THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Des Interactions (BDI)

École doctorale GAÏA

Unité de recherche
UMR 5244, Interactions Hôtes Pathogènes Environnements (IHPE)

Etude des amibes marines et de leurs interactions avec les vibrios pathogènes d'huître

Présentée par Etienne ROBINO
Le 12 novembre 2019

Sous la direction de Guillaume CHARRIERE
et Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN

Devant le jury composé de

Dr. Marc BOUVY, IRD, Montpellier	Président du jury
Prof. Maëlle MOLMERET, Université de Toulon	Rapporteur
Dr. Thierry SOLDATI, Université de Genève	Rapporteur
Dr. Frédérique LE ROUX, Ifremer, Roscoff	Examinateur
Dr. Charles VAN DER HENST, Université de Namür	Invité
Dr. Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN, CNRS, Montpellier	Co-directrice de thèse
Dr. Guillaume CHARRIERE, Université de Montpellier	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

L'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse sont avant tout le fruit de l'implication et de l'aide de nombreuses personnes sans qui ce projet passionnant n'aurait pas été possible et je m'excuse par avance pour les personnes que j'aurais oubliées dû à la fatigue.

Je tiens à remercier Madame Maëlle Molmeret et Monsieur Thierry Soldati de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse. Je voudrais également remercier Marc Bouvy, Frédérique Le Roux et Charles Van der Henst d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je remercie particulièrement Frédérique Le Roux pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier l'université de Montpellier, l'Ifremer ainsi que les projets VibrAm (Ec2co), AmibAdapt (Labex Cemeb) Amidiv (EMBRC France) et Vivaldi (Union Européenne, Horizon 2020, Research and innovation programme under grant agreement N° 678589) d'avoir participé au financement de cette thèse. Je remercie l'I-Site MUSE d'avoir financé ma mobilité internationale aux Etats-Unis à Madison. Je remercie grandement Mark Mandel d'avoir pris le temps de m'accueillir dans son équipe au sein de l'Université du Wisconsin ainsi que pour sa patience et sa bienveillance.

Je souhaite remercier Olivier Duron, Matteo Bonazzi et Vincent Delafont pour leurs précieux conseils lors de mes comités de thèse. Un grand merci à toi Vincent qui m'a donné confiance en moi et donné l'envie de faire une thèse.

Je voudrais remercier Messieurs Guillaume Mitta et Yannick Gueguen de m'avoir accueilli au sein du laboratoire IHPE ainsi que pour leurs conseils scientifiques toujours pertinents et leurs encouragements. Merci Guillaume de toujours être présent pour les doctorants ainsi que pour ton dynamisme qui nous pousse toujours à donner le meilleur de nous-mêmes.

J'adresse tous mes remerciements à l'équipe MIMM sans qui je n'aurais pas passé une aussi bonne thèse. Caroline, Jérémie, Julien, Arnaud, Jean-Michel, Jean-Luc, Yannick, merci pour l'ensemble des échanges scientifiques que nous avons pu avoir durant ces trois années qui ont fait mûrir ma réflexion et ma rigueur scientifique. Merci également pour tous les moments off, votre humour (parfois limite mais bon c'est ça qui est drôle non ?), votre bonne humeur et votre présence toujours bienveillante à mon égard. Je tiens à te remercier Yannick d'avoir toujours été disponible quel que soit la raison. Merci Jean-Michel pour les discussions montagnes et randonnées qui m'ont, je dois l'avouer, manqué en cette fin de thèse !

Je veux particulièrement remercier Marc « le beau gosse », Philippe et Agnès pour leurs soutiens techniques qui a permis que l'ensemble des expérimentations se déroulent bien. Encore désolé Philippe pour les sorties sur l'étang en janvier dans des conditions polaires mémorables.

Merci également à Solenn Soriano, Marion Richard, Laurent Intertaglia pour votre disponibilité, votre flexibilité et votre gentillesse qui ont fait de l'échantillonnage d'un an une expérience que je n'oublierai pas.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à mes directeurs de thèse Guillaume Charrière et Delphine Destoumieux-Garzon. Grâce à vous et votre complémentarité, j'ai passé une thèse que je n'échangerai contre aucune autre. Toi Guillaume, toujours une nouvelle hypothèse (plus ou moins farfelue) et toi Delphine toujours rigoureuse et à veiller sur moi. Merci d'avoir eu confiance en moi dès le début. Je vous remercie également pour vos précieux conseils, vos encouragements, votre

investissement et votre disponibilité. Grâce à vous j'ai appris énormément au cours de ma thèse, tant du point de vue pratique que du point de vue de la réflexion scientifique. Grâce à vous je pense avoir toutes les clés pour réussir. Je suis fier et heureux d'avoir eu la chance de travailler avec vous. Je suis sûr que vous garderez un œil sur moi et que nous resterons en contact. Ce serait un plaisir d'avoir l'occasion de travailler avec vous à nouveau. Encore une fois merci pour tout.

Un dernier mot pour toi Guillaume, merci pour ta bonne humeur permanente et tous les conseils que tu m'as donné. Tu m'as toujours poussé à me poser des questions et grâce à toi ma réflexion scientifique a grandement évolué. Il est loin le temps où je ne voulais pas entendre parler d'écologie, maintenant je suis prêt à échantillonner sur tout le globe ! Ne change rien tu es super, j'ai eu de la chance de partager ces trois années avec toi.

Il est maintenant temps pour moi de remercier tous les étudiants avec qui j'ai partagé mon bureau. Un grand merci à Tristan, Samuel, Aude, Daniel et Maxime, mes compagnons de la première heure. Même si certains d'entre vous étaient plutôt pause, en PLS régulièrement ou fan de boîte à p…, je vous remercie pour votre accueil à mon arrivé et votre bonne humeur. Merci pour les bons moments passés ensemble au labo et en dehors. Un grand merci également à Jean, Maurine, Pierre-Louis, Janan et Daniel, vous êtes bien ma zouz team toujours prête à coder sur R (avec un fond noir bien sûr !). Je souhaite également remercier ceux de l'autre bout du monde que j'ai eu la chance de côtoyer, Vaihiti et Cairé. Merci également à Sandra, Angélique et Hajar pour votre aide durant ma thèse. Merci également à Erwan, l'écologue torturé, sans qui les repas du midi auraient été beaucoup moins drôles. Encore une fois merci à tous pour votre soutien et pour les bons moments passés ensemble.

Un dernier mot spécialement pour toi Maxime. Tu as été LA rencontre de ma thèse. Merci pour les discussions scientifiques ainsi que pour tous les bons moments en dehors du labo. Pour faire écho à ta thèse, oui j'ai bien compris le concept du « nuts » (d'ailleurs comment on dit nuts dans ta langue ?), ce qui m'a permis d'éviter les soleils noirs au quotidien. Je suis heureux de te compter parmi mes amis et sache BENJAAAMM que je serais toujours PREJENT pour toi !

Je souhaite également remercier mes amis qui ont participé indirectement au bon déroulement de ma thèse en me permettant de décrocher et de penser à autre chose. Merci Fanfan, Sebi, Dodo, Cédric, Saade pour votre présence à mes côtés.

Un grand merci à ma très nombreuse belle-famille qui m'a également permis de décrocher, de me changer les idées et de passer de bons moments. Merci Pascal, Marie-Paule, toutes les cousines et leurs pièces rapportées sans oublier Fidji et Choupi. Un grand merci à toi Sandrine et au bébé chat qui a été une bouffée d'oxygène pour moi.

Je souhaite également remercier ma famille à qui je dédie une partie de cette thèse, ma sœur Clémence, mes parents Rachel et Régis, mes grands-parents Ginette, Jean et Mireille. Si je suis parvenu jusqu'ici c'est grâce à vous qui avez toujours cru en moi et qui m'avez toujours poussé. Vous avez toujours été présents pour moi et j'espère vous rendre fiers en retour au travers de cette thèse qui n'aurait pas été possible sans votre soutien et votre amour. Encore une fois merci pour tout.

Enfin j'écris cette dernière partie pour te remercier toi, Amandine, celle qui compte plus que tout pour moi. Merci de m'avoir supporté et soutenu au quotidien, si je suis arrivé au bout de cette thèse c'est grâce à toi qui a toujours su trouver les mots pour m'encourager et me réconforter dans les moments difficiles. Je te dédie cette thèse qui n'aurait jamais été possible sans toi qui a toujours cru en moi. Je t'aime fort et j'espère avoir la chance de continuer à vivre cette grande aventure qu'est la vie à tes côtés.

