total RNA in the intrahemocyte samples. Accordingly, control samples were prepared by mixing total RNA extracted from LGP32 incubated in SSW with *C. gigas* hemocyte RNA with a ratio of 1:9.

For each sample, 7 µg of starting material was treated with DNaseI (4 U) (Ambion's DNA-free™) following the manufac-

turer's instructions. Samples were then enriched in bacterial RNA using the MICROBEnrich™ Kit (Ambion) and bacterial rRNA were then removed by the MICROBExpress™ Kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. Because the MICROBEnrich™ Kit is based on oligonucleotides that are designed to capture rRNAs from mammal species, it is not fully efficient to remove invertebrate rRNAs. Accordingly, we performed a further depletion step using a 5'-phosphate-dependent exonuclease (Terminator, Epicentre), that degrades processed transcripts, following instructions from the manufacturer. For cDNA sequencing, for each sample, a directional cDNA library was constructed and sequenced on an illumina Hiseq 1000, in paired-end reads of  $2 \times 100$  bp. Three samples were multiplexed per lane giving  $\sim 60 \times 10^6$  reads per sample. Out of 50–60 M reads obtained from the RNA-seq, 1.2 M reads from the SSW samples and 2.3 M reads from the intrahemocyte samples were successfully mapped onto the genome of LGP32.

### Sequencing data analysis

Transcriptomic high throughput sequencing data were analysed using a bioinformatic pipeline implemented in the Microscope platform (Vallenet et al., 2013). The current pipeline is a 'Master' shell script that launches the various parts of the analysis (i.e. a collection of Shell/Perl/R scripts) and controls for all tasks having been completed without errors. In a first step, the RNA-Seq data quality was assessed by including option like reads trimming or merging/split paired-end reads. In a second step, reads were mapped onto the *V. tasmaniensis* LGP32 genome (genome ID: 13995, assembly GCA\_000091465.1, NCBI) using the SSAHA2 package (Ning et al., 2001) that combines the SSAHA searching algorithm (sequence information is encoded in a perfect hash function) aiming at identifying regions of high similarity, and the cross-match sequence alignment programme (Ewing et al., 1998), which aligns these regions using a banded Smith-Waterman-Gotoh algorithm (Smith and Waterman, 1981). An alignment score equal to at least half of the read is required for a hit to be retained. To lower false positives discovery rate, the SAMtools (v.0.1.8; Li et al., 2009) are then used to extract reliable alignments from SAM formatted files. The number of reads matching each genomic object harboured by the reference genome is subsequently computed with the Bioconductor-Genomic-Features package (Carlson et al., 2011). In case of reads matching several genomic objects, the count number is weighted in order to keep the same total number of reads. Finally, the Bioconductor-DESeq package (Anders and Huber, 2010) with default parameters is used to analyse raw counts data and test for differential expression between conditions. Out of the paired-end reads, only mapping results of the first sequencing run reads were used for the DESeq analysis.

### qRT-PCR analyses

Experiments were performed as for 'Vibrio transcriptomic analysis by RNAseq'. Conditions tested were:  $6 \times 10^8$  vibrios per well in SSW (control), vibrios in oyster plasma and vibrios opsonized in plasma and incubated on hemocyte monolayers ( $6 \times 10^6$  hemocytes per well) kept in SSW. Vibrios were incu-

bated 30 min, 1 h and 2 h before wells were centrifuged and the incubated stopped by adding 500  $\mu$ l Trizol per well. Total RNA was extracted from Trizol using the DirectZol RNA Miniprep kit (R2051) according to manufacturer's instructions (ZymoResearch) and then treated by DNaseI to remove contaminating genomic DNA, using the DNA-free kit (Ambion) before purification by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Quantification of total RNA was done with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo, Fisher Scientific) and quality was monitored using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.). Real-time qPCR was performed either at the Imagif platform (Gif sur Yvette) on an ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System using a Fast SG qPCR Master Mix (Roboklon), or at the MGX platform in Montpellier using a the Light-Cycler 480 System (Roche), using the primers listed in Supporting Information Table S3. Relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method (Pfaffl, 2001), with three genes, encoding 6PKF (VS\_2913), MGS (VS\_II1055) and CcmC (VS\_0852) being used for normalization. These were chosen because their expression was found to be constant across conditions in the RNAseq, as well as by qRT-PCR.

### Copper and zinc sensitivity

Paper discs (6 mm) were loaded with  $\text{CuSO}_4$  by soaking them over-night into a 50 mM  $\text{CuSO}_4$  solution or 50 mM  $\text{ZnSO}_4$  solution. Cells from a stationary phase LGP32 wild-type and LGP32 isogenic mutant cultures at  $\text{DO} = 1$  were washed twice with SSW before being spread onto agar plates containing 15 g  $\text{L}^{-1}$  bactopeptone and 0.5M NaCl. Using a sterile tweezer, copper and zinc impregnated disks were placed on the bacterial lawn before incubation at 20°C. After 5 day incubation, the diameter of the inhibition zone around the disk was measured.

### Experimental infections of oysters

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

### In vivo colonization and damages to host cells

After overnight growth in LB NaCl 0.5M containing 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol, vibrio strains carrying high copy pMRB-GFP were washed twice with sterile sea water (SSW) by centrifugation for 15 min at 1500 g. Then, groups of 20 oysters were injected with wild-type or  $\Delta\text{copA}$  LGP32 ( $7 \times 10^7$  cfu per oysters). Two hours after injection, hemocytes were collected from the adductor muscle of five oysters and fixed

with 2% paraformaldehyde for 15 min and finally cytospun for 5 min at 1000 g. Samples were stained with 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  DAPI (Sigma) and 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  WGA-TRITC (Sigma). Fluorescence imaging was performed as described above. Statistical analysis was performed using non-parametric Mann-Whitney test for comparing both conditions. Similarly, 2 h after injection, five additional oysters injected with each strain were weighed and homogenized by passage through a Dounce apparatus. Serial dilutions of the homogenized material in SSW were spread onto LB NaCl 0.5M agar plates containing 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol, in duplicate. Colonies were counted after 2 days of growth at 20°C and results were expressed in number of colony forming units per gram of oyster.

#### In vivo competitive index

After overnight growth in LB NaCl 0.5M containing 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  chloramphenicol, wild-type or  $\Delta\text{copA}$  LGP32 carrying high copy pMRB-GFP and wild-type LGP32 high copy pMRB-mCherry were washed twice in SSW by centrifugation for 15 min at 1500 g. Then, groups of 40 oysters were injected with a 1:1 ratio of each strain ( $7 \times 10^7$  cfu per oysters). Two conditions were tested: GFP-wild-type/mCherry-wild-type (control) as well as GFP- $\Delta\text{copA}$ /mCherry-wild-type. Five oysters of each condition were homogenized and plated on agar plates as for the colonization assay. Red colonies (wild-type) and green colonies (mutant) were counted and results were expressed as the ratio of mutant CFUs over wild-type CFUs. Statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test for comparing conditions.

#### Acknowledgements

This study received financial support from the ANR (Vibriogen project, ANR-11-BSV7-0023). We thank Dr Stéphane Cruveiller and Dr Claudine Médigue for RNAseq supervision as well as Dr Julien de Lorgeril and Philippe Clair for precious advice for qRT-PCR analyses. We thank Bruno Petton and Max Nourry from the Ifremer for providing standardized oyster spat for experimental infections. We thank Marc Leroy for technical assistance. We are indebted to the Montpellier RIO Imaging platform of the University of Montpellier. This work has benefited from the facilities and expertise of the high through put sequencing and the qPCR platforms of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif-[www.imagif.cnrs.fr](http://www.imagif.cnrs.fr)).

#### References

Anders, S., and Huber, W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106.  
 Bachere, E., Rosa, R.D., Schmitt, P., Poirier, A.C., Merou, N., Charriere, G.M., and Destoumieux-Garzon, D. (2015) The new insights into the oyster antimicrobial defense: cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol* 46: 50–64.  
 Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J., and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* 46: 418–422.

Becker, K.W., and Skaar, E.P. (2014) Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen. *FEMS Microbiol Rev* 38: 1235–1249.  
 Besaury, L., Bodilis, J., Delgas, F., Andrade, S., De la Iglesia, R., Ouddane, B., and Quillet, L. (2013) Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments. *Mar Pollut Bull* 67: 16–25.  
 Boulais, J., Trost, M., Landry, C.R., Dieckmann, R., Levy, E.D., Soldati, T., et al. (2010) Molecular characterization of the evolution of phagosomes. *Mol Syst Biol* 6: 423.  
 Brooks, J.F., 2nd, Gyllborg, M.C., Cronin, D.C., Quillin, S.J., Mallama, C.A., Foxall, R., et al. (2014) Global discovery of colonization determinants in the squid symbiont *Vibrio fischeri*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 17284–17289.  
 Carlson, M., Pages, H., Aboyou, P., Falcon, S., Morgan, M., Sarkar, D., and Lawrence, M. (2011). In *GenomicFeatures: Tools for Making and Manipulating Transcript Centric Annotations*. Maintainer, B.P. (ed.) pp. 1–66.  
 Chaturvedi, K.S., and Henderson, J.P. (2014) Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 3.  
 Chaturvedi, K.S., Hung, C.S., Giblin, D.E., Urushidani, S., Austin, A.M., Dinauer, M.C., and Henderson, J.P. (2014) Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem Biol* 9: 551–561.  
 Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., et al. (2010) The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ Microbiol* 12: 951–963.  
 Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., et al. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2993–2998.  
 Espariz, M., Checa, S.K., Audero, M.E., Pontel, L.B., and Soncini, F.C. (2007) Dissecting the Salmonella response to copper. *Microbiology* 153: 2989–2997.  
 Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8: 175–185.  
 Flannagan, R.S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7: 355–366.  
 German, N., Doyscher, D., and Rensing, C. (2013) Bacterial killing in macrophages and amoeba: do they all use a brass dagger? *Future Microbiol* 8: 1257–1264.  
 Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.C., Gueguen, Y., and Bachere, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1089–1097.  
 Hernandez-Montes, G., Arguello, J.M., and Valderrama, B. (2012) Evolution and diversity of periplasmic proteins involved in copper homeostasis in gamma proteobacteria. *BMC Microbiol* 12: 249.  
 Hodgkinson, V., and Petris, M.J. (2012) Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* 287: 13549–13555.

- Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* 10: 525–537.
- Kang, I.H., Kim, J.S., and Lee, J.K. (2007) The virulence of *Vibrio vulnificus* is affected by the cellular level of superoxide dismutase activity. *J Microbiol Biotechnol* 17: 1399–1402.
- Kim, J.S., Sung, M.H., Kho, D.H., and Lee, J.K. (2005) Induction of manganese-containing superoxide dismutase is required for acid tolerance in *Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol* 187: 5984–5995.
- Kremer, N., Schwartzman, J., Augustin, R., Zhou, L., Ruby, E.G., Hourdez, S., and McFall-Ngai, M.J. (2014) The dual nature of haemocyanin in the establishment and persistence of the squid-vibrio symbiosis. *Proc Biol Sci* 281: 20140504.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., and Mazel, D. (2007) Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol* 73: 777–784.
- Le Roux, F., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2011) Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Res* 39: 1004–1013.
- Lemire, A., Goudenege, D., Versigny, T., Petton, B., Calteau, A., Labreuche, Y., and Le Roux, F. (2014) Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* 9: 1523–1531.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., and Huang, M. (2014) Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol* 38: 318–329.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* 5: 234–243.
- Neyrolles, O., Wolschendorf, F., Mitra, A., and Niederweis, M. (2015) Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol Rev* 264: 249–263.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., and Fee, J.A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* 172: 1930–1938.
- Ning, Z., Cox, A.J., and Mullikin, J.C. (2001) SSAHA: a fast search method for large DNA databases. *Genome Res* 11: 1725–1729.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
- Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P., et al. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*. *J Biol Chem* 289: 24821–24831.
- Raimunda, D., Gonzalez-Guerrero, M., Leeber, B.W., 3rd, and Arguello, J.M. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu<sup>+</sup>-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals* 24: 467–475.
- Ritchie, J.M., Rui, H., Zhou, X., Iida, T., Kodoma, T., Ito, S., et al. (2012) Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS Pathog* 8: e1002593.
- Rosenberg, E., and Falkovitz, L. (2004) The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching. *Annu Rev Microbiol* 58: 143–159.
- Rowland, J.L., and Niederweis, M. (2012) Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis (Edinb)* 92: 202–210.
- Saulnier, D., Avarre, J.C., Le Moullac, G., Ansquer, D., Levy, P., and Vonau, V. (2000) Rapid and sensitive PCR detection of *Vibrio penaeicida*, the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia. *Dis Aquat Organ* 40: 109–115.
- Smith, T.F., and Waterman, M.S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147: 195–197.
- Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s). *Traffic* 13: 1042–1052.
- de Souza Santos, M., and Orth, K. (2014) Intracellular *Vibrio parahaemolyticus* escapes the vacuole and establishes a replicative niche in the cytosol of epithelial cells. *MBio* 5: e01506–e01514.
- Terwilliger, N., and Dumler, K. (2001) Ontogeny of decapod crustacean hemocyanin: effects of temperature and nutrition. *J Exp Biol* 204: 1013–1020.
- Thompson, F.L., Thompson, C.C., and Swings, J. (2003) *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst Appl Microbiol* 26: 65–69.
- Val, M.E., Skovgaard, O., Ducos-Galand, M., Bland, M.J., and Mazel, D. (2012) Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet* 8: e1002472.
- Vallenet, D., Belda, E., Calteau, A., Cruveiller, S., Engelen, S., Lajus, A., et al. (2013) MicroScope – an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 41: D636–D647.
- Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charriere, G.M., Le Roux, F., Goudenege, D., Gourbal, B., et al. (2015) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* 17: 1152–1165.
- Vidal-Dupiol, J., Ladriere, O., Destoumieux-Garzon, D., Sautiere, P.E., Meistertzheim, A.L., Tambutte, E., et al. (2011) Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. *J Biol Chem* 286: 22688–22698.
- Wagner, D., Maser, J., Lai, B., Cai, Z., Barry, C.E., 3rd, Honer Zu Bentrup, K., et al. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol* 174: 1491–1500.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., and Petris, M.J. (2009) A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem* 284: 33949–33956.



Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J., and Orth, K. (2012) Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species. *Cell Rep* 1: 453–460.

#### Supporting information

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

Fig. S1. LGP32-induced hemocyte cytolysis and release of bacteria.

Fig. S2. qRT-PCR validation of RNAseq data.

Fig. S3. PCR validation of gene deletions.

Fig. S4. Growth of LGP32 mutants in liquid growth medium.

Fig. S5. Phagocytosis of LGP32 mutants by oyster hemocytes.

Fig. S6. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B, C) of the  $\Delta$ ahpC mutant and  $\Delta$ ahpC  $\Delta$ tsa double mutant.

Fig. S7. Increased susceptibility to copper of  $\Delta$ copA but not  $\Delta$ cusAB mutant.

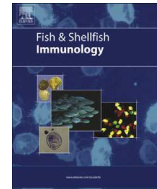
Fig. S8. Growth in hemocyte co-cultures (A) and cytotoxicity (B) of the  $\Delta$ cusAB mutant.

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

Table S2. Strains, plasmids and oligonucleotides.

Table S3. Oligonucleotides for qRT-PCR.

Annexe II : The new insights into the  
oyster antimicrobial defense: Cellular,  
molecular and genetic view



## The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view



Evelyne Bacherre<sup>a,\*</sup>, Rafael Diego Rosa<sup>a,b,1</sup>, Paulina Schmitt<sup>a,c,1</sup>, Aurore C. Poirier<sup>a</sup>,  
Nicolas Merou<sup>a</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>a,1</sup>, Delphine Destoumieux-Garzon<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ifremer, UMR 5244, IHPE Interaction Host Pathogen Environment, UPVD, CNRS, Université de Montpellier, CC 80, F-34095 Montpellier, France

<sup>b</sup> Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, Instituto de Biología, Pontificia Universidad, Católica de Valparaíso, Avenida Universidad 330, 2373223 Valparaíso, Chile

### article info

#### Article history:

Available online 7 March 2015

#### Keywords:

Mollusk  
Immunity  
Antimicrobial peptide  
Hemocyte  
Defensin

### abstract

Oysters are sessile filter feeders that live in close association with abundant and diverse communities of microorganisms that form the oyster microbiota. In such an association, cellular and molecular mechanisms have evolved to maintain oyster homeostasis upon stressful conditions including infection and changing environments. We give here cellular and molecular insights into the *Crassostrea gigas* antimicrobial defense system with focus on antimicrobial peptides and proteins (AMPs). This review highlights the central role of the hemocytes in the modulation and control of oyster antimicrobial response. As vehicles for AMPs and other antimicrobial effectors, including reactive oxygen species (ROS), and together with epithelia, hemocytes provide the oyster with local defense reactions instead of systemic humoral ones. These reactions are largely based on phagocytosis but also, as recently described, on the extracellular release of antimicrobial histones (ETosis) which is triggered by ROS. Thus, ROS can signal danger and activate cellular responses in the oyster. From the current literature, AMP production/release could serve similar functions. We provide also new lights on the oyster genetic background that underlies a great diversity of AMP sequences but also an extraordinary individual polymorphism of AMP gene expression. We discuss here how this polymorphism could generate new immune functions, new pathogen resistances or support individual adaptation to environmental stresses.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Oysters are bivalve mollusks belonging to the Ostreidae family (Mollusca, Bivalvia, Lophotrochozoa). They are sessile filter-feeders living in shallow water from intertidal zones of bays, lagoons and estuaries. In these habitats, oysters are confronted and adapted to great changes in biotic and abiotic environmental conditions. Abiotic factors include temperatures and salinity fluctuations but also exposure to xenobiotics and water acidification due to human activities. Biotic factors include abundant and diverse populations of microbes. As filter feeders, oysters are in permanent contact and exchanges with microorganisms. Thus, they harbor on their

surfaces and inside their body cavities and hemolymph a dense microbiota which has been shown to be greatly dominated by *Vibrio* species [1,2]. Indeed, a large attention has been paid over the past years, to populations of vibrios as they are among the most abundant cultivable bacteria isolated from oyster tissues [3]. In healthy oyster, bacteria load, including vibrio, has been shown to vary over time according to individuals and to temperature, with hemolymph average concentrations of 5,7 colonies forming unit (CFU) per  $\mu\text{L}$  [2,4]. Hence, oyster must be seen as an organism associated to a microbiota (including mutualistics, opportunists and pathogens), that has adapted effective cellular and molecular mechanisms for maintaining homeostasis and health status in stressful and changing environments. The multifactorial diseases affecting *Crassostrea gigas* oysters worldwide [5] are the outcome of an equilibrium collapse in the interplay between the biotic and abiotic environmental factors such as microorganisms and

\* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 14 47 10.  
E-mail address: [ebacherre@ifremer.fr](mailto:ebacherre@ifremer.fr) (E. Bacherre).

<sup>1</sup> These authors contributed equally.

temperature [6], on the one hand, and the oyster physiology and immune responses on the other hand [7].

By focusing on *C. gigas*, we propose here to give cellular and molecular insights into the oyster antimicrobial defense system considering the genetic background of individuals.

## 2. Effectors of the antimicrobial defense

Oyster immunity involves not only hemolymph-mediated reactions, but also immune effectors produced by epithelial cells from various organs, including gills, mantle, digestive gland and intestine, which participate in the antimicrobial defense mechanisms.

### 2.1. Plasma proteins

As oysters have a semi-open circulatory system, hemolymph is typically an important interface between the immune system and the microorganisms that enter the oyster body. The oyster hemolymph is devoid of clotting reaction by means of plasma gelation but the hemocytes display remarkable spontaneous reaction of aggregation resulting in cellular clot [8]. Aggregation is reversible, the hemocytes can further disperse and re-enter the circulating system. In vitro hemocyte aggregation has been shown to be inhibited by recombinant tetraspanin [9] which participates to cell-adhesion molecular complexes of mammalian white cells. To date, no respiratory protein has been characterized in Ostreoidae bivalves but strikingly, the oyster plasma is characterized by the over representation of proteins that present homologies with extracellular metalloenzyme Superoxide Dismutases (EcSODs). Named dominin [10], cavortin [11] or EcSOD [12,13], these proteins could belong to a complex family of multifunctional molecules [5]. For instance, one member of this family, Cg-EcSOD, has LPS-binding properties and acts as an opsonin for pathogenic vibrios (see below) [13,14]. To date, there is no compelling evidence that all SOD-related proteins retained SOD activities [10,11]. Thus, these circulating proteins may play major roles, even now underexplored, in the interplay with the oyster hemolymph microbiota but also in the antimicrobial defense reactions, by mediating microbe recognition and promoting phagocytosis.

### 2.2. Oyster hemocytes

The hemocytes (blood cells) are immunocompetent cells but they are also involved in many physiological processes such as wound and shell repair, nutrient transport and digestion, gonad resorption. As the oyster circulatory system is semi-open, hemocytes are not confined to the vessels and they invade or reside in many other tissues [15]. Thus, infiltrating hemocytes are present in all cavities, tissues and epithelia of oyster body where they can also fulfil defense functions. The term hemocytes refers to a diversity of circulating cells that is best highlighted by the lack of unified classification, although they have been extensively studied since early 1970's. Indeed, the lack of molecular and functional genetic tools has precluded any in-depth characterization of cell lineage ontogeny and discrimination of functionally distinct cell types.

#### 2.2.1. Hemocyte lineage

Although a clear definition of distinct cell types is still missing, a consensus about three main cell populations, i.e. blast-like cells, hyalinocytes and granulocytes, appears in the literature as they can be distinguished either by microscopy or flow cytometry analyses [15,16]. Among hyalinocytes, also named agranular cells, a subset of professional phagocytes, which are sometimes described as macrophage-like cells, harbor a potent phagocytosis activity; they account for 30e40% of the total populations of hemocytes [14].

Attempts to define cell lineages and functional subsets have been reported using classical May-Grünwald Giemsa (MGG) staining, peroxidase or phosphatase staining, electron microscopy, or flow cytometry analyses [16e19]. From works in the different oyster species, some authors reported basophile and eosinophile granulocytes similar to their mammalian counterparts [16]. Other authors have drawn hypothesis of a cell maturation process in one single lineage from blast-like cells, hyalinocytes to granulocytes [20]. Hence the different hypotheses range from one unique lineage to numerous functionally distinct cell types from different lineages [16,20]. One caveat for most of these different reports is that most of the tools that have been used so far for hemocyte characterization were developed to analyze mammalian blood cells (like the MGG staining for example) and thus have to be interpreted with caution in other species. Another caveat is that depending on the maturation stage or the functional activities of one cell type, the cell morphologies and physico-chemical characteristics may change, as for example the internal complexity of professional phagocytes that increases upon phagocytosis when analyzed by flow cytometry. Altogether, the actual number of cell lineages and functionally specialized subsets of hemocytes remain to be carefully examined and accurately determined.

#### 2.2.2. Hematopoiesis





As for the distinction of the different cell types, the ontogeny of oyster hemocytes remains to be fully characterized. Different hypotheses about their hematopoietic origin have been elaborated over the past decades. Cheng (1981) proposed that hemocytes could originate from the differentiation of connective tissue cells [17]. Tirapelle and colleagues (2007) described that the expression of Cg-tal (Tal1/SCL) [21], a family of transcription factors involved during embryonic hematopoiesis in vertebrates [22] was only detected in cells emerging from blood vessel endothelium, which is reminiscent of the hematopoietic cell emergence from the hemogenic endothelium in vertebrate embryos [23,24]. More recently, a study from Jemal and colleagues (2014) using BrdU to localize mitotic cells within the oyster tissues suggested that some hemocyte progenitors emerge from particular structures at the basement of the gill epithelium [25], which is reminiscent of assumptions made earlier by Cuvier in 1891 [26]. Altogether, this sum of potentially contradictory pieces of work highlights the lack of knowledge about hematopoiesis in oysters and more largely in bivalves. Although the recent progress in molecular biology has dramatically advanced our knowledge on the immune-function of hemocytes, little is known about oyster hemocyte life cycle and cell lineage origin. This discrepancy is probably due to the lack of dedicated molecular tools for cell lineage analysis and/or the lack of long-term cell culture systems for studying cell differentiation and maturation. Such tools gave access to a comprehensive knowledge of hematopoiesis in other animals from *Drosophila* to human. The recent release of the full *C. gigas* genome should help to develop the required tools.

### 2.3. Antimicrobial peptides/proteins (AMPs)

Several gene-encoded antimicrobial peptides and proteins (AMPs) sharing common molecular features with AMP families described in other kingdoms of life have been characterized in oysters (Table 1). These host defense effectors are usually small cationic (less than 10 kDa), amphipathic peptides showing a broad diversity of amino acid sequence and structural conformations [27,28]. However, some large cationic proteins with antimicrobial properties have also been described (Table 1). Based on common structural features or conserved sequence motifs characteristic for AMP families, oyster antimicrobials have been classified as



**Table 1**  
Antimicrobial peptides and proteins from the oysters *C. gigas* (Cg) and *C. virginica* (Cv).

AMP family	Name	Localization	Expression (microbial challenge)	3D structure	Antimicrobial activity	References
<b>Cationic antimicrobial peptides</b>						
Defensins	Cg-Defm	Mantle	Constitutive		Gram (b)/nM range (MIC)	Gueguen et al., 2006
	Cg-Defh1/-2	Hemocytes	Constitutive		Gram (b)/nM range (MIC)	Gonzalez et al., 2007 Duperthuy et al., 2010
	AOD (Cv)	Gills	ND	ND	Gram (b)/nM range (MEC) Gram (b)/nM range (MEC)	Seo et al., 2005
Proline-rich peptides	Cg-IgPrp	Hemocytes	Repressed	ND	Synergistic activities on Gram (b) and Gram (b) <sup>b</sup>	Schmitt et al., 2012
	Cg-stPrp					
Big defensins	Cg-BigDef1,	Hemocytes	Induced		ND	Rosa et al., 2012
	-2 Cg-BigDef3	Hemocytes	Constitutive			
Molluscidin	Cg-Molluscidin	Mantle Gills	Constitutive	ND	Gram (b)/nM range (MEC) Gram (b)/nM range (MEC)	Seo et al., 2013
<b>Cationic antimicrobial proteins</b>						
Bactericidal/permeability increasing proteins	Cg-BPI/-2	Hemocytes Epithelia	Induced Constitutive		Gram (b)/nM range (MIC)	Gonzalez et al., 2007
Macrophage expressed gene 1 like protein	Cg-Mpeg1	All tissues	Constitutive	ND	Gram (b)/nM range <sup>c</sup> Gram (b)/nM range <sup>c</sup>	He et al., 2011
<b>Multifunctional proteins displaying antimicrobial activities</b>						
Ubiquitin	Cg-Ubiquitin	Gills (infiltrating hemocytes?)	Induced?		Gram (b)/nM range (MEC) Gram (b)/nM range (MEC)	Seo et al., 2013
Histones	Cv-H2B	Gills	ND	ND	Gram (b)/nM range (MEC) Gram (b)/nM range (MEC)	Seo et al., 2011
	Cg-H1/H5	Gills (infiltrating hemocytes)	ND	ND	Gram (b)/nM range (MIC) Gram (b)/nM range (MIC)	Poirier et al., 2014

Antimicrobial activities are expressed as Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) or Minimal Effective Concentrations (MEC).

ND ¼ not determined.

<sup>a</sup> Three-dimensional structure of Cg-Defm [PDB: 2B68].

<sup>b</sup> Synergistic activity with Cg-Defm and Cg-BPI.

<sup>c</sup> Three-dimensional structure of horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) big defensin [PDB: 2RNG] (Kouno et al., 2008).