« Le spectacle de la nature est toujours beau »

Aristote

Tables des matières

Liste des figures et tableaux 1

Liste des abbreviations 3

Introduction générale 5

Chapitre I : Rappels bibliographiques 11

1. Les amibes libres de l'environnement 13

1.1. Morphologie 14

1.1.1. Le trophozoite 14

1.1.2. Le kyste 16

1.1.3. Autres formes 17

1.2. Taxonomie 18

1.2.1. Les amibes libres 18

1.2.2. Les amibes libres marines 22

1.2.3. Effet des facteurs environnementaux sur la diversité amibienne observée 23

1.3. Les amibes du genre *Vannella* 26

1.4. Les amibes du genre *Paramoeba* 30

2. La phagocytose 32

2.1. Un processus conservé 32

2.2. Les étapes de la phagocytose 35

2.2.1. La reconnaissance 36

2.2.2. L'internalisation 38

2.2.3. La maturation du phagosome 39

2.3. Les effecteurs microbicides de la phagocytose 41

2.3.1. L'homéostasie des métaux 41

2.3.1.1. Le Zinc 41

2.3.1.2. Le cuivre 42

2.3.1.3. Le fer et le manganèse 43

2.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote 43

2.3.3. Les Lysozymes et enzymes lysosomales 44

2.3.4. Les peptides antimicrobiens 45

3. Les vibrios 48

3.1. Généralités 48

3.2. Les vibrios pathogènes de l'huître juvénile *Crassostrea gigas* 51

4. Interactions entre bactéries et amibes libres 56

4.1. Relation symbiotique entre bactéries et amibes 57

4.2. Les bactéries résistantes aux amibes 60
4.2.1. Diversité des bactéries résistantes aux amibes 60
4.2.2. Adaptations bactériennes à la prédation amibienne 62
4.2.2.1. Stratégies extracellulaires 63
4.2.2.2. Stratégies intracellulaires 66
4.2.3. Les vibrios résistant à la phagocytose par les amibes libres 71
4.2.3.1. *Vibrio cholerae* 71
4.2.3.2. Autres espèces de vibrios 77
5. Implication de la prédation par les protistes dans l'évolution de la virulence bactérienne 78
5.1. Virulence bactérienne et sélection concomitante 78
5.2. Virulence bactérienne et transfert horizontal de gènes 83
Problématique et objectifs de la thèse 87
Chapitre II : Résultats 91
Résultats Section A : La résistance du pathogènes d'huître Vibrio tasmaniensis LGP32 à la prédation par l'amibe marine Vannella sp. AP1411 implique les facteurs de résistance et de virulence Vsm et copA. 93
Synthèse des résultats 133
Données complémentaires 137
Résultats Section B : La diversité des amibes est plus faible dans l'étang de Thau et différents clades d'amibes possèdent des sensibilités différentes aux vibrios pathogènes d'huîtres. 141
Synthèse des résultats 175
Données complémentaires 181
Discussion et perspectives 185
1 - Diversité des Protistes en méditerranée 187
1.1 Impact de la méthode d'échantillonnage et de l'anthropisation 187
1.2 Impact de la faible diversité des protistes sur la persistance des vibrios pathogènes dans l'environnement 189
2 – Les interactions amibes/vibrios dans l'environnement 189
2.1 Une interaction écologiquement réaliste ? 189
2.2 Vers une interaction plus spécifique pour certains vibrios ? 190
2.3 Nature des associations vibrios / amibes 191
3 - Hypothèse de la sélection concomitante 192
3.1 Facteurs de virulence et spécificité d'hôtes 192
3.2 Une approche plus globale pour identifier des traits adaptatifs généralistes 194
4 – Une spécificité d'interaction au détriment d'autres relations biotiques ? 196
Conlusion générale 199
Références bibliographiques 203

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1. Schema de differents morphotypes d'amibes. 15
Figure 2. Formes planctoniques des amibes du genre *Vannella* par microscopie optique. 15
Figure 3. Kyste de l'amibe du genre *Acanthamoeba* par microscopie electronique 16
Figure 4. Formes flagellees des amibes des genres *Naegleria* (1) *Tetramitus* (2). 17
Figure 5. Schema du cycle de vie de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. 18
Figure 6. Illustration de differentes morphologies amibienne. Morphologies de 5 amibes appartenant a la famille des *Mayorellidae*. 19
Figure 7. Localisation des amibes sur l'arbre phylogenetique simplifie des eucaryotes. 21
Figure 8. Morphologie de l'amibe *Vannella danica* (1, 2, 3 et 4) et organisation du glycocalyx (A et B). 28
Figure 9. Phylogenie des amibes appartenant a la famille des *Vannellidae* basee sur la sequence du gene SSU 18S rDNA. 29
Figure 10. Morphologie de l'amibe *Paramoeba atlantica* par microscopie optique. 30
Figure 11. Phylogenie des amibes appartenant au genre *Paramoeba* basee sur la sequence du gene SSU 18S rDNA. 31
Figure 12. Fonctions biologiques majeures de la phagocytose. 33
Figure 13. Conservation du proteome du phagosome au cours de l'evolution. 34
Figure 14. Schema simplifie de l'etape d'internalisation d'une bacterie pendant le processus de phagocytose chez *D. discoideum*. 39
Figure 15. Schema simplifie de la maturation du phagosome chez *D. discoideum* apres internalisation d'une bacterie. 40
Figure 16. Effecteurs impliques dans la destruction des bacteries phagocytees par les amibes au sein du phagosome. 47
Figure 17. Phylogenie multigenique de 96 souches de vibrios basee sur les genes *ftsZ, gapA, gyrB, mreB, pyrH, recA, et topA*. 49
Figure 18. Mecanismes de virulence et de resistance de *V. tasmaniensis* LGP32 implique dans la colonisation des hemocytes de l'huitre *C. gigas*. 54
Figure 19. Differentes localisations intra-amibiennes des endosymbiontes. 59
Figure 20. Mecanisme d'echappement bacterien a la predation par les protistes. 63
Figure 21. Effet de la predation par les protistes sur la structuration des communautes microbiennes et la morphologie des bacteries. 64
Figure 22. Cycle infectieux de *Legionella pneumophila*. 68
Figure 23. Cycle infectieux de *Mycobacterium marinum*. 70
Figure 24. Contraction du T6SS permettant l'injection de proteines effectrices. 72
Figure 25. Cycle d'infection de l'amibe *A. castellanii* par *V. cholerae*. 76
Figure 26. Selection direct ou concomitante de facteurs de virulence. 79
Figure 27. Selection concomitante des bacteries du genre Bordetella de microbes de l'environnement a pathogene specialise de l'Homme. 82
Figure 28. Mecanismes majeurs de transfert horizontaux de genes chez les bacteries. 83
Figure 29. Cycles replicatifs des phages. 85
Figure 30. Suivie de la survie bacterienne a la predation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. 138
Figure 31. Suivie de la survie bacterienne a la predation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. 139
Figure 32. Arbre phylogenetique des clones amibiens en association potentielle ou non avec differentes familles bacteriennes. 183
Figure 33. Identification des determinants genetiques necessaires a la colonisation de l'huitre *C. gigas* et a la survie a la predation amibienne. 196

Tableaux

TABLEAU 1. SELECTION D'ENDOSYMBIONTES D'AMIBES ILLUSTRANT LEURS DIVERSITES PHYLOGENETIQUES. 58
TABLEAU 2. SELECTION DE BACTERIES RESISTANTES AUX AMIBES METTANT EN EVIDENCE LEURS DIVERSITES PHYLOGENETIQUES...... 61
TABLEAU 3. EXEMPLES DE FACTEURS DE VIRULENCE BACTERIENS IMPLIQUES DANS LA RESISTANCE A LA PREDATION CHEZ LES PROTISTES ET DANS LA RESISTANCE A LA PHAGOCYTOSE CHEZ DES METAZOAIRES. 80

Liste des abbreviations

AMP	AntiMicrobial Peptide
ARB	Amoebae Resistant Bacteria
BPI	Bactericidal Permeability Increasing Protein
COI	Cytochrome Oxydase I
CV	ContractileVacuole
EPS	Exopolysaccharide
FLA	Free-Living amoeba
ITS	Internal transcribed Spacer
LBP	Lipopolysaccharide-Binding Protein
LCV	Legionella-containing vacuole
LPS	Lipopolysaccharide
MAMP	Microbe-Associated Molecular Pattern
MBP	Mannose-Binding Protein
MCV	Mycobacterium-containing vacuole
NOX	NADPH Oxydase
NRAMP	Natural Resistance Associated Macrophage Protein
OMV	Outer Membrane Vesicule
OsHV-1	Ostreid Herpes Virus 1
OTU	Operationnal Taxonomic Unit
PRR	Pattern Recognition Receptor
QS	Quorum Sensing
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SSU 18S rDNA	small subunit 18S ribosomal desoxyribonucleic acid
SSU 18S rRNA	small subunit 18S ribosomal ribonucleic acid
T6SS	Type 6 Secretion System

Introduction générale

Introduction générale

Les bactéries du genre *Vibrio* sont retrouvées de façon ubiquitaire dans les milieux aquatiques marins, saumâtres et d'eau douce. Elles sont étudiées depuis de nombreuses années en raison de la pathogénicité de certaines espèces (Baker-Austin *et al.*, 2010). Chez l'Homme, *Vibrio cholerae* est l'agent étiologique du choléra ; il est endémique dans certaines régions du monde et responsable de pandémies depuis 1817 (Clemens *et al.*, 2017). *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio vulnificus* sont également associées à des gastro-entérites et des septicémies (Baker-Austin *et al.*, 2018). Les *Vibrio* sont aussi associés à des pathologies animales et sont notamment responsables de crises importantes en aquaculture (ostréiculture, pisciculture et pénéiculture). Parmi les espèces pathogènes, on peut citer *Vibrio anguillarum* qui est responsable de vibrioses chez les poissons et *Vibrio nigripulchritudo* qui est pathogène de crevettes (Sakai *et al.*, 2007; Frans *et al.*, 2011).

Depuis 2008, les élevages ostréicoles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* en Fance, en Atlantique et en Méditerranée, sont touchés par des épisodes de surmortalité provoquant des pertes d'huîtres juvéniles allant de 60 à 100% (Martenot *et al.*, 2011). Ces épisodes de surmortalité apparaissent lorsque la température de l'eau atteint 16°C et s'arrêtent au-delà de 24°C (Pernet et *al.*, 2012). La pathogénèse jusqu'ici incomprise a été déchiffrée récemment montrant l'implication de différents pathogènes associés à la maladie. Le virus *Herpes* OsHv-1 µvar est le premier acteur de la maladie : il cible les cellules immunocompétentes de l'huître, les hémocytes. L'immunosuppression provoquée par le virus permet l'entrée et la colonisation des huîtres par différentes bactéries opportunistes induisant la mort de celles-ci par septicémie (de Lorgeril *et al.*, 2018).

Parmi les bactéries associées aux mortalités d'huîtres, l'équipe Génomique des Vibrios dirigée par Frédérique le Roux (LBI2M, PFOM) a notamment identifié les espèces *Vibrio tasmaniensis* et *Vibrio crassostreae* appartenant au clade Splendidus (Gay *et al.*, 2004; Lemire *et al.*, 2015; Bruto *et al.*, 2017). La caractérisation des mécanismes de pathogénicité a été majoritairement réalisée sur les souches *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9. Différentes études menées au sein de notre unité de recherche ont montré que la pathogénicité de la souche pathogène *V. tasmaniensis* LGP32 (et plus largement des souches pathogènes de l'espèce) est dépendante de la phagocytose par les hémocytes d'huîtres (Duperthuy *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2019). Ainsi LGP32 est capable d'entrer dans les hémocytes et de survivre à la phagocytose grâce à différents facteurs de résistance et de virulence comme le système d'efflux du cuivre copA, la superoxyde dismutase SodA, la protéase vésiculaire Vsp et un système de sécrétion de type VI (T6SS) qui permet la lyse des hémocytes de

l'huître (Vanhove *et al.*, 2015, 2016; Rubio *et al.*, 2019). La protéase Vsm participe quant à elle à la toxicité des produits de sécrétion de LGP32 (Le Roux *et al.*, 2007; Binesse *et al.*, 2008). La pathogénicité de la souche *V. crassostreae* J2-9 est extracellulaire et dépendante du contact avec les hémocytes. Elle met en jeux le plasmide de virulence pGV1512, porteur d'un T6SS impliqué dans la toxicité de la souche ainsi que l'ilot génomique R5, dans lequel le gène conservé R5-7 représente un facteur de virulence ancestral au sein du clade Splendidus (Lemire *et al.*, 2015; Bruto *et al.*, 2017; Piel *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2019). Des vibrios du clade Harveyi, incluant l'espèce *V. harveyi*, sont également associés aux épisodes de mortalité d'huîtres (Lagorce *et al*., in prep). Cependant les mécanismes de pathogénicité ne sont pas connus à ce jour.

Un nombre croissant d'études a révélé que de nombreuses autres bactéries sont capables d'adopter un stade intracellulaire dans leurs hôtes mais également dans les protistes hétérotrophes, brouteurs de l'environnement. Parmi les protistes hétérotrophes, les amibes libres acquièrent leurs nutriments par phagocytose. Les amibes libres sont capables d'internaliser divers organismes comme des levures, des algues, des bactéries ou encore d'autres protistes. Les bactéries capables de résister à la phagocytose et de persister au sein d'amibes sont qualifiées d'ARB pour Amoeba Resistant Bacteria (Greub and Raoult, 2004). La plus emblématique des ARB qui a été décrite et largement étudiée est *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980). Cette bactérie responsable de la légionellose, utilise les amibes comme niche intracellulaire qui représente un véritable réservoir permettant à la bactérie de survivre dans divers environnements et de proliférer. Il a également été mis en évidence que certains vibrios ont la capacité de résister à la prédation par les amibes. C'est notamment le cas de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* (Matz *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; Van der Henst *et al.*, 2018).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la phagocytose étant conservés à travers les espèces (Boulais *et al.*, 2010), l'hypothèse de sélection concomitante est de plus en plus mise en avant. En effet, les bactéries et les protistes phagotrophes partageant les mêmes environnements possèdent une longue histoire co-évolutive, favorisant l'acquisition et la sélection de mécanismes de résistance à la prédation (Matz and Kjelleberg, 2005; Sun *et al.*, 2018). Ces gènes de résistance à la prédation par les protistes seraient impliqués de manière concomitante dans la virulence chez les métazoaires, provoquant diverses pathologies de manière accidentelle (Adiba *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2018). Les protistes dont les amibes sont alors considérés comme des précurseurs évolutifs des interactions servant de « terrain d'entraînement » favorisant ainsi l'émergence et le maintient de bactéries pathogènes pour les métazoaires (Molmeret *et al.*, 2005).

Au cours de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse que les amibes marines pouvaient favoriser l'émergence de bactéries pathogènes pour les huîtres par sélection concomitante. Nous nous sommes donc intéressés à caractériser la diversité amibienne et sa dynamique temporelle, encore inconnues, au niveau de 3 sites contrastés dont la zone ostréicole de Bouzigues dans la lagune de Thau ; ainsi qu'aux mécanismes d'interactions entre les amibes marines et différents vibrios pathogènes d'huîtres creuses *C. gigas*. La capacité des amibes marines à utiliser les souches pathogènes d'huîtres *V. tasmaniensis* LGP32, *V. crassostreae* J2-9 et *V. harveyi* A01 (associée aux mortalités d'huitres en méditerranée ; Lagorce et *al.*, in prep) comme source nutritive a également été étudiée. L'étude des mécanismes moléculaires de l'interaction avec l'amibe marine *Vannella sp.* AP1411, isolée à partir de branchies d'huître au cours de la thèse d'Aurore Poirier, a été focalisée sur la souche *V. tasmaniensis* LGP32 dont les facteurs de virulence et de résistance ont été bien décrits en utilisant les hémocytes d'huître de *C. gigas*.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une revue bibliographique sur (1) la biologie des amibes libres incluant leur mode de vie et leur taxonomie ; (2) La description du mécanisme de phagocytose chez les amibes, décrivant les différentes étapes et les facteurs microbicides mis en jeux lors du processus ; (3) Les bactéries capables de résister à la prédation par les protistes et les différents mécanismes de défenses utilisés par celles-ci ; (4) Les vibrios, dont la description des souches impliquées dans les épisodes de surmortalités des huîtres juvéniles *C. gigas* ainsi que les souches capables de résister à la prédation par les amibes et enfin (5) La virulence bactérienne et l'hypothèse de sélection concomitante.

Le deuxième chapitre composé de deux sections présente les résultats obtenus lors de ma thèse.

La section A décrit la diversité des amibes au niveau des zones ostréicoles de la lagune de Thau puis se focalise sur la souche *V. tasmaniensis* LGP32 et les mécanismes de résistance utilisés lors de la prédation par l'amibe marine *Vannella sp*. AP1411. Cette section compare les gènes impliqués dans la virulence envers l'huître *C. gigas* et la résistance envers une amibe marine dans l'hypothèse que la sélection concomitante joue un rôle.

La section B décrit la diversité des amibes isolées ainsi que la diversité cultivable totale obtenue lors d'un échantillonnage mensuel de différentes fractions (eau, sédiment et branchie d'huître) au niveau de 3 sites contrastés durant 1 an. Elle décrit également l'effet de différentes sources nutritives sur la diversité des amibes identifiées.

Le troisième et dernier chapitre de cette thèse est une conclusion des différents résultats obtenus et propose des perspectives pour l'étude des interactions entre amibes marines et vibrios et de leurs potentielles implications dans l'émergence de souches pathogènes.

Chapitre I : Rappels bibliographiques

1. Les amibes libres de l'environnement

Le terme amibe vient du grec amoibê signifiant « transformation » et ce terme rassemble un grand nombre de protistes amiboïdes. Les amibes sont des eucaryotes unicellulaires hétérotrophes, généralement aérobies, non photosynthétiques, capables de se diviser par fission binaire. Ces organismes se déplacent généralement grâce à un flux interne de cytoplasme grâce à des forces générées par les complexes actomyosines et par projection de pseudopodes ou lamellipodes.

Elles peuvent être de tailles et de formes variables mais possèdent des caractéristiques communes et sont similaires aux cellules eucaryotes des métazoaires. Leur cytoplasme contient un ectoplasme hyalin et un endoplasme granuleux riches en organites. L'endoplasme contient des mitochondries, un appareil de Golgi, des ribosomes, parfois une vacuole contractile nécessaire à leur osmorégulation, des vacuoles digestives, un à plusieurs noyaux en fonction des espèces, ainsi que différentes vésicules et différents types de granules.

Les amibes sont ubiquitaires et retrouvées dans de nombreux environnements aussi bien naturels que modifiés par l'Homme. Ainsi les amibes sont principalement retrouvées dans les milieux aquatiques marins et d'eaux douces mais également dans les sols, l'air et associées à différents hôtes (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Samba-Louaka *et al.*, 2019).

Leurs déplacements par projections cytoplasmiques leurs permettent de trouver des proies pour leur nutrition. En effet, les amibes se nourrissent par phagocytose des différents micro-organismes qu'elles rencontrent dans leurs environnements. Elles peuvent phagocyter des bactéries, des levures, des champignons, des algues ou encore d'autres protistes (Salt, 1968; De Moraes and Alfieri, 2008; Smirnov *et al.*, 2011; Radosa *et al.*, 2019). Les amibes sont également capables d'endocytose pour les petites particules d'un diamètre inférieure à 0,5 µm.