<sup>d</sup> Predicted structure of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) [PDB: 1BPI] (Beamer et al., 1998).

<sup>e</sup> Partial growth inhibition at ~1 nM.

<sup>f</sup> Predicted structure of Cg-Ubiquitin according to mouse Tab2-Nzf [PDB ID: 3A9] (Vijay-Kumar et al., 1985).

defensins, big defensins, proline-rich AMPs and bactericidal/permeability-increasing (BPI) proteins. More recently, two molecules with antimicrobial activities, the Macrophage expressed gene1-like protein and the Molluscidin peptide have also been characterized in oysters. An overview of the characteristics of the main oyster antimicrobials is proposed in Table 1 and their amino acid sequences are presented in Table 2.

### 2.3.1. Defensins (Cg-Defm)

Defensins are by far the best described AMPs from oysters. Since their first isolation from mussels [29,30], defensins have been identified in diverse species of mollusks. The first defensin characterized in oysters has been purified from acidified gill extracts of the American oyster *Crassostrea virginica* [31]. Then, in *C. gigas*, three representative members of defensins have been identified by genomic approach as expressed in the mantle epithelia, Cg-Defm [32], and in the hemocytes, namely Cg-Defh1 and Cg-Defh2 [33]. A broad diversity of defensin sequences was found in *C. gigas* (see "AMP genomic diversity and evolution" section below).

**Gene organization.** Each Cg-Def is encoded by a separate gene with different genomic organization. The mantle defensin genes (Cg-defm) display two structures, (i) two exons separated by a unique intron [32], a genomic organization similar to that of the mussel and scorpion defensin genes [34], and (ii) three exons separated by two introns. Hemocyte defensin genes (Cg-defhs) only display the latter structure, in which the second intron

separates the two last residues of the mature peptide apart from the rest of the sequence [35].

**Precursors.** All oyster defensins are expressed as precursors consisting in a hydrophobic signal peptide (prepeptide) immediately followed by the 4.6e4.7 kDa cationic mature peptide (pI 8.5e8.7). The absence of specific sorting/retention signal suggests defensins are secreted outside the cells.

**Structure.** Mollusk defensins are small (4e5 kDa) cationic molecules containing six to eight cysteine residues engaged in three to four intramolecular disulfide bridges. They are all predicted to contain an  $\alpha$ -helix linked to an antiparallel two-stranded  $\beta$ -sheet by disulfide bridges, making the so-called cysteine-stabilized  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet motif (CS $\alpha\beta$ ) [36]. The American oyster defensin (AEO) isolated from *C. virginica* [31] contains 6 cysteines whereas in *C. gigas*, only defensins with eight cysteines were found [32,33,35]. The tridimensional structure of a mantle defensin from *C. gigas* (Cg-Defm) was solved, showing that the CS $\alpha\beta$  motif is indeed stabilized by four disulfide bridges (cysteine pattern: C1e5C2e6C3e7C4e8) [32]. The fourth disulfide bridge is a unique feature from mollusk defensins. It has been proposed to be implicated in the stabilization of the mature peptide to the high osmolarity environment found in the sea water [37].

**Antimicrobial activities and mechanism of action.** The *C. virginica* defensin was shown to be active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Thus, in a so-called ultra-sensitive radial diffusion assay (URDA), the Minimal Effective Concentration (MECs) of AEO were below 3.5 nM [31]. Until

**Table 2**  
Amino acid sequences of most representative variants of *C. gigas* antimicrobial peptides and proteins. Sequences correspond to the mature peptides. The number of amino acids (aa), molecular weight (kDa), and estimated isoelectric point (pI) of the molecules are indicated on the right of each sequence.

AMPs	Amino acid sequences	No aa	Mass (kDa)	pI
Defensins				
Cg-Defh1	GFCCPRDQYKCNHSHCSIGCRAGYCDAAVTLWLRCTCTDCNGKK	43	4.76	8.50
Cg-Defh2	GFCCPGDQYECNRHCRSIGCRAGYCDAAVTLWLRCTCTCGSGKK	43	4.67	8.51
Cg-Defm	GFCCPGNQLKCNHCKSISCRAGYCDAAVTLWLRCTCTDCNGKK	43	4.64	8.73
Big defensins				
Cg-BigDef1	QAQALLPIASYAGLTVSAPVFAALVTVYGAALVYRNYRIRRENSYQRKSDHSHSCANNRGWCRPTCSHEYTDWFNNDVCGSYRCRPRGRSG	94	10.70	9.06
Cg-BigDef2	QAQALLPIASYAGLTVSAPVFAALVTVYGAALVYRNYRIRRENSDHDHSHSCANNRGWCRPTCSHEYTDWFNNDVCGSYRCRPRGRSG	87	9.85	8.61
Cg-BigDef3	QAQALLPIASYAGLTVSAPVFAALVTVYGAALVYRNYRIRRENSDHDHSHSCANNRGWCRPTCSHEYTDWFNNDVCGSYRCRPRGRSG	87	9.77	8.84
Proline-rich peptides				
Cg-IgPp	GPIRRPRPRPRPE	15	1.80	12.18
Cg-siPp	GPIRRPRPRRPE	13	1.55	12.00
Bactericidal/permeability increasing proteins				
Cg-BPI	KTPGLQTRITDRALAYEVAIDILSKQVGGQIPDQHQSGDVKFDTGTMNFKQFTKSSRSVLQNVGLSWSTGTGLAIHGDPKYKRRK GIKISDHSDFDKANGINFOIKIEGMDGTGRPTMKAAGCNCVGSADIKHGGAAWYINLFSQLEKIKDMVGGNGILCKQLNLTLD VNGMKSILQKLPVTVQIARRFLDYRHSKSPFQTKFMEYTHKGEVYVAVPVDAPFAAPPLIKSSDTSRMMYIWLSDYVFNMTSYNAIK YNQLYNNKIDLPVSGVNLNITPQSTCGIKIAGTKPNTVMYMKSTSPNMTAQNGSTVYVNASGDVFFAQPPGKTYFLTL SATMSTLISLMIEKNEKFAKVLKLPISVTVKDSKIPVSPGLNHFVYKLVSVFVPEKINELGAAAGPPLVINSVHFINTLTLVAKDILLADLKYSG KNPGLKSRITSGNLNAYAVVALDVLKSDITKKAIPDQHDKSGSVSYDITGMKTKFTPTSTVSLQPGGLMWRTSINDIGLHGDHFHYKY KKGIRISDHGRFDLITSGITIAINLKGMSDGRPTISSSTCSVRSSTGKIFGGRAWYINLFRGKVKAKKLSIEGENGLLC KQLTKLVNVDGARLKAQLPVSVEARFLLDYSFKSAPASSGFMEYTHKGEVYVYGGHGNIPDFAPPLPAGSSSKMVLVWLSDFLNTMS YTAFSHGLTYNVDKNIPGHLNITCKNMGCKGPKGQMPFNQVMLNLSKSTMPNMFNAITKYDADGEIKFYATKGGKVDYFL TLSANMSTISITVNEKVFARVLKLPINVHVKDSKIGHLEDFEMLNFVKKIITTFVEPKLNELGNGPPLPIGSGVHFANTEILLHQNS ILLATDVKYLYQ	458	50.14	9.37
Cg-BP2		457	50.3	9.74

now, native defensins could not be purified from *C. gigas* tissues in sufficient amounts to enable complete biochemical characterization and determine their spectrum of activity. Antibacterial and antifungal activities of Cg-Defensins were studied with recombinant peptides [32,38]. All oyster defensins were shown to be mainly active against Gram-positive bacteria against which they displayed low to very low minimal inhibitory concentrations (MICs) in the range of 0.01e6 mM. Conversely, they did not display significant antimicrobial activity against Gram-negative bacteria including oyster pathogens (MICs >10 mM). This is likely due to their capacity to strongly inhibit peptidoglycan biosynthesis [38], which is readily accessible at the cell wall of Gram-positive bacteria and hidden by the outer membrane of Gram-negative bacteria. Studies on *Staphylococcus aureus* showed that antibacterial activity is observed in absence of membrane disruption and results from the high affinity binding of Cg-Defensins to the cell wall precursor lipid II [38]. Interestingly, at high concentrations (10 mM and above), Cg-Defensins can also present membrane-disruptive properties as observed against the Gram-negative *Vibrio tasmaniensis* LGP32 [39].

### 2.3.2. Big defensins (Cg-BigDefensins)

Big defensins (BigDefensins) are antimicrobial polypeptides (8e11 kDa) only found in marine invertebrates (Arthropoda, Mollusca and Cephalochordata) [40]. They are cationic molecules with pI ranging from 8.6 to 9.2. The first BigDef was purified from the hemolymph cells (amebocytes) of the horseshoe crab *Tachyporus tridentatus* (Chelicerata) [41]. In *C. gigas* oysters, BigDef homologues were identified more recently through a genome-wide transcriptomic study [40]. Oyster big defensins (Cg-BigDefensins) form a diverse family of AMPs composed of three representative members, namely Cg-BigDef1, Cg-BigDef2 and Cg-BigDef3. In *C. gigas*, Cg-BigDef expression is restricted to hemocytes, both circulating and infiltrating oyster tissues.

**Gene organization.** Each of the three Cg-BigDefensins is encoded by a separate gene. The genomic organization of Cg-bigdef1 and Cg-bigdef2 genes is similar, with two exons interrupted by a single intron. In contrast, in Cg-bigdef3, additional intron and exon are observed upstream the first exon common to the other Cg-bigdefensins. In all Cg-bigdefensin genes, the defensin domain is exclusively encoded by the last exon [40].

**Precursors.** Oyster big defensins are expressed as prepropeptides, which start with a predicted 23-residue signal peptide (prepeptide), followed by a propeptide region of 13 residues and a cationic 94- or 87-residue mature polypeptide of 10.7 kDa (Cg-BigDef1), 9.8 kDa (Cg-BigDef2) or 9.7 kDa (Cg-BigDef3). Similarly, in the horseshoe crab, BigDef is produced as a precursor molecule that is further processed into a 8.6 kDa mature polypeptide [41].

**Structure.** The solution structure of the horseshoe crab BigDef is the only one available to date. It showed that big defensins are composed of an N-terminal globular and hydrophobic domain connected to a C-terminal domain containing  $\beta$ -sheet structures and folded by three disulfide bridges. Interestingly, the arrangement of the disulfide bridges is identical to that of vertebrate  $\beta$ -defensins ( $\beta$ -defensin domain: C<sub>1-5</sub>C<sub>2-4</sub>C<sub>3-6</sub>) [42]. Based on mass spectrometry data, it has been proposed that oyster big defensins undergo post-translational modifications like the conversion of the N-terminal glutamine residue of the native Cg-BigDef1 into a pyroglutamic acid [40].

**Antimicrobial activities.** The antimicrobial activities of oyster BigDefensins have not been characterized to date. However, in

another bivalve mollusk, *Argopecten irradians*, BigDefs were reported to be active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi [43] as well as in the horseshoe crab *T. tridentatus*, where, the native BigDef was also shown to display a significant LPS-binding activity [41].

### 2.3.3. Proline-rich peptides (Cg-Prps)

Proline-rich AMPs (PrAMPs) have been identified in vertebrates including mammals and amphibians as well as invertebrates such as insects and crustaceans. They form a group of diverse peptides that display a high content in proline and arginine residues (typically from 25 to 50%). They display short ProeArg motifs, which have been proposed to be implicated in their antimicrobial activity. PrAMPs are also characterized by their mode of action, which usually does not involve the lysis of bacterial membranes but rather the penetration into Gram-negative bacteria by translocating into the cytoplasm via a permease/transporter-mediated uptake. Thereby, many PrAMPs act by interfering with essential cellular functions intracellularly [44]. In *C. gigas* oysters, a cDNA sequence showing homologies to PrAMPs was identified as expressed in hemocytes [45]. A high number of Cg-Prp (*C. gigas* proline-rich peptide) forms were then identified as expressed by oyster hemocytes. They display two lengths (16 or 18 amino acids), with shorter peptides differing from the original Cg-Prp by the deletion of a conserved ProeArg motif [35]. Consequently, the original form was renamed as long Cg-Prp (Cg-IgPrp; 1.8 kDa) and the new form as short Cg-Prp (Cg-stPrp; 1.5 kDa) [46]. Cg-Prps are highly cationic peptides with a theoretical pI of 12e12.1.

**Gene organization.** Cg-Prps are a multigenic family with genes containing or not an intron. The presence/absence of an intron is observed in the genes encoding both the long and short peptide forms.

**Precursors.** PrAMPs from *C. gigas* (Cg-Prps) derive from 59 to 62 amino acid precursors composed of an N-terminal signal peptide followed by an acidic region (putative propeptide) and a C-terminal cationic proline-rich region, containing two repetitions of a ProeArg motif [45]. This organization is conserved in all precursors of Cg-Prps [35].

**Antimicrobial activities.** Native Cg-Prps could not be purified from oyster hemocyte extracts until now. Therefore, synthetic Cg-Prps were used to explore their spectrum of antimicrobial activity. Both long and short Cg-Prps were poorly active against Gram-positive bacteria and were not active against Gram-negative bacteria. However, Cg-IgPrp displayed strong synergy with Cg-Defs and Cg-BPI against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [45,47]. The underlying mechanisms remain unexplored.

### 2.3.4. Cg-Molluscidin

Besides the well-known AMP families mentioned above, a novel antimicrobial peptide has been purified for the first time from the gills of *C. gigas*. It does not show sequence homology with already known AMPs. This 5.5 kDa peptide, which shows a calculated pI of 11.28, was named Cg-Molluscidin [48]. Cg-Molluscidin transcripts were found predominant in oyster mantle tissue, then in gills and other organs, but it is likely that Molluscidin could be expressed by infiltrating hemocytes. No data are yet available on gene organization of this new AMP.

**Precursor.** Native Cg-Molluscidin (55 amino acids) was shown to derive from a precursor molecule by the only elimination of its N-terminal methionine. This precursor is devoid of signal

peptide or anionic proregion. From the mass spectrometry data, the native Cg-Molluscidin would not undergo any further posttranslational modification [48].