On peut séparer les amibes en deux groupes, les amibes libres (FLA pour Free-Living Amoebae) et les amibes parasitaires. Les amibes libres sont capables d'effectuer l'ensemble de leur cycle de vie dans l'environnement sans passer par un organisme hôte. Cependant, il est possible dans de rare cas pour une amibe libre d'induire une pathologie chez un hôte métazoaire auquel elle s'associe de manière fortuite. On peut citer le cas des amibes du genre *Acanthamoeba* qui peuvent provoquer des kératites chez les personnes portant des lentilles de contact ou encore *Naegleria fowlerii* et *Balamuthia mandrillaris* provoquant des méningites (Matin *et al.*, 2008; Grace *et al.*, 2015; Lorenzo-

Morales *et al.*, 2015). Les amibes parasitaires peuvent survivre dans l'environnement mais ont besoin d'un hôte au cours de leurs cycles de vie pour se multiplier. Les amibes parasitaires provoquent des pathologies appelées amibiases ciblant chez l'Homme le tractus digestif, le cerveau ou encore le sang. Les amibes parasitaires les plus décrites appartiennent au genre *Entamoeba* (Shirley *et al.*, 2018).

La phylogénie des amibes est complexe et a été soumise à de nombreux changements et actualisations au cours des dernières décennies. En effet les amibes ne sont pas trouvées exclusivement au sein d'un phylum mais forment un groupe polyphylétique (Clark and Cross, 1988; Lahr *et al.*, 2011). Ceci est dû au fait que les méthodes d'identification des amibes ont énormément évolué au cours du temps.

1.1. Morphologie

Les amibes possèdent une grande diversité morphologique et connaissent plusieurs stades lors de leur cycle de vie : la forme trophozoïte et la forme kystique. Certaines amibes peuvent avoir une forme flagellée et d'autres une forme sociale.

1.1.1. Le trophozoite

La forme trophozoïte ou végétative, est la forme métaboliquement active. Sous cette forme, les amibes sont capables de se déplacer par mouvements amiboïdes, de se diviser et de phagocyter divers micro-organismes. Les amibes possèdent cette forme lorsque les conditions environnementales sont favorables. Cette forme a été largement utilisée pour décrire et classer les amibes car celles-ci possèdent une grande diversité morphologique notamment au niveau des pseudopodes nécessaire à leurs locomotions (Smirnov and Brown, 2004) (Figure 1). La dynamique du cytosquelette a ainsi été étudiée pour tenter de comprendre la formation des pseudopodes (Taylor and Condeelis, 1979; Dembo, 1989; Pomorski *et al.*, 2007; González-Robles *et al.*, 2008; Tekle and Williams, 2016).

Sous cette forme, les amibes sont capables de phagocyter une grande diversité de micro-organismes présents dans leurs environnements comme des bactéries, des levures, des algues unicellulaires ou encore d'autres protistes (Salt, 1968; De Moraes and Alfieri, 2008; Smirnov *et al.*, 2011; Radosa *et al.*, 2019).

Lorsqu'elles n'adhèrent pas à une surface, les amibes peuvent adopter une forme planctonique (Page, 1983; Smirnov *et al.*, 2007) (Figure 2). Cette forme leur permet de se déplacer à l'aide des mouvements d'eau.

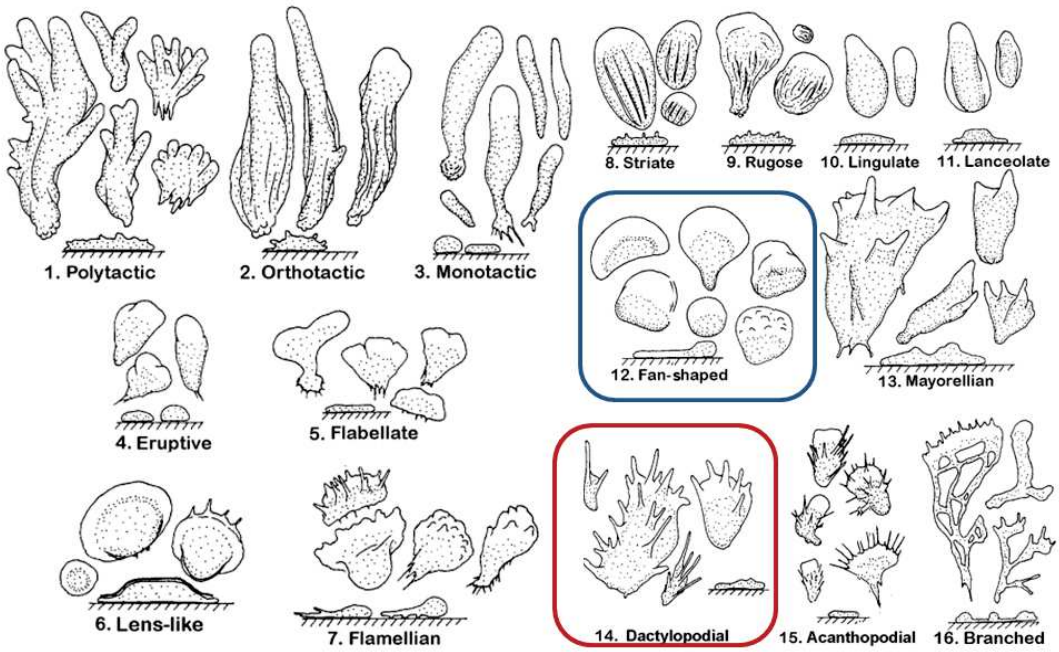


Figure 1. Schéma de différents morphotypes d'amibes. Schéma de différents morphotypes retrouvés au sein des gymnamoebae. Les amibes du genre *Vannella* possèdent la forme éventail (encadré bleu) et celle du genre *Paramoeba* la forme Dactylopodiale (encadré rouge). (Tiré de Smirnov and Brown, 2004)

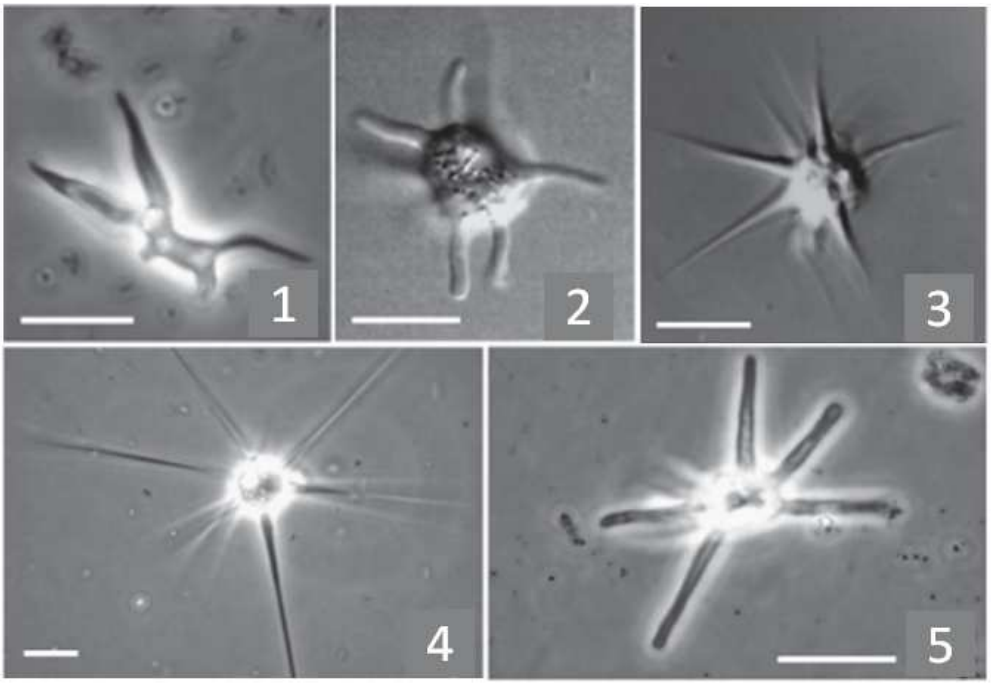


Figure 2. Formes planctoniques des amibes du genre *Vannella* par microscopie optique. Diversité morphotypique des formes planctoniques des espèces *bursella* **(1)**, *calycinucleolus* **(2)**, *danica* **(3)**, *lata* **(4)** et *mira* **(5)**. Echelle : 10 µm. (Tiré de Smirnov *et al.*, 2007)

1.1.2. Le kyste

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, certaines amibes peuvent adopter une forme de résistance appelée kyste via un processus d'enkystement (Figure 3). Cette forme de latence, métaboliquement peu active, permet aux amibes de persister longtemps dans un environnement qui leur est défavorable (Sriram *et al.*, 2008). Les différents facteurs pouvant induire la formation du kyste sont la pression osmotique, la température, le pH, la dessication, la présence d'organismes pathogènes ou encore une déplétion en nutriments (Weisman and Shaw, 1976; Byers *et al.*, 1980; Cordingley *et al.*, 1996; Cordingley and Trzyna, 2008; De Moraes and Alfieri, 2008; Lee *et al.*, 2012). Une fois enkystée, l'amibe est capable de résister à des stress physiques et chimiques importants comme un faible pH, une exposition à des rayons UV et gamma, la congélation (Turner, 2000; Aksozek *et al.*, 2002; Coulon *et al.*, 2010). Durant le processus d'enkystement les amibes deviennent sphériques et forment une paroi composée de deux ou trois couches en fonction des espèces. Chez les amibes modèles du genre *Acanthamoeba*, le kyste possède une couche interne appelée endokyste et une couche externe appelé ectokyste (Bowers and Korn, 1969; Lemgruber *et al.*, 2010). Les parois des kystes sont composées de polysaccharides, de protéines ainsi que de cellulose ou de chitine (Fouque *et al.*, 2012; Anwar *et al.*, 2018). La paroi du kyste des amibes du genre *Acanthamoeba* est composée de cellulose et celle du genre *Entamoeba* de chitine (Aguilar-Díaz *et al.*, 2011; Fouque *et al.*, 2012). Chez l'amibe *Balamuthia mandrillaris* il existe une troisième couche appelée mésokyste placée entre l'endokyste et l'ectokyste (Matin *et al.*, 2008). Il a été montré chez certaines amibes qu'au niveau de la paroi des kystes, il y a la présence d'ostiole et d'opercule. Lorsque les conditions deviennent favorables pour l'amibe, un processus de désenkystement est engagé. Ainsi le trophozoïte de l'amibe *A. castellanii* sort du kyste par l'ostiole qui ne possède plus son opercule (Chávez-Munguía *et al.*, 2005) (Figure 3).

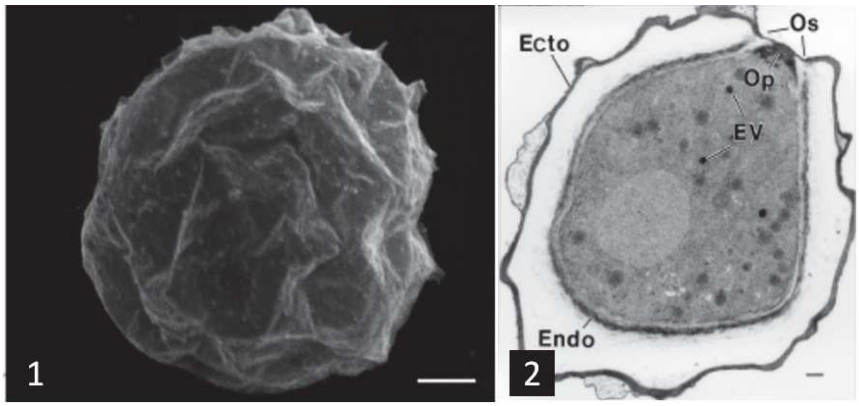


Figure 3. Kyste de l'amibe du genre *Acanthamoeba* par microscopie électronique. (1) Morphologie d'*Acanthamoeba* sp. par microscopie électronique à balayage. Echelle : 2 µM. **(2)** Morphologie d'*A. castellanii* par microscopie électronique à transmission. Ecto: ectokyste, Endo: endokyste, Op: opercule, Os: ostiole, EV: vesicule d'enkystement. Echelle : 0,5 µm. (Tiré de Chávez-Munguía *et al.*, 2005 et Fouque *et al.*, 2012).

1.1.3. Autres formes

Certaines amibes possèdent en plus de la forme trophozoïte ou kystique des formes supplémentaires. Il s'agit de la forme flagellée et de la forme sociale.

-La forme flagellée

Parmi les *Heterolobosea* (règne Excavata) on retrouve des amibes qualifiées d'amoeboflagellée car elles peuvent adopter une forme flagellée en milieu liquide (Figure 4). Le genre *Naegleria* est le plus connu car il est impliqué dans des pathologies humaines (Dingle and Fulton, 1966; De Jonckheere, 2002; Grace *et al.*, 2015). Cependant d'autres genres comme *Tetramitus, Willaertia* ou encore *Pharyngomonas* sont capables d'adopter une forme flagellée (Robinson *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 2013; Park, 2017). La plupart des amibes flagellées possèdent 2 ou 4 flagelles (Panek and Epik, 2012).

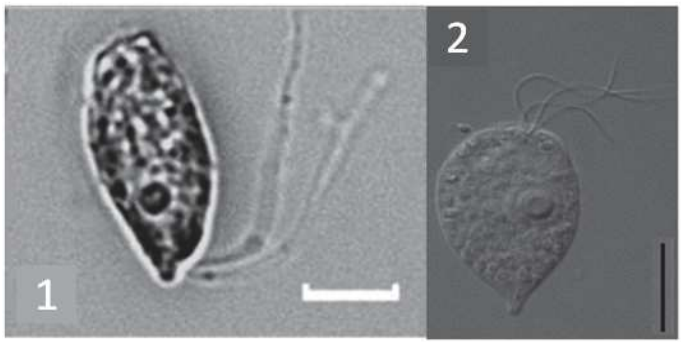


Figure 4. Formes flagellées des amibes des genres *Naegleria* (1) *Tetramitus* (2). Les amibes du genre *Naegleria* possèdent 2 flagelles et celles du genre *Tetramitus* 4 flagelles. **(1)** Echelle : 10 µm et **(2)** echelle : 20 µm. (Tiré de Xinyao *et al.*, 2006 et Park, 2017).

-La forme sociale

Comme pour la forme flagellée, certaines amibes peuvent adopter au cours de leur cycle de vie une forme particulière, la forme sociale. Cette forme est très étudiée chez l'amibe modèle *Dictyostelium discoideum* qui est capable de passer d'une vie unicellulaire comme les autres amibes libres à une vie pluricellulaire (Schaap, 2011) (Figure 5). Lorsque les amibes unicellulaires sont en situation de carence nutritive, elles se regroupent pour former « un limaçon » (slug). La limace composée de milliers de cellules va pouvoir migrer afin de trouver des conditions favorables pour les amibes puis former un sporocarpe composé d'une tige et d'un organe à son sommet qui contient des formes de résistance (spores). Lorsque les conditions sont favorables, les spores sont relâchées et germent pour donner des trophozoïtes (Schaap, 2011). Ce processus complexe implique de nombreux effecteurs et notamment l'AMPc qui intervient à de nombreuses étapes (Loomis, 2014; Schaap, 2016).

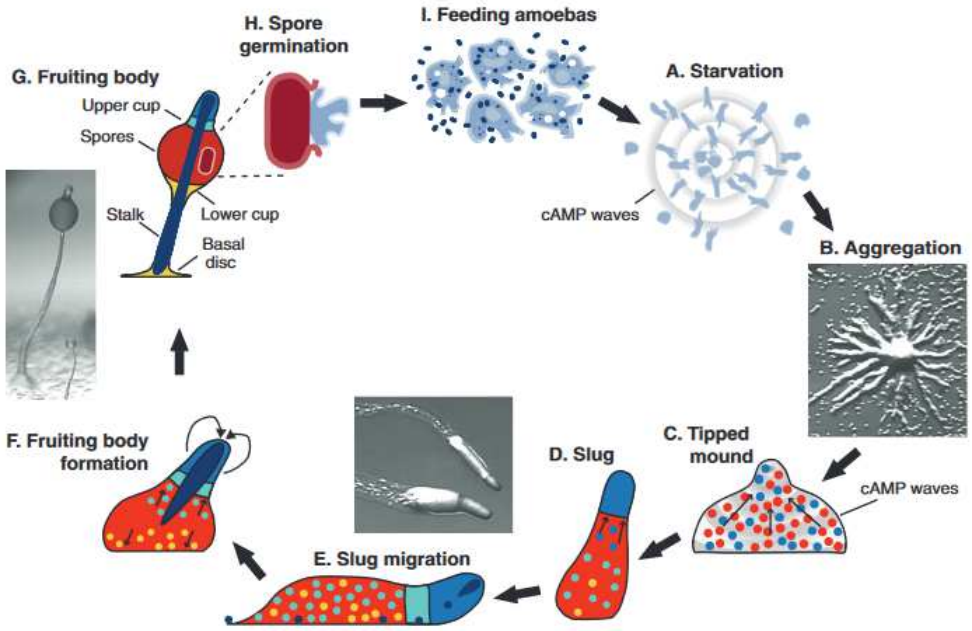


Figure 5. Schéma du cycle de vie de l'amibe *Dictyostelium discoideum*. (A) Une carence provoque une **(B)** agrégation des amibes sous l'effet de différentes molécules signal comme l'AMPc **(C) (D)** pour aboutir à la formation d'un limaçon. **(E)** Le limaçon migre pour trouver un environnement favorable **(F) (G)** et forme le sporocarpe qui comporte à son sommet un organe contenant des spores amibiennes. **(H)(I)** Lorsque les conditions sont favorables les spores sont relachées et libèrent des trophozoïtes. (Schaap, 2011).

1.2. Taxonomie

1.2.1. Les amibes libres

La taxonomie amibienne est complexe et soumise à une constante évolution. La grande diversité et le caractère polyphylétique de ce groupe n'a jamais permis d'obtenir une classification stable à ce jour.

Les premières espèces amibiennes ont été décrites et illustrées par Rösel von Rosenhorf en 1755 dans le papier *Der klein proteus*, Cependant le mot amibe a été utilisé pour la première fois en 1826 par Bory de St. Vincent. Les premières classifications amibiennes étaient réalisées par microscopie optique et basées sur le mode de locomotion ainsi que la morphologie et plus particulièrement la morphologie des pseudopodes (Schaeffer, 1918, 1926; Mast, 1926; Bovee, 1953) (Figure 6). D'autres éléments phénotypiques comme la division nucléaire ou l'organisation et la forme des inclusions cristallines ont également été proposés afin d'améliorer la classification des amibes (Schaeffer, 1918, 1926; Mast, 1926; Bovee, 1953). Ces éléments phénotypiques ont été très peu utilisés et l'arrivée de la microscopie électronique a permis une amélioration temporaire de la classification grâce à l'étude plus précise des différences structurales entres amibes, notamment au niveau de la structure des

sucres ancrés dans la membrane plasmique, formant des structures appelées glycostyles (Page, 1983; Page, 1987a; Page, 1987b).