**Structure.** The primary structure of Cg-Molluscidin is characterized by a high percentage of two residues, Ala (15) and Lys (23). The sequence is organized in 10 dibasic residue repeats including LysineeLysine or LysineeArginine and separated by hydrophobic amino acids, Ala (15 amino acids), Val or Gly [48].

**Antimicrobial activities.** Native Cg-Molluscidin was shown to be active against both Gram-positive bacteria in a so-called ultrasensitive radial diffusion assay (URDA). Under these conditions, the Minimal Effective Concentration (MECs) of Cg-Molluscidin was in the range of 1.3e31.3 µg/mL against Gram-positive bacteria and 0.4e2.3 µg/mL against Gram-negative bacteria including *Vibrio parahaemolyticus*. No antifungal or hemolytic activities were recorded for Cg-Molluscidin [48].

### 2.3.5. Bactericidal/permeability increasing protein (Cg-BPI)

Bactericidal/permeability-increasing proteins (BPIs) and lipopolysaccharide-binding proteins (LBPs) are components of the immune system that have been mainly characterized in mammals. Although highly similar (45% sequence identity), only BPIs display antimicrobial activity. By genomic approaches, LBP/BPI-related genes have been found in a number of non-mammalian vertebrates, invertebrates like nematodes and mollusks, and protists [49]. A homologue of the human BPI (hBPI) protein with a calculated molecular mass of 50.1 kDa, was identified in *C. gigas* oysters by a screening of a hemocyte EST library [50]. Cg-BPI expression is constitutive in oyster epithelia and induced by microbial challenge in oyster hemocytes [50]. More recently, a homologue of Cg-BPI named Cg-BPI2 was also identified in a *C. gigas* hemocyte EST library [51]. It shares 56.4% amino acid identity with Cg-BPI. It was proposed to originate from Cg-BPI by gene duplication but it would follow a distinct expression pattern [51]. To date, Cg-BPI gene organization has not yet been determined.

**Precursors.** Cg-BPI is expressed as a precursor protein composed a 19-residue signal peptide followed by the mature protein [50]. Cg-BPI2 displays the same organization of Cg-BPI precursor, with a 22-residue signal peptide, followed by the mature protein [51].

**Structure.** As deduced by molecular modeling, Cg-BPIs display the typical structural features of hBPI with an N- and C-terminal b-barrel type domains connected by a proline-rich central domain [50,51]. The N-terminal domain of Cg-BPI contains the LPS-binding regions characterized in hBPI and the Lys and Arg residues required for LPS-binding. This domain also contains the cysteine bridge of hBPI at conserved position, three extra cysteine residues being identified (both in the N- and C-terminal domains) whose folding remains unknown [50].

**Antimicrobial activities and mechanism of action.** The full-length recombinant Cg-BPI was shown to be a monomeric protein (50.1 kDa) highly active against the short-chain LPS *Escherichia coli* strain SBS363, against which it displayed bactericidal activity. It was 30 times less active against the long-chain LPS *E. coli* ML35. Consistent with its spectrum of activity directed against Gram-negative bacteria, recombinant Cg-BPI displayed both LPS- and Lipid A-binding activities. Like hBPI, it permeabilized the cytoplasmic membrane of *E. coli* ML35 [50]. The activity of the recombinant Cg-BPI2 N-terminal b-barrel domain was also shown to be exclusively active against Gram-negative bacteria [51]. Thus, like in human BPI, the N-terminal domain of *C. gigas* BPIs is sufficient for its antibacterial activity.

### 2.3.6. Macrophage expressed gene 1-like (Cg-Mpeg1)

Lastly, a macrophage expressed gene 1-like protein has been identified in *C. gigas* by a genomic approach (GenBank: EF627979; HQ228218) and proposed to have antimicrobial properties [52]. The Cg-Mpeg1 (81.8 kDa) is a member of the membrane attack complex and perforin (MACPF) protein superfamily, a large group of pore-forming proteins widely conserved in the animal kingdom from mammals to low vertebrates. Cg-Mpeg1 shows 47e48% identity with three abalone (gastropod) Mpeg1 sequences [53] and, 39% and 35% identity with sequences from mammals and sponges, respectively [52]. Cg-Mpeg1 would be constitutively expressed in various tissues of healthy oysters and Cg-Mpeg1 transcripts were predominantly detected in gonads and gills [52]. Gene organization remains to be determined.

**Precursor.** Cg-Mpeg1 is encoded as a putative 752 amino acid precursor carrying an N-terminal signal peptide of 19 amino acids.

**Structure.** The Cg-Mpeg1 mature protein is predicted to contain a membrane-attack complex/perforin (MAPCPF) domain and a C-terminal transmembrane segment [52].

**Antimicrobial activities.** A sequence of Cg-Mpeg1 including the MACPF domain has been expressed in *E. coli* system. The recombinant MACPF domain could inhibit the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Vibrio alginolyticus* [52]. It is unknown whether Cg-Mpeg1 creates membrane damages in bacteria.

## 2.4. Other antimicrobial molecules

### 2.4.1. Lysozymes

Lysozymes are cationic hydrolytic enzymes widely distributed in the animal kingdom and found in a variety of cells, tissues and secretions from bacteria to humans. After being considered for a long time as hydrolytic enzymes involved in the degradation of bacteria cell wall, lysozymes are now considered as antimicrobial proteins. Bivalve lysozymes are members of a large family of proteins, referred to as invertebrate-type lysozymes [54]. These enzymes are believed to be involved in host defense due to their lytic properties on the peptidoglycan, the major component of the bacterial cell wall. However, this property could also be used by some lysozymes for digestive functions in oysters [55,56]. In *C. gigas*, lysozyme activities were reported in gills, mantle and digestive diverticula [57], then different lysozymes sequences have been identified in *C. gigas* by genomic approaches. Three lysozyme cDNAs have been characterized in *C. gigas*. CGL-1, -2 and -3 are encoded by 530-536-bp cDNA sequences with an open reading frame of 429-bp deducing 142 amino acid residues [58,59]. The precursors carry an N-terminal signal peptide of 20 amino acids. Comparatively in *C. virginica*, cv-lysozyme 3 cDNA was identified as 663-bp sequence with a 564 bp open reading frame encoding 187 amino acids [56]. A predicted signal peptide was 18 amino acid residues.

Three different genomic sequences coding for lysozymes can be found in *C. gigas* genome scaffolds (GenBank: JH816436, JH816734, JH819154), confirming that lysozymes comprise a multigenic family. Lysozyme expression has been detected and localized in digestive cells of digestive tubules, gills and mantle [56,58,60,61]. However, CGL-1 was shown to be differentially expressed in hemocytes following *C. gigas* infection with the pathogenic *V. tasmaniensis* LGP32 compared to a non-virulent one [62]. Besides, lysozyme activity has been shown to increase in hemolymph following a co-stimulation of LPS and an oyster recombinant tumor necrosis factor, rCg-TNFI [63]. Altogether, these results support a role of lysozyme in the oyster antimicrobial defenses, which

requires to be further investigated. Indeed, based on in vitro activity of recombinant CGL-1 and -3, lysozymes seems to display a weak activity (10e40 mg/mL) specifically against Gram-positive bacteria.

### 2.4.2. Cg-Ubiquitin

Ubiquitin is a structurally conserved polypeptide found in almost all tissues of eukaryotic organisms that regulates several processes, the most widely recognized being protein degradation [64]. Thus, in an essential function, ubiquitin molecules are covalently attached to target proteins for their subsequent degradation via the proteasome. Several additional functions of vertebrate ubiquitins have been described, such as alteration of cellular location, stability or activity of the target proteins, and lately, antibacterial and antifungal activities [65,66].

In oysters, the antimicrobial activity of ubiquitin has been recently reported [67]. Cg-Ubiquitin was purified from acidified gill extracts of *C. gigas*. The polypeptide had a molecular weight of 8.4 kDa and the N-terminal region is identical to ubiquitin sequences reported from other species. Cg-Ubiquitin transcripts were found to be expressed at high level in the mantle tissue, and to a lesser extent in gills, digestive gland, adductor muscle and labial palps [67]. Cg-Ubiquitin is encoded as a 76 amino acid precursor fused to the ribosomal protein S27. The precursor included a six amino acid motif and three conserved lysine at the functional sites, which might participate in the formation of the ubiquitin-protease complex. Cg-Ubiquitin also displays an 80-amino acid carboxyl ribosomal protein S27 extension with a classical zinc finger motif [67]. By homology modeling, Cg-Ubiquitin was deduced to display three secondary structural motifs, including three  $\alpha$ -helices and four  $\beta$ -strands separated by 7 loop regions. The C-terminal region of the Cg-Ubiquitin mature polypeptide terminated with an Arg residue instead of a GlyeGly doublet, characteristic of ubiquitin molecules in other species [67].

The purified Cg-Ubiquitin was shown to be active against Gram-positive (MECs, 3.4, 7.8 and 40 mg/mL) and Gram-negative bacteria (MECs, 1.9e12.0 mg/mL) using the ultrasensitive radial diffusion assay (URDA) developed by the authors. Cg-Ubiquitin was bacteriostatic and did not permeabilize the bacterial membranes. No antifungal or hemolytic activities were observed for this polypeptide [67].

### 2.4.3. Histones

Histones play an essential architectural role in chromatin formation and their post-translational modifications play a key role in gene regulation. Since 1942 [68], histones have also been shown to carry antimicrobial activities against a wide range of pathogens including Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, virus and protozoa [69]. These proteins and their derivative peptides have shown a wide range of actions in antibacterial processes, including permeabilization of bacterial cell membrane, binding to bacterial DNA and/or RNA [69], and neutralization of the LPS toxicity [70]. Recently, H2B histones active against Gram-positive and Gram-negative bacteria strains have been isolated from the American oyster *C. virginica* [71]. Similarly, antimicrobial H1-delta and H5 histones have been purified from gills of *C. gigas* oysters injured or infected with the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 [72]. They showed potent antimicrobial activities against several strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria with MICs below 0.7 mM. Moreover, in response to infection by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*, the abundance of H4, H3.3 and H2B histone transcripts increased in total extract of *C. virginica* gill tissue [73]. Similarly, histone H4 protein levels of *C. virginica* appeared to increase in hemocyte lysates and extracellular hemolymph of oysters infected by *P. marinus* [74]. Finally, antimicrobial histones of *C. gigas* accumulated in gills after injury and infection while they



were absent from gills of unchallenged oysters [72]. This phenomenon correlated with a massive infiltration of hemocytes in the gills of infected oysters. Altogether, these studies support a role of histones in the antimicrobial defense of oysters. In agreement, release of extracellular histones was recently associated to a novel defense reaction in oyster referred to as ETosis [72] (see hemocyte reactions below).

### 3. The antimicrobial response to infection

The oyster antimicrobial response to infection needs to be reconsidered with the recent evidence that these bivalves naturally host diverse and abundant microbial communities [1] that may contribute to homeostasis, host protection and fitness in rapidly changing environments [75]. In a view similar to that of the interaction between the mammalian gut immune system and the abundant and diverse intestinal microbiota, the existence in oysters of an abundant microbiota associated to its epithelial surfaces and hemolymph questions about the modulation of the immune response. How is the equilibrium between bacteria and healthy oysters maintained? How are the oyster antimicrobial responses to opportunistic pathogens triggered and regulated? This leads to interesting tracks of reflection on the meaning of the "self versus non-self" theory in immunity [76] as well as on the fine-tuning of the interplay between the immune system and microbial organisms [77].

With the development of genomic studies, significant breakthroughs have been achieved in the identification of immune-related genes involved in defense mechanisms including recognition, cell signaling and cell communication that are known to activate or trigger cell-mediated reactions such as phagocytosis and production of antimicrobial molecules [5,62,78]. In particular, various elements of the Rel/NF- $\kappa$ B pathway have been described in oyster to be involved in immune response [79e82] (see also this issue Yu), but still, we have no evidence that this pathway controls the regulation of oyster AMP expression. Nonetheless, differences have to be expected with the best described invertebrate, *Drosophila*, in terms of AMP regulation. Indeed, most of the knowledge on the signaling pathways controlling AMP expression has been acquired in *Drosophila*, which has an almost sterile hemolymph. Unlike in *Drosophila*, oyster AMPs appear to be predominantly constitutively expressed by hemocytes and epithelia. Moreover, the release of peptidoglycan and other microbe associated molecular patterns (MAMPs) by its abundant microbiota does not trigger an overwhelming of the immune system. To date, it is unknown whether those AMPs whose expression is induced by infection are induced by specific signals released by pathogens or by an overload of MAMPs in the oyster blood stream and tissues.

#### 3.1. Involvement of AMPs in the response to infection

Whereas genomic approaches developed from various oyster tissues have greatly contributed to progress in the characterization of AMPs in oysters, it is noteworthy that these studies do not provide clear understanding on the regulation of expression and function of these immune effectors. As in oysters, most of the known AMP families are expressed by hemocytes that migrate to infection sites and infiltrate tissues [47], monitoring AMP expression in tissues, i.e. differentiating AMP transcription/translation in tissues from infiltration of tissues by AMP-expressing hemocytes, is a particularly challenging task that requires the use of immunohistochemistry and/or in situ hybridization. Currently, such data are available for defensins, big defensins, Prps and BPI, while, to date, Mpeg-1 and Molluscidin expression has only been monitored in tissue extracts (usually by quantitative PCR).

#### 3.1.1. AMPs in healthy oysters

In oysters, antimicrobial proteins and peptides are mainly constitutively expressed (Table 1). By using in situ hybridization Cg-defhs, Cg-prps and Cg-bigdef3 were shown to be expressed in hemocytes where, comparatively, transcripts of Cg-BPI and Cg-Big-def1 and -2 were barely detected. Cg-defm was expressed in mantle only while Cg-bpi was expressed in epithelia of a broad series of organs [47]. Besides, Cg-molluscidin transcripts have been detected by PCR in mantle, gills and labial palps and at lower levels in digestive glands and adductor muscles of healthy oysters, but no data is available on hemocytes [48]. Finally, Cg-mpeg1 would be constitutively expressed in the same tissues, the highest level of transcripts being detected in gills and gonads, then in digestive glands followed by the mantle, heart, adductor muscle and hemocytes [52].