L'apparition des techniques de biologie moléculaire a permis de faire évoluer plus rapidement et plus finement la classification des amibes. Les premières phylogénies moléculaires ont été réalisées en utilisant la séquence du gène SSU 18S rRNA. Ceci a permis de confirmer le caractère polyphylétique des amibes (Clark and Cross, 1988). En effet les auteurs ont comparé les séquences du gène SSU 18S rRNA de l'amibe *Naegleria gruberi* et de l'amibe *Acanthamoeba castellanii* (Gunderson and Sogin, 1986; Clark and Cross, 1988). D'autres études ont également permis d'appuyer ce caractère polyphylétique (Bhattacharya *et al.*, 1995; Bolivar *et al.*, 2001). Ceci a notamment été montré avec la comparaison des gènes SSU 18S rRNA de l'amibe *Vannella anglica* avec les deux amibes *A. castellanii* et *Vermamoeba vermiformis* (Sims *et al.*, 1999). A ce jour, les amibes appartiennent à 4 grands groupes taxonomiques : Les Amoebozoa, les Excavata, les Opisthokonta et le groupe des SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria) (Figure 7) (Lahr *et al.*, 2011). L'embranchement des Amoebozoa est le seul groupe comportant uniquement des représentants amibiens à ce jour (Figure 7).

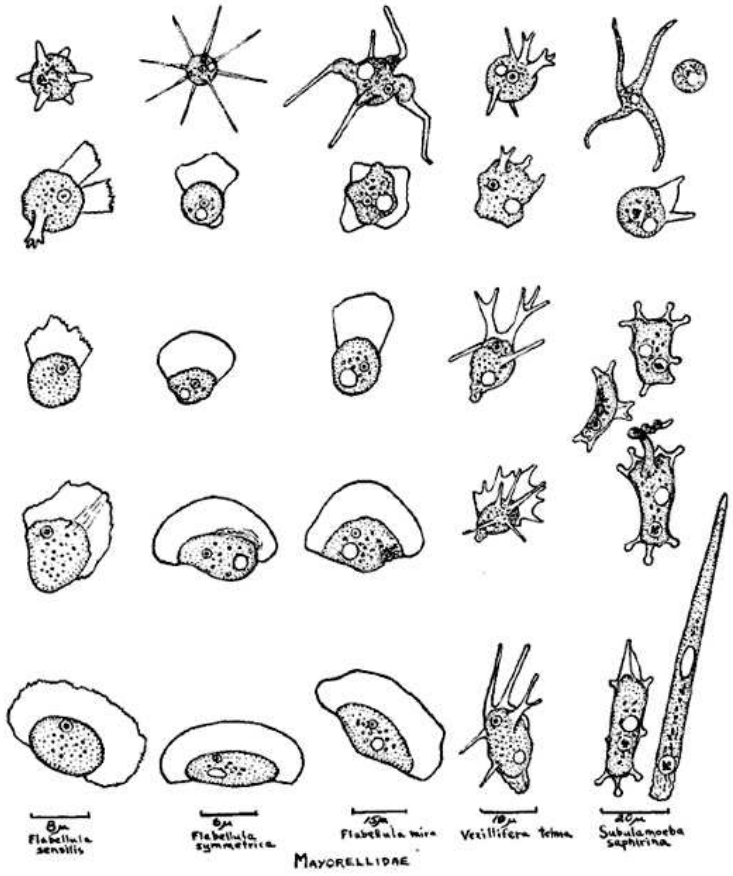


Figure 6. Illustration de différentes morphologies amibienne. Morphologies de 5 amibes appartenant à la famille des Mayorellidae. Les représentations en haut de la figure représentent les formes planctoniques et les autres représentations les formes trophozoïtes (Tiré de Bovee, 1953).

La classification des amibes s'est affinée et plusieurs phylogénies basées sur la séquence du gène SSU 18S rRNA ont été proposées au cours du temps (Bolivar *et al.*, 2001; Cavalier-Smith and Chao, 2003a, 2003b, Nikolaev *et al.*, 2005, 2006; Smirnov *et al.*, 2005). Des phylogénies moléculaires ont également été proposées en se basant sur les séquences des gènes de l'actine et protéines liées à l'actine (Kelleher *et al.*, 1995; Bhattacharya and Weber, 1997; Fahrni *et al.*, 2003), des gènes codés par le génome mitochondrial (Forget *et al.*, 2002; Nassonova *et al.*, 2010), des gènes de protéines

nucléaires (Baldauf, 2000) ou encore les séquences des espaceurs internes transcrits de l'ADNr 18S (ITS) (Nassonova *et al.*, 2010; Romeralo *et al.*, 2010). Une classification des eucaryotes a été réalisée en 2005 par un consortium de protistologues (Adl *et al.*, 2005). Cette classification inclut les résultats des recherches sur les caractères ultra-structuraux ainsi que les résultats des phylogénies moléculaires. De plus, pour simplifier la classification et les changements potentiels de celle-ci, les auteurs n'ont pas utilisé la hiérarchie taxonomique habituelle mais placé l'ensemble des eucaryotes dans 6 super-groupes (Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, chromalveolata et Excavata) eux-mêmes divisés en rangs.

L'utilisation de phylogénies multigéniques a permis une classification plus robuste des amibes (Tekle *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2017; Cavalier-Smith *et al.*, 2018). Par exemple, une classification de l'embranchement des Amoebozoa a été menée par phylogénie multigénique (Cavalier-Smith *et al.*, 2015). Cette classification a été réalisée grâce à l'alignement de 188 gènes concaténés pour 17 Amoebozoa. Selon cette étude, les Amoebozoa sont divisés en 2 clades, les Lobosa et les Conosa. Les Lobosa sont divisés en deux classes (Discosea et Tubulinea) et les Conosa en 3 classes (Variosea, Archamoeba et Mycetozoa). En 2016, une nouvelle classification a été faite par l'alignement de 187 gènes concaténés pour 29 Amoebozoa (Cavalier-Smith *et al.*, 2016). Ceci a permis de mettre en évidence une nouvelle classe, Les Cutosea, appartenant au clade des Lobosa au sein du phylum des Amoebozoa.

Les amibes étant ubiquitaires, de nouvelles espèces ont pu être identifiées dans des environnements aux conditions extrêmes. Ainsi, le nouveau genre *Fumarolamoeba* a été décrit après isolement de l'amibe *Fumarolamoeba ceborucoi* près de fumeroles sur un volcan au Mexique qui est capable de croître à une température de 50°C (De Jonckheere *et al.*, 2011a). Le nouveau genre *Selenaion* a été caractérisé suite à l'isolement d'une amibe d'une mine de sel en Pologne (Park *et al.*, 2012) et l'espèce *Arcella peruviana* a été nouvellement identifiée dans une tourbière tropicale en Amazonie (Reczuga *et al.*, 2015).

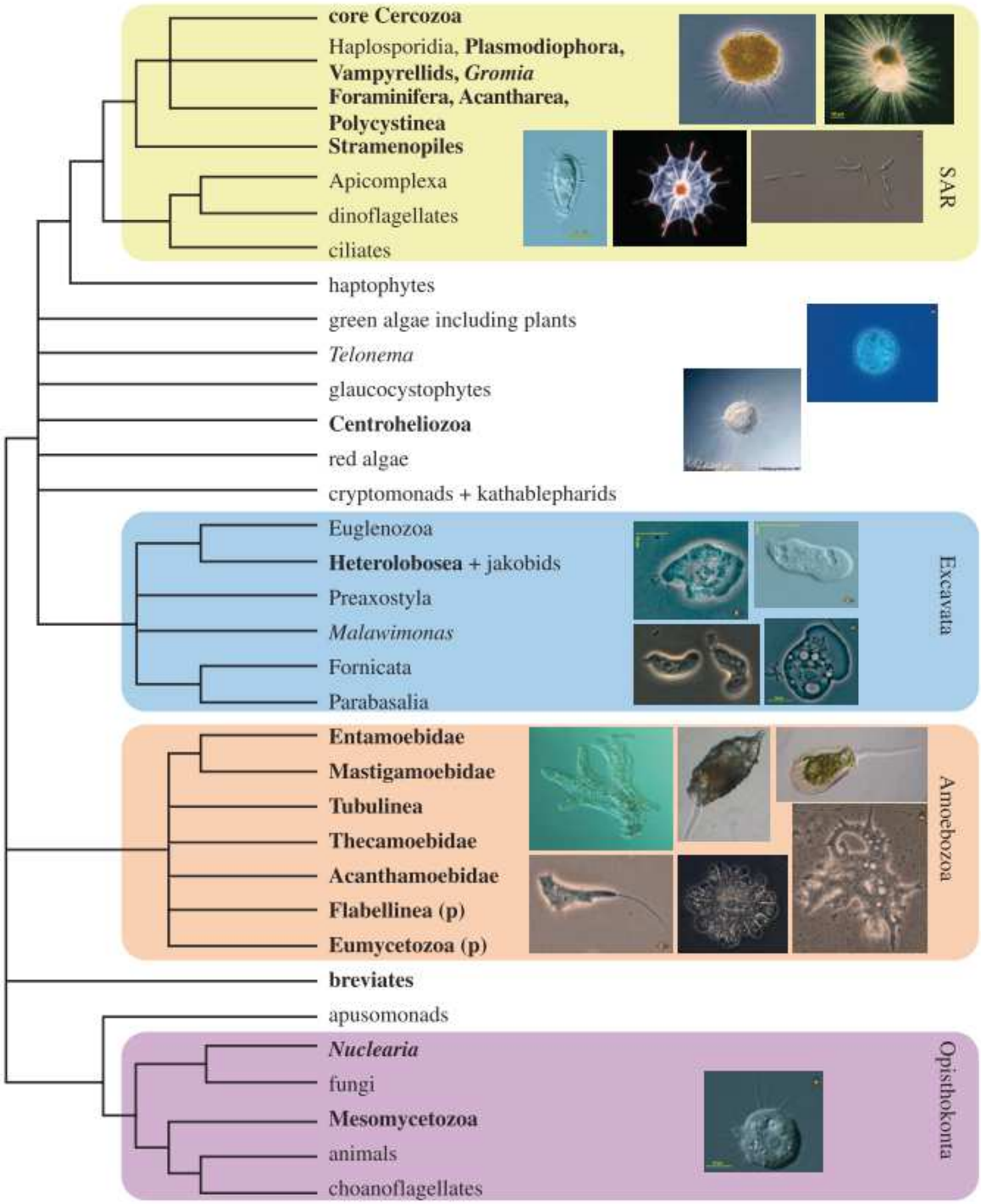


Figure 7. Localisation des amibes sur l'arbre phylogénétique simplifié des eucaryotes. Arbre phylogénétique adapté de Parfrey et al., 2010 basé sur la séquence du gène SSU 18S rRNA. Les grands groupes taxonomiques comportant des lignées amibiennes sont colorés. Les lignées avec des représentants amibiens sont en gras. Seul l'embranchement des Amoebozoa comporte uniquement des représentants amibiens (Tiré de Lahr *et al.*, 2011).

1.2.2. Les amibes libres marines

La diversité des amibes marines est moins connue que celle des amibes d'eau douce qui sont plus étudiées. Ceci a été confirmé par une étude à grande échelle initiée par l'expédition Tara Océan. Cette expédition par bateau à travers le monde a permis d'échantillonner la colonne d'eau afin de caractériser le plancton dont les protistes. A travers diverses publications, il a été montré que la fraction des eucaryotes planctoniques, et en particulier les protistes hétérotrophes, est plus diversifiée que ce qui avait été anticipé (Vaulot *et al.*, 2002; de Vargas *et al.*, 2015; Biard *et al.*, 2016; Flegontova *et al.*, 2016). En effet, de Vargas et collaborateurs ont réalisé un séquençage de la boucle V9 de l'ADNr 18S de 334 échantillons d'eaux prélevées dans la zone photique (zone traversée par la lumière ou la photosynthèse est possible) pour déterminer la diversité des eucaryotes (de Vargas *et al.*, 2015). Ils ont déterminé que l'abondance des protistes est majoritaire dans la fraction pico-nanoplanctonique, c'est-à-dire la fraction contenant des organismes d'une taille de 0,8 à 5 µm. De manière intéressante presque la moitié des OTUs de cette fraction n'ont pas pu être assignés soulignant ainsi notre méconnaissance de la diversité des protistes marins. De plus, ils estiment que les océans abritent environ 16 millions d'espèces eucaryotes et non 0,5 à 2 millions comme estimé précédemment (de Vargas *et al.*, 2015). L'ensemble de ces études globales permet d'avoir un aperçu de la très grande diversité des organismes eucaryotes marins mais ne permet pas de déterminer finement cette diversité et notamment celle des amibes marines.

L'ouvrage dédié aux amibes marines publié par Frederick C. Page en 1983 reste donc une référence d'un point vu descriptif (Page, 1983). Dans cet ouvrage, il décrit les méthodes de cultures adaptées ainsi que la manière de réaliser des observations pertinentes permettant la classification des amibes marines. Pour réaliser une classification la plus précise possible il s'est appuyé sur différents caractères d'identification comme la morphologie des trophozoïtes et leurs tailles, les inclusions cytoplasmiques, la structure du noyau et le profil de division, l'observation des formes alternatives de certaines amibes (forme flagellée, forme planctonique, forme kystique), les caractères physiologiques et l'ultra-structure comme l'aspect du glycocalyx en microscopie électronique à transmission. A l'aide de l'ensemble de ces critères, il a pu répertorier 22 genres amibiens confirmés aujourd'hui par phylogénies moléculaires. Ces 22 genres sont *Hartmannella* (maintenant *Vermamoeba*), *Saccamoeba, Gruberella, Nolandella, Rhizamoeba, Vahlkampfia, Thecamoeba, Heteramoeba, Paratetramitus, Platyamoeba* (maintenant *Vannella*), *Mayorella, Vannella, Dactylamoeba, Flabellula, Paraflabellula, Vexillifera, Pseudoparamoeba, Acanthamoeba, Protacanthamoeba, Paramoeba, Corallomyxa et Stereomyxa*.

Depuis, le nouveau genre *Parvamoeba* a été décrit par microscopie et appartient aux Lobosa (Rogerson, 1993). Les outils moléculaires ont également permis de nouvelles identifications.

L'isolement d'une amibe en Italie près de fumerolles et capable de se développer à 54 °C a permis de définir une nouvelle espèce et un nouveau genre amibien (De Jonckheere *et al.*, 2011b). Il s'agit du genre *Oramoeba* et de l'espèce *Fumarolia* appartenant au groupe des Heterolobosea. L'isolement d'une autre amibe dans du sédiment près de fumerolles en Italie a permis de définir le genre *Marinamoeba* et l'espèce *thermophila* (De Jonckheere *et al.*, 2009). Les genres *Squamamoeba* (Kudryavtsev and Pawlowski, 2013), *Trachyrhizium* (Shiratori and Ishida, 2016)et *Atrichosa* (Cavalier-Smith *et al.*, 2016) ont également été déterminés. On peut citer la famille *Anaeramoebidae* (Táborský *et al.*, 2017), l'espèce *Longichromatophora* appartenant au genre *Paulinella* (Kim and Park, 2016) et les espèces M*ylnikovi, Anglica, Longa, Oxoniensis, Borokensis* appartenant au genre *Limnofila* (Bass *et al.*, 2009) récemment décrit. La classification et la description du genre *Vampyrella* ont a été affinée (Hess *et al.*, 2012; Berney *et al.*, 2013). En zone polaire, le genre *Vermistella*, la sous espèce *Neoparamoeba aestuarina antarctica* et l'espèce *Vannella contorta* ont été nouvellement identifiés par phylogénies moléculaires et observations suite à un échantillonnage de sédiment et d'eau (Moran *et al.*, 2007).

1.2.3. Effet des facteurs environnementaux sur la diversité amibienne observée

Divers paramètres environnementaux peuvent largement influencer la distribution des amibes. Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de différents facteurs comme la salinité, le type de fraction (sédiment, eau de mer), la zone géographique ou encore la temporalité. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur des études menées en milieu marin.

La concentration en sel dans l'environnement peut modifier la composition des communautés amibiennes. Ceci a pu être observé pour l'espèce *Acanthamoeba rhysodes* retrouvée dans les sols intertidaux d'une mangrove d'Inde (Bhattacharya *et al.*, 1987). Un échantillonnage des sols de surface sur une durée de deux ans au niveau de 5 sites a mis en évidence une augmentation importante du nombre d'*A. rhysodes* pendant les épisodes de moussons lorsque la salinité est minimale, tandis que la valeur la plus faible en amibes apparaît juste avant les moussons lorsque la concentration en sel est la plus élevée (Bhattacharya *et al.*, 1987). Une deuxième étude s'est intéressée à la diversité amibienne dans le sédiment de la baie de Niva au Danemark qui est un environnement saumâtre. Elle s'est focalisée sur la diversité cryptique par clonage, culture et observation par microscopie électronique à transmission en faisant varier la salinité. De manière intrigante, 5 espèces dont l'espèce *Vannella danica* non observées en condition salée initiale sont observées après deux mois en condition eau douce. De plus après restauration de la salinité l'amibe

Saccamoeba sp., absente jusqu'à présent, a pu être observée. Cette expérience suggère donc qu'il existe une diversité cryptique et qu'une modulation de la salinité peut permettre d'isoler une plus grande diversité amibienne (Smirnov, 2007).

Plusieurs études se sont intéressées au sédiment tandis que d'autres à la colonne d'eau. La variation spatiale et temporelle des abondances des amibes benthiques du sédiment de la mer de Clyde en Ecosse a été mesurée durant 1 an (Butler and Rogerson, 1995). L'abondance des amibes a été suivie par méthode de culture et observations à partir de 4 sites possédant des types de sédiment différents. Il a été montré que le l'abondance des amibes est en moyenne plus importante et plus stable dans le temps dans du sédiment fin que dans du sédiment sableux. De plus, l'abondance des amibes change significativement en fonction des mois sans pour autant montrer d'effet saisonnier clair (Butler and Rogerson, 1995). Une autre étude s'est focalisée sur la distribution verticale des amibes sur les 5 premiers centimètres de sédiment de la baie de Niva au Danemark, avec un pas de 2 mm (Smirnov and Thar, 2004). Les plus grandes abondances et diversité ont été observées à une profondeur comprise entre 2 et 16 mm. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'en surface les amibes sont consommées par divers mollusques et crustacés et qu'en zone profonde le manque d'oxygène et l'augmentation en H_2S défavorise l'exploration des trophozoïtes. Les amibes des genres *Vannella* et *Cochliopodium* sont les plus abondantes et distribuées sur l'ensemble de la carotte de sédiment. Au contraire, d'autres genres sont localisés à des profondeurs spécifiques mettant en évidence que même les kystes des espèces capables d'en produire ne s'y trouvent pas. L'ensemble de ces résultats suggère que certains genres amibiens possèdent des préférences écologiques (Smirnov and Thar, 2004). Concernant la colonne d'eau, un échantillonnage d'eaux de surface au niveau de 5 sites contrastés de l'île de Sapelo en Géorgie a mis en évidence une diversité amibienne différente en fonction des sites (Munson, 1992). La diversité suivie par culture et observation a montré que certaines espèces comme *Vannella mira* et *Paramoeba aestuarina* sont présentes dans presque tous les sites tandis que certaines espèces comme *Vexillifera* sp. et *Flabellula citata* ne sont présentes qu'à un seul site (Munson, 1992).