To date, only few data are available on the subcellular localization of AMPs in hemocytes and tissues. Cg-BPI and Cg-Prps appear to be stored in cytoplasmic granules in same hemocytes where Cg-Defhs are also immunocolocalized but uniformly distributed throughout the cytoplasm [32,47]. We recently showed that 40% of total hemocytes express Cg-BPI, although different subsets of hemocytes express it at different levels (Fig. 1). A subset corresponding to 40% of the hyalinocytes express Cg-BPI at a low level and the protein is stored in particular vesicles localized in the Golgi apparatus region. In granulocytes, two different subsets can be identified based on Cg-BPI expression. Most granulocytes express Cg-BPI (65%) with 30% of them expressing it at a high level, and the protein is stored in large cytoplasmic granules in those cells (see Fig. 1 and [47]).

#### 3.1.2. AMPs in diseased and injured oysters

Various infectious and non-infectious challenges have been used to study AMP expression in oysters. Still, most often, injection of bacteria and injury has been used, respectively. By using in situ hybridization and qPCR, Cg-bpi and Cg-bigdef1 and -2 were shown to be strongly induced by bacterial challenge in hemocytes [40,50]. Apart from them, Cg-Mpeg1 was reported to be induced in this tissue, but weakly and only 6 h after challenge [52]. On the contrary, as described above, expression of Cg-defhs and Cg-bigdef3 is not regulated in response to microbial challenge. Injured or infected tissues often show an increase in AMP transcript abundance consistent with their immune function. This increase can be due to the accumulation of AMP-expressing hemocytes. This has been particularly well illustrated for the Cg-Defh-expressing hemocytes following an injection of sea water or bacteria into the oyster adductor muscle. The decrease in Cg-Defh transcript abundance in circulating hemocytes was seen to be concomitant with an increase in their abundance at the site of injury, and to a lesser extent in surrounding tissues of the mantle and gills [47,50]. Interestingly, neither Cg-BPI nor Cg-Prp-expressing hemocytes would migrate towards the injection site. Indeed, Cg-Prp expression seems to decrease in both, circulating and infiltrating hemocytes after a vibrio challenge [47]. Cg-Molluscidin transcript abundance have been reported to increase significantly in gills after microbial challenge with vibrios [48]. However, it is still unknown whether this is due to hemocyte infiltration or tissue expression. Discrepancy in AMP expression and localization following challenge can be observed in literature, mainly due to the omission of the migratory behavior of hemocytes and their abilities to infiltrate oyster tissues where they may aggregate.

Studies on AMP family expression have revealed the existence of different chemotactic behavior among hemocyte populations or between hemocyte developmental stages. Most of all, they highlight (i) the major role of the hemocyte populations in the AMP-mediated defense reactions and (ii) the complexity of this tissue

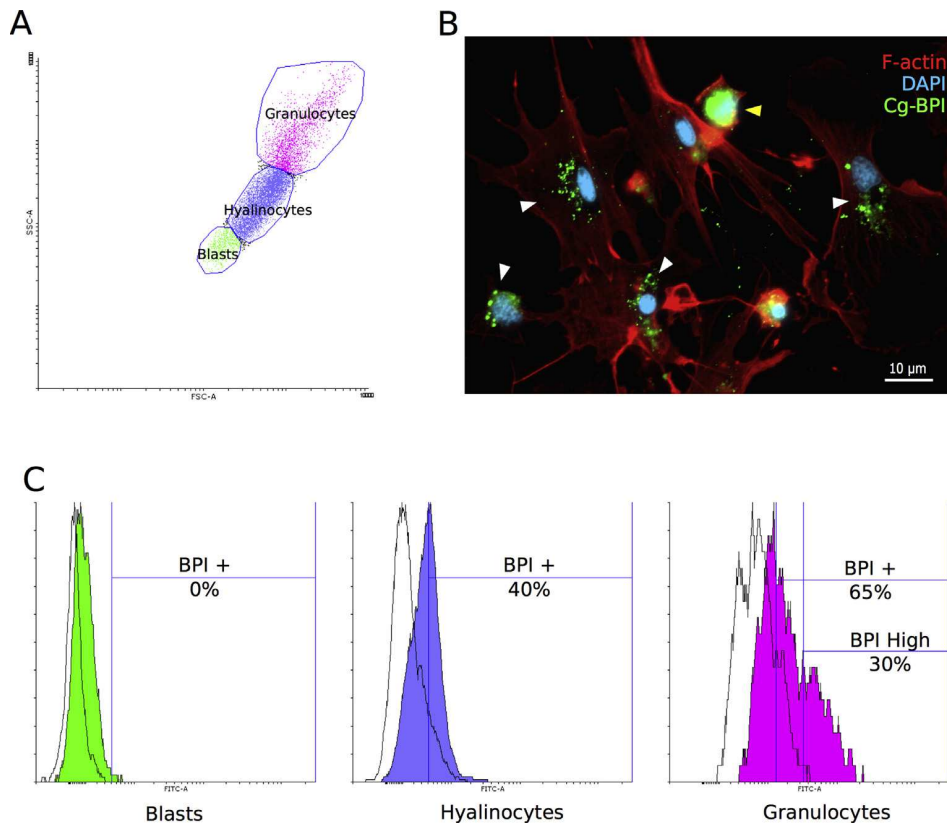


Fig. 1. Bactericidal/permeability increasing protein is expressed at different level by different hemocyte subsets. A. Cytometry analysis of SSC and FSC of hemolymph whole cells reveals the three main cell populations: blasts, hyalinocytes, and granulocytes. B. Immunofluorescent labelling of Cg-BPI protein in hemocytes reveals subset of hyalinocytes and granulocytes with low Cg-BPI content (white arrowhead) and high Cg-BPI content (yellow arrowhead). C. Cytometry analysis of Cg-BPI labelling of each hemocyte populations show that about 40% of all hemocytes express the BPI that correspond to 40% of the hyalinocytes and 65% of the granulocytes. Interestingly among the granulocytes, 30% of them express Cg-BPI at a higher level (BPI-High) than the other granulocytes thus defining two granulocyte distinct subsets for the level of Cg-BPI expression. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in terms of functions and mechanisms of regulation of immune-related gene expression, which could be related to existence of various cell lineages. As an example, while, upon infection, constitutively expressed AMPs like Cg-Defhs and Cg-Bigdef3 are transported through the migratory behavior of hemocytes, Cg-BPI and Cg-Bigdef1 and -2 are strongly transcribed in hemocytes infiltrating tissues [40,50].

Therefore, hemocytes must be seen as vehicles that drive given AMPs toward damaged or infected organs where other AMPs like Cg-Defm and Cg-BPI are constitutively expressed. Thus, AMP colocalization may occur in epithelia of various organs contributing to synergism and to local active antimicrobial reaction. One can assume that synergism takes place also during phagocytosis for AMPs colocalized in some hemocyte populations as reported for Cg-Defhs and Cg-Prps, and for Cg-Defhs and Cg-BPI [45,47]. Indeed, strong synergism against the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 was reported between hemocyte defensins (Cg-Defh1 and -2) and mantle defensin Cg-Defm [47].

One striking feature of oyster antimicrobial defense to infection or injury is the absence of systemic humoral reaction characterized by the massive release or secretion of AMPs into the blood stream. In contrast, great amounts of AMPs are released following microbial infection in many vertebrates. In insects, microorganisms induce the expression of AMPs in epithelial cells and in the fat body, which are immediately and massively secreted in the blood stream [83]. In shrimp, the constitutively expressed penaeidins, which are stored in cytoplasmic granules, are released through an original

phenomenon of intracellular degranulation followed by the lysis of the hemocytes [84]. In mussels, AMPs are released by active degranulation process [85].

The lack of evidence of AMP release in oysters strongly contrasts with their detection in cells and tissues. Such low concentrations of extracellular AMPs support the hypothesis of a controlled antimicrobial defense that enables oysters to host and interact with a beneficial microbiota in its hemolymph and body. It also suggests that AMPs function primarily in hemocytes or epithelial cells. From our current knowledge, the AMP-mediated control of pathogens in oysters is likely based on phagocytosis as described for human neutrophil peptides [86] or mussel mytilins [87] in a process that benefits from the hemocyte migratory behavior. Besides, the constitutive expression of AMPs at surface epithelia may contribute to control the commensal microbiota and confer protection against potential pathogens [88].

### 3.2. Hemocyte reactions

Hemocytes play a central role in the oyster defense, they are able to respond to pathogen invasion or tissue damages through chemotaxis and phagocytosis [15,17]. Their microbicidal activities are based not only on the production of antimicrobial peptides/proteins as discussed above [32,40,50] but also on hydrolytic enzymes [89] and Reactive Oxygen Species (ROS) [90,91]. As described above, the very active recruitment of hemocytes is best highlighted by their massive infiltration in injured and/or infected tissues

[15,72,92]. Hemocyte migration leads to a local concentration of immune effectors believed to prevent host tissue invasion [47].

### 3.2.1. Phagocytosis

One of the best described immune function of hemocytes is phagocytosis of microorganisms (Fig. 2). The central role of phagocytosis in the immune response has been evidenced by (i) the overrepresentation of transcripts of phagocytosis-related genes in hemocytes of oysters surviving infections by virulent vibrio strains as compared to oysters receiving the same doses of a non-virulent strain of vibrio [62], and (ii) by the identification of pathogenic vibrios that either avoid phagocytosis like *Vibrio aestuarianus* 01/32 [93] or resist intracellular killing like *V. tasmaniensis* LGP32 [14]. The phagocytosis avidity of hemocytes is enhanced by opsonisation of the microorganisms by plasma proteins like Cg-EcSOD, which promotes b-integrin-mediated phagocytosis [14]. Concomitant to phagocytosis, hemocytes generate a significant respiratory burst resulting in the production of a variety of intermediate ROS [72,90,91], in a major microbicidal reaction in oysters. The production of ROS relies on NADPH oxidases as well as a trans-membrane enzyme termed DUOX for (DUAL OXIDASE) that were evidenced in the *C. gigas* genomic resource database [94]. The expression of a DUOX-like gene in hemocytes was associated to a successful response of oysters against virulent vibrios [62].

After engulfment of microorganisms, the phagosome undergoes maturation with acidification and sequential fusion with endosomal and lysosomal compartments including granules, which contain diverse families of antimicrobial peptides/proteins [45,47]. The release into the phagosome of microbicidal compounds leads to the rapid neutralization/degradation of the engulfed microorganisms. Among the hydrolytic enzymes that are released into the maturing phagosome, lysozymes are known to play an important role in microbial destruction due to their lytic properties on the peptidoglycan of

the bacteria cell wall [95]. Although unknown to date, it is likely that AMPs and lysozymes stored in hemocyte cytoplasmic granules are delivered to the phagosome to kill phagocytosed bacteria.

### 3.2.2. Extracellular trapping through ETosis

Recent studies have shown that phagocytes from metazoans can control microbes through the release of DNA extracellular traps (ETs) carrying antimicrobial peptides and histones (Fig. 2). Antimicrobial activities of histones have been described since 1942, but the mechanisms facilitating histone release has long remained unidentified. In 2004 Brinkmann et al. described a new antimicrobial mechanism relying on the release by mammalian neutrophils of extracellular DNA networks carrying histones and granular antimicrobial proteins including AMPs and hydrolases [96,97]. Those ETs are able to entrap and eventually kill bacteria, fungi, parasites and viruses [96,98,99]. ET formation depends on ROS production [100], and can be induced by different immunological stimuli including microbe-associated molecular patterns or host inflammatory mediators associated with tissue damage [96,100]. This phenomenon of cell death responding to infection or damage was referred to as ETosis.

Evidence of ETs in the defense of invertebrates including *C. gigas* oysters is only recent [72]. In 2008, a first report on the insect *Galleria mellonella* suggested a role of extracellular nucleic acids in the immune response of invertebrates [101]. Three recent studies on mollusks, crustaceans and cnidarians demonstrated the actual role of ETs in the immune response of marine invertebrates and identified ETosis as a very ancient and evolutionary conserved host defense reaction. In oysters, hemocytes were shown to form ETs associated with antimicrobial histones, rapidly after an exposition to diverse microbial agents or tissue damage both in vitro and in vivo [72]. Similar to vertebrate neutrophils, the formation of ETs by the oyster hemocytes was dependent on the production of ROS [102]. However, unlike in other species, PMA failed to trigger the oxidative burst and the formation of ETs by oyster hemocytes. While in vertebrates ETs are formed mostly by neutrophils, the population of oyster hemocytes able to form ETs in oysters remains to be identified.

## 4. Unexplored functions of oyster AMPs

Until now, the main host defense function recognized for AMPs has been the direct killing of microorganisms. However, over the past years, an abundant literature has shown that AMPs from vertebrates support a broad series of immune functions. Indeed, there is new evidence that they also display immunomodulatory functions involving chemotactic activities, induction and/or inhibition of cytokine production, wound healing and modulation of immune cells responses (reviewed in Ref. [103]). Still, little attention has been paid to the multiple functions of invertebrate antimicrobial peptides. There are already some evidences that mollusk AMPs can serve immune functions other than antibacterial/antifungal, like myticin C from *Mytilus galloprovincialis*, which has antiviral and chemotactic activities [104] in addition to the known antibacterial properties of myticins [105]. However, these functions have been explored in heterologous systems and their role in mollusk defense has not been investigated to date. We review here a series of functions that deserve to be explored to better characterize the immune functions of oyster AMPs.

### 4.1. Antiviral properties

Antiviral activities of invertebrate AMPs have been poorly explored in homologous systems mainly due to the lack of cell lines facilitating the design of antiviral assays. At this stage it is still

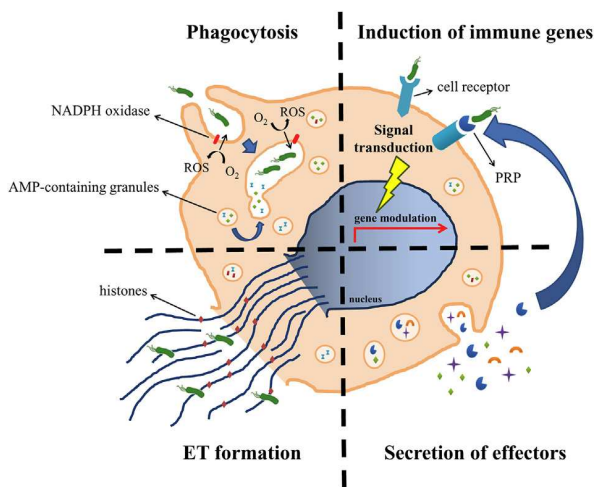


Fig. 2. Schematic representation of functions of oyster hemocytes. **Phagocytosis:** After recognition, foreign microorganisms are phagocytosed and can be further destroyed by (i) the production of reactive species of oxygen (ROS) through the NADPH oxidase complex and/or (ii) defense molecules (antimicrobials, hydrolytic enzymes and other effectors) stored in granules that fuse with phagosome; **Extracellular trapping:** After an exposition to microbial agents or tissue damage, hemocytes release extracellular DNA traps (ETs) associated to histones and granular antimicrobial peptides/proteins, which can entrap microorganisms. **Induction of immune genes:** Hemocytes can be activated by various mechanisms including tissue damage, stress and microbial recognition by both soluble and cellular pattern recognition proteins/receptors (PRPs) leading to the induction of expression of some immune genes; **Secretion of effectors.** Immune effectors can be stored in hemocyte cytoplasmic granules or vesicles and released into the plasma, the extracellular spaces or oyster body cavities either continuously or following a microbial challenge or tissue damage.

unknown whether oyster AMPs can be antiviral. Interestingly, plectasin from the fungus *Pseudoplectanina nigrella*, which shares a similar structure and mechanism of antibacterial action with Cg-Defs [38,106] was recently found to have antiviral activity. Studies on the antiviral properties of oyster defensins should be highly motivated by the severe viral diseases affecting oysters [107].

#### 4.2. Antifungal properties

Many Csab defensins from invertebrates and plants have been characterized for their antifungal properties [108]. Some are strictly antifungal, while others like Cg-Defs seem to be potent antibacterials [47] with antifungal properties [32]. Antifungal properties have also been evidenced for other families of antimicrobials. For instance, the BPI antimicrobial protein from the gastropod mollusk *Biomphalaria glabrata* was recently proposed to protect the snail eggs from fungal infections [109]. The antifungal properties of Cg-BPI remain to be studied.

#### 4.3. Chemokine activities

Until the recent study on myticin C [104], little attention had been paid to the chemotactic properties of mollusk AMPs. However, diverse families of cysteine-rich AMPs can act as chemokines [110]. It is therefore tempting to speculate on the potential chemotactic activity of oyster defensins. Such an activity should also be investigated for Cg-BPI. Indeed, it has been shown that cellular responses are induced by human LBP, which is highly similar to BPI in terms of structure and LPS-binding properties. In particular, it participates in the acute mobilization of circulating neutrophils to sites of tissue injury [111]. Such an activity could also contribute to the massive migration of hemocytes to sites of infection/injury in oyster.

#### 4.4. Opsonization

Finally, an important function to be tested for mollusk AMPs is their capacity to promote phagocytosis by oyster hemocytes. Indeed, AMPs have the capacity to bind to the surface of bacteria and this process could enhance hemocyte phagocytosis. This has been shown for hBPI, which opsonizes bacteria, enhancing neutrophil phagocytosis [112]. As already shown for the extracellular superoxide dismutase Cg-EcSOD [14], such an opsonin activity deserves further investigation among oyster AMPs.

### 5. Genetic view of oyster antimicrobial defense

#### 5.1. AMP sequence diversity and evolution

##### 5.1.1. Genomic structural organization

Whereas *C. gigas* genome has been recently sequenced [78], our knowledge about oyster AMP gene organization in oyster genome remains quite limited. Numerous DNA and RNA sequences have been characterized among the different AMP families (Table 3), revealing a great intra- and inter-individual diversity. Cg-Def family appears to be the most diversified with 89 different mRNA sequences and 25 gDNA ones, available on GenBank (Table 3). However, it is noteworthy that we failed to evidence in the published database, OysterBase (<http://www.oysterdb.com/>), any full sequences of AMP encoding genes, but only mRNA sequences were found. Because whole *C. gigas* genome has been sequenced from one individual oyster [78], it is likely that the high level of diversity in terms of sequences and genetic structure variation (see below) contribute to difficulties for AMP sequence annotation. To date, it has been shown that Cg-Defs, Cg-Prps and Cg-BigDefs are the products of multigenic families displaying a variety of gene

Table 3

Number of DNA and RNA sequences characterized in *Crassostrea gigas* among families of antimicrobial peptides and proteins. The accession numbers available in GenBank are indicated.

	No nucleotide sequences	GenBank accession No
<b>Cg-Defs</b>		
mRNA	89	FJ669323 to FJ669352; JF766718 to JF766742; JF766743 to JF766768, DQ400101, DQ400102, AJ565499, AJ582628, AJ582629
gDNA	25	FJ669403-FJ669423; AJ582630, AM050547
<b>Cg-BigDefs</b>		
mRNA	23	JF703137 to JF703143, JF703144 to JF703146; JF703147 to JF703153, JN251121, JN251123, JN251124, JN251127, JN251129, JN251130
gDNA	14	JF703154 to JF703160; JN251122, JN251125, JN251126, JN251131, JN251132, JF703157, JF703158
<b>Cg-Prps</b>		
mRNA	80	FJ669353 to FJ669402; JF766783 to JF766798; JF766775 to JF766782; JF766769 to JF766773
gDNA	35	FJ669252 to FJ669286
<b>Cg-BPIs</b>		
mRNA	29	FJ669296 to FJ669322; AY165040, HM992925
gDNA	nd	
<b>Cg-Lysozymes</b>		
mRNA	4	AB179775, AB288344, AB288345, AB307634
gDNA	3	JH816436, JH816734, JH819154

nd: non determined.

structures and gene copy number variations. The number of Cg-def gene copies was shown to be highly variable (14e53 copies) among individual oysters as well as for Cg-prp which displays from 4 to 18 gene copy numbers according to individuals [35,113]. The genomic structural organization of oyster AMP families remains a vast domain to be investigated.

#### 5.1.2. Phylogenetics

Although sharing similar nomenclature, oyster defensins (Cg-Defs) and big defensins (Cg-BigDefs) have no clear phylogenetic relationships to each other (Fig. 3). Indeed, Cg-Defs are cysteine-rich peptides containing a CSab (cysteine-stabilized ab) motif widespread in invertebrate defensins, like in arthropods and mollusks, but also in fungi and plants, and, remarkably, in toxins from scorpions [27,114]. However, the presence of eight cysteine residues was only reported in bivalve mollusk species [30,32,33]. This common structural fold strongly suggests there is a common ancestor to those different molecules, which has further evolved towards different functions, from toxins to antibacterials (fungi and mollusk defensins), antifungals (plant defensins), and as more recently shown antivirals (fungi defensins) [115]. On the other hand, invertebrate big defensins, including Cg-BigDefs, are more related to the b-defensins from vertebrates [40]. Indeed, in vertebrates, defensins adopt a three-stranded antiparallel b-sheet structure which is connected by a pairing of 6 cysteine residues. The cysteine paring of invertebrate big defensins is similar to that of vertebrate b-defensins but totally differs from that found in the CSab motif. Importantly, this cysteine paring is similar in invertebrate big defensins and vertebrate b-defensins. It was recently proposed that vertebrate b-defensins originate from invertebrate big defensins [116].

#### 5.1.3. Sequence diversity

In the last years, high levels of sequence polymorphism were reported to be characteristic of several immune genes from invertebrates [117]. A number of studies into the origin and evolution of innate immune molecules evidenced numerous mechanisms of diversification and directional selection pressures over these genes,



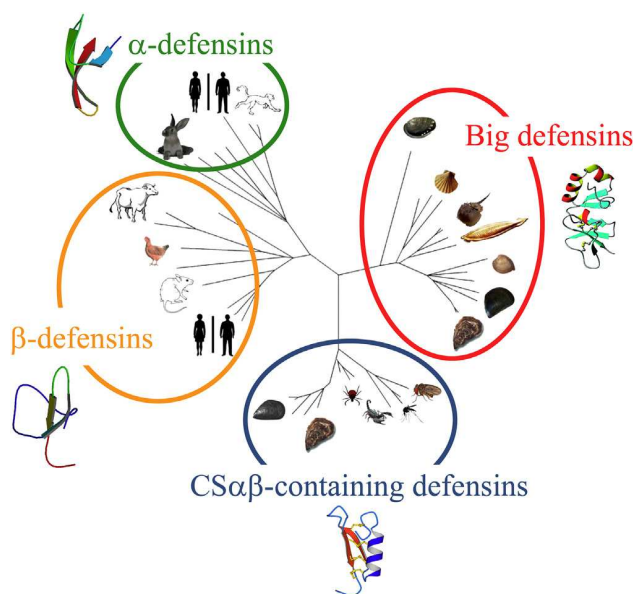


Fig. 3. Phylogenetic tree of animal defensins. Human  $\alpha$ -defensin 1 (DEFA1) [PDB: 3LO4], chicken  $\beta$ -defensin (AvB2) [PDB: 2LG5], oyster mantle defensin (Cg-Defm) [PDB: 2B58] and horseshoe crab big defensin [PDB: 2RNG].

related to adaptive molecular evolution [118]. In *C. gigas*, high levels of sequence diversity have been detected for some oyster AMP families, notably Cg-Defms and Cg-Prps [35]. Phylogenetic analyses showed that Cg-Defms and Cg-Prps sequences were clustered into distinct groups forming clearly structured phylogenies. For Cg-Defms, three separate but constraint groups in which the three original forms where the most representatives are observed, while Cg-Prp phylogeny showed more diverse groups suggesting an ongoing or recent process of neo- or sub-functionalization. From the same study, the diversity of Cg-BPI sequences was shown to be less diverse when compared to the peptides, but the finding of a new variant of Cg-BPI suggests the existence of a greater diversity than previously thought [51]. Furthermore, Cg-BigDefms have been shown to display a diversity of sequences for the three of their members, presenting several isoforms of Cg-BigDef-1, -2 and -3 variants [40].

The variability on the sequences of *C. gigas* AMPs appears to be generated by a combination of different genetic mechanisms previously described in the diversification of several antimicrobial molecules in *Drosophila* [119]. The rapid evolution of AMPs is well documented [120e122] and suggests that hosts exposed to diverse pathogens may evolve a broader repertoire of antimicrobials that enhance their defensive potential [123]. The rapid evolution of AMPs has been related with the general hypothesis of co-evolution or "arms race". In this theory, pathogens evolve continuously to escape from the immune response of hosts and, consequently, the immune system of hosts evolves to improve new barriers against pathogens [124]. Thus, it appears that oyster AMPs could be under strong selective forces shaping their sequence variations. This is supported by evolutionary analyses which revealed several negatively and positively selected sites for Cg-Defms and Cg-Prp [35]. Evidences of diversification in oyster AMPs also motivate the search for novel immune functions (neo-functionalization). It is indeed reasonable to speculate that such small and stable molecules, capable to resist to proteolysis in body fluids and tissues, are ideal candidates to mediate immune functions and are therefore the subject of intense selective pressures in the plastic association between the oyster and its microbiota.

## 5.2. Individual polymorphism of gene expression and genetic structural variation

The recent progress in genomics has opened new perspectives for exploring the oyster immune system. On the one hand, the first sequencing of *C. gigas* genome [78] and various transcriptomic studies allowed to identify a vast range of potential effectors and key actors of oyster immunity [62,94,125e127]. On the other hand, the development of genomic technologies such as high throughput RT-qPCR analyses allowed to explore the expression of numerous immune-related genes at the individual levels revealing an extraordinary polymorphism in basal expression of some of them in this species [128]. Indubitably, analyses performed at individual level may give new light on the genetic bases of oyster immune response and reveal its diversity and complexity. From these studies it is also clear that AMP-encoding genes show a great inter-individual variability of expression, as shown for Cg-defms, Cg-prps, Cg-bpi and Cg-bigdefms [40,113,129].

It is known that gene expression polymorphism may result from epigenetic modifications or genetic structural variation such as gene Copy Number Variation (CNV). CNV is a type of polymorphism characterized by differences in the number of copies of a particular gene in the genotype of an individual. CNV can be associated to variable phenotypes, including susceptibility to diseases [130]. In oysters, CNV has been evidenced for the AMP-encoding genes Cg-defms and Cg-prps with mean values of 18 and 48 gene copies respectively, whereas Cg-bpi1 has been found encoded by a single gene copy in all the individuals analyzed [35]. However, until now, the number of gene copies of Cg-bpi2 and other oyster antimicrobials (Cg-BigDefms, Cg-Molluscidin and Cg-Mpeg1) in individual oysters remains unknown. In a recent work, CNV has been correlated to the variability of AMP gene expression in oysters. For Cg-defms, a positive correlation was found with variation of 14e48 gene copies among 14 individuals analyzed, whereas for Cg-prps, the variation ranged from zero to 18 copy numbers [113].

Noteworthy, inter-individual variability has been observed in the basal expression of Cg-bigdefms using high throughput RT-qPCR analyses. Among 163 individual oysters, variability in basal gene expression reached up to 30, 27 and 7-fold for Cg-BigDef1, Cg-BigDef2 and Cg-BigDef3, respectively. In addition, Cg-BigDef expression could not be detected in 39 individuals. Further analyses at genome level revealed that this lack of expression was likely associated to the absence of encoding Cg-bigdef sequences [129] as previously observed for Cg-prps [113]. In such an extreme case of CNV, known as Presence-Absence Variations (PAV), large DNA segment present in some individuals can be entirely missing in others [131]. PAV is known in humans but also in plants for which the genetic diversity has been exploited for domestication. In humans, PAV has been described for the DEFA3 gene that encodes the human neutrophil peptide-3 (HNP-3) [132]. The presence of the encoding gene is variable depending on the human geographical populations and this variability has been suspected to be implicated with differences of susceptibility to infectious diseases [133]. In a larger extent, CNV has been associated to disease susceptibility particularly in the case of human defensins [134,135].

To date, there are no evidences about a possible impact of such structural genome variations on the oyster susceptibility to infectious diseases. No relationship was observed between the Presence-Absence of Cg-bigdefms and the capacity of the oysters to survive experimental *Vibrio* infections [129]. In plants, it is assumed that PAVs may generate new pathogen resistances but most of all that it could contribute to individual adaptation to environmental stresses [136].

## 6. Conclusions

From the recent results and knowledge we reviewed here, the role of AMPs in the oyster immune system must be reconsidered taking into account that oysters must be seen as an organism associated to a microbiota. In such a context where the oyster can host an abundant and beneficial microbiota, AMPs cannot be considered only as repressive weapons. It is likely that in oyster, where AMPs are present at low concentrations [46], they are primarily involved in unexplored immune functions.

We have now evidences that the oyster antimicrobial defense is characterized by local responses ensured by hemocytes instead of systemic or humoral response as shown in other invertebrates. With their great capacity to move and infiltrate all oyster tissues and organs, the hemocytes, which carry AMPs and other immune effectors, may provide monitoring and immediate response to damages or injuries (Fig. 2). The mechanisms that underlie hemocyte communication, recruitment and their activation remain largely unknown and the potential role of AMPs in such immune modulatory functions requires a particular attention.

One major advance over the past years is the evidence in *C. gigas* of a great AMP sequence diversity and extraordinary polymorphism of basal AMP gene expression among individuals. The relationship between the AMP gene expression level and genome structural variations such as gene copy number or Presence-Absence Variation has been highlighted for the first time in an invertebrate. These results open indubitably new perspectives for investigating the oyster immune system and in particular the role that antimicrobials may play in the interaction of the immune system with the oyster commensal microbiota (from mutualists to pathogens) and the capacity of the oyster metaorganism (the oyster and its associated microbiota) to survive infections or diseases.

## References

- [1] A. Lokmer, K. Mathias Wegner, Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection, *ISME J* 9 (2014) 670e682, <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.160>.
- [2] C.C. Wendling, F.M. Batista, K.M. Wegner, Persistence, seasonal dynamics and pathogenic potential of *Vibrio* communities from Pacific oyster hemolymph, *PLoS One* 9 (2014) e94256, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094256>.
- [3] A. Lemire, D. Goudenège, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche, et al., Populations, not clones, are the unit of *Vibrio* pathogenesis in naturally infected oysters, *ISME J* (2015), <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.233>.
- [4] F. Desriac, P. Le Chevalier, B. Brillet, I. Leguerinel, B. Thuillier, C. Paillard, et al., Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture, *FEMS Microbiol Lett* 350 (2014) 107e116, <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12308>.
- [5] P. Schmitt, M. Duperthuy, C. Montagnani, E. Bachère, D. Destoumieux-Garzón, Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities, in: J. Qin (Ed.), *Oysters*, Nova Science Publishers, 2012, pp. 227e273.
- [6] B. Petton, F. Pernet, R. Robert, P. Boudry, Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile pacific oysters *Crassostrea gigas*, *Aquac Environ Interact* 3 (2013) 257e273, <http://dx.doi.org/10.3354/aei00070>.
- [7] J.F. Samain, L. Dégremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Boller, M. Ropert, et al., Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes, *Aquaculture* 268 (2007) 227e243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.044>.
- [8] E. Bachère, D. Chagot, H. Grizel, Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation, *Dev Comp Immunol* 12 (1988) 549e559.
- [9] M. Luo, S. Ye, T. Xu, X. Wu, P. Yang, Molecular characterization of a novel tetraspanin from the oyster, *Crassostrea ariakensis*: variation, localization and relationship to oyster host defense, *Fish Shellfish Immunol* 33 (2012) 294e304, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.009>.
- [10] N. Itoh, Q.-G. Xue, K.L. Schey, Y. Li, R.K. Cooper, J.F. La Peyre, Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 158 (2011) 9e22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.06.006>.
- [11] P.D. Scotti, S.C. Dearing, D.R. Greenwood, Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *New Zeal J Mar Freshw Res* 41 (2007) 91e101, <http://dx.doi.org/10.1080/00288330709509898>.
- [12] T.J. Green, T.J. Dixon, E. Devic, R.D. Adlard, A.C. Barnes, Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance, *Fish Shellfish Immunol* 26 (2009) 799e810, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.003>.
- [13] M. Gonzalez, B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M.-C. Lebart, Y. Gueguen, et al., Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS, *Biochem Biophys Res Commun* 338 (2005) 1089e1097, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.075>.
- [14] M. Duperthuy, P. Schmitt, E. Garzón, A. Caro, R.D. Rosa, F. Le Roux, et al., Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 108 (2011) 2993e2998, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1015326108>.
- [15] E. Bachère, Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, B. Romestand, Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*, *Immunol Rev* 198 (2004) 149e168.
- [16] P. Hine, The inter-relationships of bivalve haemocytes, *Fish Shellfish Immunol* 9 (1999) 367e385, <http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>.
- [17] T. Cheng, *Invertebrate blood cells*, in: N. Ratcliffe, A. Rowley (Eds.), *Invertebr. blood cells*, Academic Press, New York, 1981, pp. 233e301.
- [18] C. SuJung, T. SuMin, C. HsinYiu, Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two cultured bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), *Zool Stud* 44 (2005) 144e152.
- [19] S. Aladaileh, S.V. Nair, D. Birch, D. Raftos, Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function, *J Invertebr Pathol* 96 (2007) 48e63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.011>.
- [20] M.D.F. Rebelo, E.D.S. Figueiredo, R.M. Mariante, A. Nóbrega, C.M. de Barros, S. Allodi, New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes, *PLoS One* 8 (2013) e57384, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057384>.
- [21] A. Tirapés, C. Bacque, R. Brizard, F. Vandenbulcke, V. Boulo, Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis, *Dev Comp Immunol* 31 (2007) 859e873, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.005>.
- [22] T. Gree, Master regulator unmasked, *Nature* 383 (1996) 575.
- [23] K. Kissa, P. Herbomel, Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition, *Nature* 464 (2010) 112e115, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08761>.
- [24] J.Y. Bertrand, S. Giroux, R. Golub, M. Klaine, A. Jalil, L. Boucontet, et al., Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 102 (2005) 134e139, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0402270102>.
- [25] M. Jemaï, N. Morin, P. Cavelier, J. Cau, J.-M. Strub, C. Delsert, Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster, *J Exp Biol* (2014), <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.106575>.
- [26] L. Cuénot, Etudes sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale, *Arch Zool Expérimentale Générale* 2 (1891) 13e90.
- [27] P. Bulet, R. Stöcklin, L. Menin, R. Stocklin, Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates, *Immunol Rev* 198 (2004) 169e184, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>.
- [28] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3 (2005) 238e250, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1098>.
- [29] M. Charlet, S. Chernysh, H. Philippe, C. Hetru, J.A. Hoffmann, P. Bulet, Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*, *J Biol Chem* 271 (1996) 21808e21813, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.36.21808>.
- [30] F. Hubert, T. Noel, P. Roch, A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), *Eur J Biochem* 240 (1996) 302e306.
- [31] J.-K. Seo, J.M. Crawford, K.L. Stone, E.J. Noga, Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*, *Biochem Biophys Res Commun* 338 (2005) 1998e2004, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.013>.
- [32] Y. Gueguen, A. Herpin, A. Aumelas, J. Garnier, J. Fievet, J.-M. Escoubas, et al., Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*. Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression, *J Biol Chem* 281 (2006) 313e323, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M510850200>.
- [33] M. Gonzalez, Y. Gueguen, G. Desserre, J. de Lorgeril, B. Romestand, E. Bachère, Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*, *Dev Comp Immunol* 31 (2007) 332e339, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.006>.
- [34] O. Froy, M. Gurevitz, Arthropod and mollusk defensins: evolution by exon-shuffling, *Trends Genet* 19 (2003) 684e687, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.010>.
- [35] P. Schmitt, Y. Gueguen, E. Desmarais, E. Bachère, J. de Lorgeril, Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*, *BMC Evol Biol* 10 (2010) 23, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-23>.

- [36] S. Zhu, B. Gao, J. Tytgat, Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS alpha beta superfamily, *Cell Mol Life Sci* 62 (2005) 2257e2269, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5200-6>.
- [37] Y. Yang, G. Mitta, A. Chavanieu, Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond Mediterranean mussel defensin (MGD-1), *Biochemistry* 2 (2000) 14436e14447.
- [38] P. Schmitt, M. Wilmes, M. Pugnifère, A. Aumelas, E. Bachère, H.-G. Sahl, et al., Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II, *J Biol Chem* 285 (2010) 29208e29216, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.143388>.
- [39] M. Dupertuy, J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, et al., 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 (2010) 951e963, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02138.x>.
- [40] R.D. Rosa, A. Santini, J. Fievet, P. Bulet, D. Destoumieux-Garzon, E. Bachère, Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*, *PLoS One* 6 (2011) e25594, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025594>.
- [41] T. Saito, S. Kawabata, T. Shigenaga, Y. Takayenoki, J. Cho, H. Nakajima, et al., A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity, *J Biochem* 117 (1995) 1131e1137.
- [42] T. Kouno, N. Fujitani, M. Mizuguchi, T. Osaki, S. Nishimura, A novel -defensin structure: a potential strategy of big defensin for overcoming resistance by gram-positive bacteria, 2008, pp. 10611e10619.
- [43] J. Zhao, L. Song, C. Li, D. Ni, L. Wu, L. Zhu, et al., Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein, *Mol Immunol* 44 (2007) 360e368, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2006.02.025>.
- [44] W. Li, J. Tailhades, N.M. O'Brien-Simpson, F. Separovic, L. Otvos, M.A. Hossain, et al., Proline-rich antimicrobial peptides: potential therapeutics against antibiotic-resistant bacteria, *Amino Acids* 46 (2014) 2287e2294, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-014-1820-1>.
- [45] Y. Gueguen, R. Bernard, F. Julie, S. Paulina, D.-G. Delphine, V. Franck, et al., Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin, *Mol Immunol* 46 (2009) 516e522, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.021>.
- [46] P. Schmitt, R.D. Rosa, M. Dupertuy, J. de Lorgeril, E. Bachère, D. Destoumieux-Garzon, The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of Resident/Pathogenic microflora, *Front Microbiol* 3 (2012) 160, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160>.
- [47] P. Schmitt, J. de Lorgeril, Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, E. Bachère, Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster *Crassostrea gigas*, *Dev Comp Immunol* 37 (2012) 363e370, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.01.004>.
- [48] J.-K. Seo, M.J. Lee, B.-H. Nam, N.G. Park, cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish Shellfish Immunol* 35 (2013) 480e488, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.010>.
- [49] B.B.C. Krasity, J.V. Troll, J.P. Weiss, M.J. McFall-Ngai, LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism, *Biochem Soc* 39 (2011) 1039e1044, <http://dx.doi.org/10.1042/BST0391039.LBP/BPI>.
- [50] M. Gonzalez, Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugnifère, et al., Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 104 (2007) 17759e17764, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702281104>.
- [51] Y. Zhang, X. He, X. Li, D. Fu, J. Chen, Z. Yu, The second bactericidal permeability increasing protein (BPI) and its revelation of the gene duplication in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish Shellfish Immunol* 30 (2011) 954e963, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.031>.
- [52] X. He, Y. Zhang, Z. Yu, An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: molecular characterization and gene expression, *Fish Shellfish Immunol* 30 (2011) 870e876, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.009>.
- [53] S.A. Mah, G.W. Moy, W.J. Swanson, V.D. Vacquier, A perforin-like protein from a marine mollusk, *Biochem Biophys Res Commun* 316 (2004) 468e475, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.073>.
- [54] P. Jollifère, From the discovery of lysozyme to the characterization of several lysozyme families, *EXS* 75 (1996) 3e5.
- [55] S. Bachali, M. Jager, A. Hassanin, F. Schoentgen, P. Jollifère, A. Fiala-Medioni, et al., Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function, *J Mol Evol* 54 (2002) 652e664, <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-001-0061-6>.
- [56] Q. Xue, M.E. Hellberg, K.L. Schey, N. Itoh, R.I. Eytan, R.K. Cooper, et al., A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion, *BMC Evol Biol* 10 (2010) 213, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-213>.
- [57] K. Takahashi, K. Mori, T. Nomura, Occurrence and characterization of lysozyme from marine bivalves, *Bull Jpn Soc Fish Sci* 52 (1986) 863e868.
- [58] N. Itoh, Y. Okada, K.G. Takahashi, M. Osada, Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Fish Shellfish Immunol* 29 (2010) 126e135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.027>.
- [59] N. Itoh, Q. Xue, Y. Li, R.K. Cooper, J.F. La Peyre, cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, *Fish Shellfish Immunol* 23 (2007) 957e968, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.006>.
- [60] T. Matsumoto, A.M. Nakamura, K.G. Takahashi, Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145 (2006) 325e330, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.08.003>.
- [61] N. Itoh, K.G. Takahashi, cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 148 (2007) 160e166, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.05.005>.
- [62] J. De Lorgeril, R. Zenagui, R.D. Rosa, D. Piquemal, E. Bachère, Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis, *PLoS One* 6 (2011) e23142, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023142>.
- [63] Y. Sun, Z. Zhou, L. Wang, C. Yang, S. Jianga, L. Song, The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas*, *Dev Comp Immunol* 45 (2014) 291e299, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.007>.
- [64] C.M. Pickart, M.J. Eddins, Ubiquitin: structures, functions, mechanisms, *Biochim Biophys Acta* 1695 (2004) 55e72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.09.019>.
- [65] A. Kieffer, Y. Goumon, O. Ruh, The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities, *FASEB J* (2003) 776e778.
- [66] S. Alonso, K. Pethe, D.G. Russell, G.E. Purdy, Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 104 (2007) 6031e6036, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0700036104>.
- [67] J.-K. Seo, M.J. Lee, H.-J. Go, G. Do Kim, H. Do Jeong, B.-H. Nam, et al., Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *Mol Immunol* 53 (2013) 88e98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.07.003>.
- [68] B.F. Miller, R. Abrams, A. Dorfman, M. Klein, Antibacterial properties of protamine and histone, *Science* (80- ) 96 (1942) 428e430, <http://dx.doi.org/10.1126/science.96.2497.428>.
- [69] H. Kawasaki, S. Iwamuro, Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents, *Infect Disord Drug Targets* 8 (2008) 195e205.
- [70] L.A. Augusto, P. Decottignies, M. Synguelakis, M. Nicaise, P. Le Maréchal, R. Chaby, Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules, *Biochemistry* 42 (2003) 3929e3938, <http://dx.doi.org/10.1021/bi0268394>.
- [71] J.-K. Seo, J. Stephenson, E.J. Noga, Multiple antibacterial histone H2B proteins are expressed in tissues of American oyster, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 158 (2011) 223e229, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.011>.
- [72] A.C. Poirier, P. Schmitt, R.D. Rosa, A.S. Vanhove, S. Kieffer-Jaquinet, T.P. Rubio, et al., Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: evidences in *Crassostrea gigas*, *J Biol Chem* 289 (2014) 24821e24831, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.576546>.
- [73] S. Wang, E. Peatman, H. Liu, D. Bushek, S.E. Ford, H. Kucuktas, et al., Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge, *Fish Shellfish Immunol* 29 (2010) 921e929, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.035>.
- [74] T. Dorrington, L. Villamil, M. Gómez-chiarri, Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4, *Fish Shellfish Immunol* 30 (2011) 94e101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.006>.
- [75] M. McFall-Ngai, M.G. Hadfield, T.C.G. Bosch, H.V. Carey, T. Domazet-Loso, A.E. Douglas, et al., Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 110 (2013) 3229e3236, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1218525110>.
- [76] T. Pradeu, E.L. Cooper, The danger theory: 20 years later, *Front Immunol* 3 (2012) 287, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00287>.
- [77] E. Muraille, Redefining the immune system as a social interface for cooperative processes, *PLoS Pathog* 9 (2013) e1003203, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003203>.
- [78] G. Zhang, X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, et al., The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation, *Nature* 490 (2012) 49e54, <http://dx.doi.org/10.1038/nature11413>.
- [79] Y. Zhang, X. He, F. Yu, Z. Xiang, J. Li, K.L. Thorpe, et al., Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrochozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity, *PLoS One* 8 (2013) e76464, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076464>.
- [80] L. Zhang, L. Li, G. Zhang, A *Crassostrea gigas* toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates, *Fish Shellfish Immunol* 30 (2011) 653e660, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.12.023>.
- [81] C. Montagnani, C. Kappler, J.M. Reichhart, J.M. Escoubas, Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, *FEBS Lett* 561 (2004) 75e82, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00124-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00124-3).
- [82] T.J. Green, A.C. Barnes, Inhibitor of REL/NF-KappaB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible, *Fish Shellfish Immunol* 27 (2009) 260e265, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.05.005>.



- [83] J.A. Hoffmann, F.C. Kafatos, C.A. Janeway, R.A. Ezekowitz, Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* 284 (1999) 1313e1318.
- [84] M. Munoz, F. Vandenbulcke, J. Garnier, Y. Gueguen, P. Bulet, D. Saulnier, et al., Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio, *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 961e972, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3441-9>.
- [85] G. Mitta, F. Vandenbulcke, P. Roch, Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity, *FEBS Lett* 486 (2000) 185e190.
- [86] T. Ganz, M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, et al., Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J Clin Invest* 76 (1985) 1427e1435, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI112120>.
- [87] G. Mitta, F. Vandenbulcke, T. Noël, B. Romestand, J.C. Beauvillain, M. Salzet, et al., Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel, *J Cell Sci* 113 (Pt 1) (2000) 2759e2769.
- [88] C.L. Bevins, N.H. Salzman, Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis, *Nat Rev Microbiol* 9 (2011) 356e368, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2546>.
- [89] T.C. Cheng, G.E. Rodrick, Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*, *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 52 (1975) 443e447, [http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491\(75\)90159-5](http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(75)90159-5).
- [90] E. Bachère, D. Hervio, E. Mialhe, Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*, *J Dis Aquat Org* 11 (1991) 173e180.
- [91] C. Lambert, P. Soudant, G. Choquet, C. Paillard, Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios, *Fish Shellfish Immunol* 15 (2003) 225e240.
- [92] N. Cochenne-Laureau, M. Auffret, T. Renault, A. Langlade, Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*, *J Invertebr Pathol* 83 (2003) 23e30.
- [93] Y. Labreuche, P. Soudant, M. Gonçalves, C. Lambert, J.-L. Nicolas, 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 (2006) 367e379, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003>.
- [94] E. Fleury, A. Huvet, C. Lelong, J. de Lorgeril, V. Boulo, Y. Gueguen, et al., Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed sequence tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase, *BMC Genomics* 10 (2009) 341, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-341>.
- [95] R.E. Hancock, M.G. Scott, The role of antimicrobial peptides in animal defenses, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 97 (2000) 8856e8861.
- [96] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303 (2004) 1532e1535, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092385>.
- [97] V. Papayannopoulos, A. Zychlinsky, NETs: a new strategy for using old weapons, *Trends Immunol* 30 (2009) 513e521, <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.07.011>.
- [98] C.N. Jenne, C.H.Y. Wong, F.J. Zemp, B. McDonald, M.M. Rahman, P.A. Forsyth, et al., Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps, *Cell Host Microbe* 13 (2013) 169e180, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.005>.
- [99] A.B. Guimaraes-Costa, M.T.C. Nascimento, A.B. Wardini, L.H. Pinto-da-Silva, E.M. Saraiva, ETosis: a microbicidal mechanism beyond cell death, *J Parasitol Res* 2012 (2012) 929743, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/929743>.
- [100] Y. Wang, M. Li, S. Stadler, S. Correll, P. Li, D. Wang, et al., Histone hyperacetylation mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation, *J Cell Biol* 184 (2009) 205e213, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200806072>.
- [101] B. Altincicek, S. Stözel, M. Wygrecka, K.T. Preissner, A. Vilcinskas, Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects, *J Immunol* 181 (2008) 2705e2712.
- [102] L. Donaghy, E. Kraffe, N. Le Goic, C. Lambert, A.K. Volety, P. Soudant, Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement, *PLoS One* 7 (2012) e46594, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046594>.
- [103] A.L. Hilchie, K. Wuerth, R.E.W. Hancock, Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides, *Nat Chem Biol* 9 (2013) 761e768, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1393>.
- [104] P. Balseiro, A. Falco, A. Romero, S. Dios, A. Martínez-López, A. Figueras, et al., *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties, *PLoS One* 6 (2011) e23140, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023140>.
- [105] G. Mitta, F. Hubert, T. Noël, P. Roch, Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Eur J Biochem* 265 (1999) 71e78.
- [106] T. Schneider, T. Kruse, R. Wimmer, I. Wiedemann, V. Sass, U. Pag, et al., Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II, *Science* 328 (2010) 1168e1172, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1185723>.
- [107] A. Segarra, L. Baillon, D. Tourbiez, A. Benabdellouma, N. Faury, N. Bourgougnon, et al., Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, *Vet Res* 45 (2014) 103, <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0103-x>.
- [108] K. Thevissen, D.C. Warnecke, I.E.J.A. François, M. Leipel, E. Heinz, C. Ott, et al., Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides, *J Biol Chem* 279 (2004) 3900e3905, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M311165200>.
- [109] O.L. Baron, P. van West, B. Industri, M. Ponchet, G. Dubreuil, B. Gourbal, et al., Parental transfer of the antimicrobial protein LBP/BPI protects *Biomphalaria glabrata* eggs against oomycete infections, *PLoS Pathog* 9 (2013) e1003792, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003792>.
- [110] B. Bao, E. Peatman, P. Li, C. He, Z. Liu, Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific upregulation after bacterial infection, *Dev Comp Immunol* 29 (2005) 939e950, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2005.03.006>.
- [111] C.J. Thomas, M. Kapoor, S. Sharma, H. Bausinger, U. Zyilan, D. Lipsker, et al., Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response, *FEBS Lett* 531 (2002) 184e188.
- [112] N.M. Iovine, P. Elsbach, J. Weiss, An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 94 (1997) 10973e10978.
- [113] P. Schmitt, A. Santini, A. Vergnes, L. Degremont, J. de Lorgeril, Sequence polymorphism and expression variability of *Crassostrea gigas* immune related genes discriminate two oyster lines contrasted in term of resistance to summer mortalities, *PLoS One* 8 (2013) e75900, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075900>.
- [114] B.P.H.J. Thomma, B.P.A. Cammue, K. Thevissen, Plant defensins, *Planta* 216 (2002) 193e202, <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-002-0902-6>.
- [115] H.A. Rothen, Z. Mohamed, A.M. Suhaeb, N.A. Rahman, R. Yusof, Antiviral cationic peptides as a strategy for innovation in global health therapeutics for dengue virus: high yield production of the biologically active recombinant plectasin peptide, *OMICS* 17 (2013) 560e567, <http://dx.doi.org/10.1089/omi.2013.0056>.
- [116] S. Zhu, B. Gao, Evolutionary origin of b-defensins, *Dev Comp Immunol* 39 (2013) 79e84, <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.011>.
- [117] L. Du Pasquier, Metazoa immune receptors diversification during evolution, *Med Sci Paris* 25 (2009) 273e280, <http://dx.doi.org/10.1051/medsci/2009253273>.
- [118] N. Pujol, O. Zugasti, D. Wong, C. Couillault, C.L. Kurz, H. Schulenburg, et al., Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides, *PLoS Pathog* 4 (2008) e1000105, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000105>.
- [119] B.P.B. Lazzaro, Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system, *Curr Opin Microbiol* 11 (2008) 284e289, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.001>.
- [120] A. Patil, A.L. Hughes, G. Zhang, Rapid evolution and diversification of mammalian alpha-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes, *Physiol Genomics* 20 (2004) 1e11, <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00150.2004>.
- [121] F.M. Jiggins, K.-W. Kim, The evolution of antifungal peptides in *Drosophila*, *Genetics* 171 (2005) 1847e1859, <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.045435>.
- [122] C.A.M. Semple, K. Taylor, H. Eastwood, P.E. Barran, J.R. Dorin, Beta-defensin evolution: selection complexity and clues for residues of functional importance, *Biochem Soc Trans* 34 (2006) 257e262, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20060257>.
- [123] J.A. Tennessen, Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection, *J Evol Biol* 18 (2005) 1387e1394, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00925.x>.
- [124] R. Dawkins, J.R. Krebs, Arms races between and within species, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205 (1979) 489e511.
- [125] A. Tanguy, N. Bierné, C. Saavedra, B. Pina, E. Bachère, M. Kube, et al., Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution, *Gene* 408 (2008) 27e36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.021>.
- [126] N. Taris, R.P. Lang, P.W. Reno, M.D. Camara, Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display, *Anim Genet* 40 (2009) 663e677, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01894.x>.
- [127] Y. Gueguen, J.P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguie, A.L. Girardot, J. Garnier, et al., Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*, *Gene* 303 (2003) 139e145.
- [128] R.D. Rosa, J. de Lorgeril, P. Tailliez, R. Bruno, D. Piquemal, E. Bachère, A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections, *BMC Genomics* 13 (2012) 252, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-252>.
- [129] R. Rosa, P. Alonso, A. Santini, A. Vergnes, E. Bachère, High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence-absence gene variability (PAV) in the oyster *Crassostrea gigas*, *Dev Comp Immunol* 49 (2015) 231e238.
- [130] B.E. Stranger, M.S. Forrest, M. Dunning, C.E. Ingle, C. Beazley, N. Thorne, et al., Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes, *Science* 315 (2007) 848e853, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1136678>.

- [131] N.M. Springer, K. Ying, Y. Fu, T. Ji, C.-T. Yeh, Y. Jia, et al., Maize inbreds exhibit high levels of copy number variation (CNV) and presence/absence variation (PAV) in genome content, *PLoS Genet* 5 (2009) e1000734, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000734>.
- [132] R.M. Linzmeier, T. Ganz, Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23, *Genomics* 86 (2005) 423e430, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.06.003>.
- [133] E. Ballana, J.R. Gonzalez, N. Bosch, X. Estivill, Inter-population variability of DEFA3 gene absence: correlation with haplotype structure and population variability, *BMC Genomics* 8 (2007) 14, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-8-14>.
- [134] C.D. Campbell, N. Sampas, A. Tsalenko, P.H. Sudmant, J.M. Kidd, M. Malig, et al., Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms, *Am J Hum Genet* 88 (2011) 317e332, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.02.004>.
- [135] S. Cantsilieris, S.J. White, Correlating multiallelic copy number polymorphisms with disease susceptibility, *Hum Mutat* 34 (2013) 1e13, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22172>.
- [136] R.A. Swanson-Wagner, S.R. Eichten, S. Kumari, P. Tiffin, J.C. Stein, D. Ware, et al., Pervasive gene content variation and copy number variation in maize and its undomesticated progenitor, *Genome Res* 20 (2010) 1689e1699, <http://dx.doi.org/10.1101/gr.109165.110>.