Concernant les facteurs biotiques pouvant influencer la diversité et l'abondance des amibes, différentes études se sont intéressées aux amibes associées aux algues. Une première étude de 1991 a suivi l'abondance des amibes sur cinq algues durant un an par méthode d'enrichissement. Les auteurs ont notamment montré que l'abondance amibienne est supérieure sur les algues brunes *Fucus* et *Laminaria* pendant les mois d'été et que les algues blessées comportent plus d'amibes à leurs surfaces probablement parce que la densité bactérienne est plus importante. De plus, il n'a pas été mis en évidence d'effet saisonnier. Par observation microscopique, ils ont identifié 27 espèces différentes appartenant notamment aux genres *Vannella, Flabellula, Vermamoeba, Mayorella, Paramoeba* et *Vexillifera* (Rogerson, 1991). Une autre étude très similaire a été menée en 2000 et

des résultats proches ont été trouvés. Cependant, les auteurs ont comparé le nombre d'amibes associées aux algues avec le nombre d'amibes associées à la colonne d'eau et ont pu montrer que celles-ci sont largement plus abondantes à la surface des algues (Armstrong *et al.*, 2000). Ces deux études suggèrent que les amibes sont un des prédateurs majeurs des bactéries à la surface des algues.

Certaines espèces de *Paramoeba* sont responsables de pathologies chez les poissons ciblant les branchies. Une étude a donc suivi la distribution spatiale et temporelle des amibes du genre *Paramoeba* en Tasmanie près de fermes d'élevage de saumon (Douglas-Helders *et al.*, 2003). Les résultats montrent que l'abondance de *Paramoeba* est supérieure en été et que l'échantillonnage le plus loin des cages de poisson (1100m) présente l'abondance en *Paramoeba* la plus faible (Douglas-Helders *et al.*, 2003). Ces résultats confirment que les fermes d'élevage sont un environnement favorable pour les *Paramoeba*.

Les études présentées précédemment montrant l'impact de divers facteurs environnementaux sur la distribution et la diversité amibienne ont été menées par méthodes de culture et observation. Des études plus globales ont été réalisées grâce à l'apparition des méthodes de séquençage haut débit.

Une étude réalisée par Kim et collaborateurs a suivi la dynamique temporelle des eucaryotes à la station océanique de San Pedro en Californie aux Etats-Unis (Kim *et al.*, 2014). De l'eau a été prélevée mensuellement pendant 10 ans à 4 profondeurs différentes (5 mètres, profondeur maximum de chlorophylle, 150 mètres et 500 mètres), couvrant ainsi les transitions de température, lumière et oxygène avec une zone anoxique permanente à 500 mètres. Les résultats ont mis en évidence des communautés différentes entre la zone profonde et la zone de surface suggérant une adaptation spécifique des différents taxons en fonction de la profondeur. De plus, les résultats montrent une dynamique temporelle plus importante à 5 mètres qu'en profondeur ou les communautés eucaryotes sont plus stables. Un effet saisonnier a pu être identifié à 5 et 150 mètres de profondeurs mais pas à 500 mètres de profondeur. Les résultats suggèrent un effet cyclique de la diversité des communautés eucaryotes sur une période d'une année (Kim *et al.*, 2014).

Une autre étude réalisée dans le bassin de Cariaco au Venezuela a suivi la dynamique spatiale des communautés de protistes (Orsi *et al.*, 2011). Des prélèvements ont été réalisés sur 3 sites à 3 profondeurs différentes, c'est-à-dire au-dessus de l'interface oxique / anoxique, au niveau de l'interface et plus en profondeur. Les résultats ont révélé que la structure des communautés de protistes est différente entre deux sites. De plus, comme pour l'étude présentée précédemment, les communautés de protistes ne sont pas les mêmes en fonction de la profondeur de la colonne d'eau avec peu d'OTUs partagés entre deux profondeurs différentes (Orsi *et al.*, 2011).

Il existe de nombreuses autres études mettant en évidence que la structuration des communautés de protistes est modulée par divers facteurs environnementaux mais également par les interactions biotiques entre organismes co-occurrents (Georges *et al.*, 2014; Genitsaris *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017; Berdjeb *et al.*, 2018). Ainsi, suite à des variations environnementales, des taxons normalement peu abondants peuvent apparaître majoritaires sur une courte période (Genitsaris *et al.*, 2015).
Pour conclure, l'écologie et la diversité complexe des protistes comprenant les amibes restent assez méconnues en milieu marin. Les premières études par cultures et observations ont permis de commencer à appréhender la diversité des protistes et de mettre en évidence l'impact de facteurs comme la salinité, la teneur en oxygène et la géographie sur la distribution des protistes. L'apparition des méthodes de séquençage haut débit ont permis de mener des études plus globales. Cependant, ces analyses globales peuvent masquer des informations plus fines notamment concernant les taxons peu abondants. Afin de mieux appréhender la diversité, la dynamique des protistes et les réseaux trophiques en milieu marin, des études intégratives doivent encore être menées an alliant approche moléculaire, observation microscopique et méthode de culture.

Bien que la diversité et l'écologie des amibes libres restent encore à explorer dans de nombreux environnements, en milieu marin, les amibes appartenant aux genres *Vannella* et *Paramoeba* sont fréquemment isolées et décrites et paraissent donc relativement abondantes et ubiquitaires

1.3. Les amibes du genre *Vannella*

La taxonomie des amibes du genre *Vannella* a été soumise à de nombreux changements du fait de la difficulté de les classifier sur des caractères morphologiques par microscopie optique. En effet, les Vannellides sont toutes aplaties avec une forme d'éventail et possèdent peu de critères morphologiques permettant de les discriminer (Figure 8). Initialement, les amibes Vannellides appartenaient aux 4 genres *Flabellula*, *Rugipes*, *Unda* et *Hyalodiscus* (Schaeffer, 1926). Le genre *Vannella* a été établi par Bovee en 1965 et le genre *Platyamoeba* par Page en 1969 (Jahn and Bovee, 1965; Page, 1969). Par la suite les genres *Pessonella, Clydonella* et *Lingulamoeba* ont été créés (Sawyer, 1975a; Sawyer, 1975b). Dans une proposition de classification des amibes nues, F. Page créa la famille des *Vannellidae* incluant les genres *Vannella* et *Platyamoeba* (Page, 1987b). L'apparition de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence des différences de glycostyles (forme du glycocalyx) à la surface des amibes des genres *Vannella* et *Platyamoeba* (Page and Blakey, 1979). Ce critère a été pendant un moment le seul moyen de discriminer les *Vannella,* qui possèdent des glycostyles, des *Platyamoeba* qui n'en possèdent pas (Figure 8). Cependant, ce caractère morphologique n'était pas suffisant pour faire une classification fiable des genres *Vannella* et

Platyamoeba. Les phylogénies moléculaires basées sur la séquence du gène SSU 18S rDNA ont permis de confirmer la présence des Vannellides au sein des Amoebozoa en tant que lignée monophylétique bien séparé des autres groupes et comportant les 4 genres *Vannella, Platyamoeba, Clydonella* et *Lingulamoeba* (Cavalier-Smith *et al.*, 2004; Smirnov *et al.*, 2005). Après cette étude la dichotomie entre *Vannella* et *Platyamoeba* n'était pas déterminée car les deux genres ne formaient pas deux clades distincts. Une étude plus récente s'est intéressée uniquement aux Vannellides permettant de montrer que la distinction entre *Vannella* et *Platyamoeba* est fausse et propose de regrouper ces dernières au sein des *Vannella* et ainsi supprimer le genre *Platyamoeba* (Smirnov *et al.*, 2007). Ils ont également mis en évidence que la famille des *Vannellidae* est composée des 4 genres *Vannella, Ripella, Clydonella* et *Lingulamoeba* et que le genre *Vannella* est lui-même composé de 30 espèces (Smirnov *et al.*, 2007). De manière intéressante, cette nouvelle phylogénie des *Vannellidae* montre que les *Vannella* marines sont au sein d'un seul et même clade distinct et sont plus proches entres elles qu'avec les *Vannella* issues d'eau douce ou d'eau saumâtre (Figure 9).

La notion d'espèce a toujours été soumise à débats et notamment chez les amibes nues où il est parfois difficile de déterminer avec exactitude une espèce en se basant sur des critères morphologiques, moléculaires ou les deux combinés. Afin de trouver une solution, une étude a réalisé des phylogénies moléculaires à l'aide de trois marqueurs sur 2 clades d'amibe du genre *Vannella* (Nassonova *et al.*, 2010). Les trois marqueurs utilisés sont la séquence du gène SSU 18S rDNA, les séquences des ITS 1 et 2, la séquence du gène COI qui correspond à la séquence de la petite sous unité de la cytochrome c oxydase. Ceci a permis de montrer que le gène COI semble être une bonne piste d'étude car il semble pouvoir permettre une meilleure classification des espèces de *Vannella* (Nassonova *et al.*, 2010).

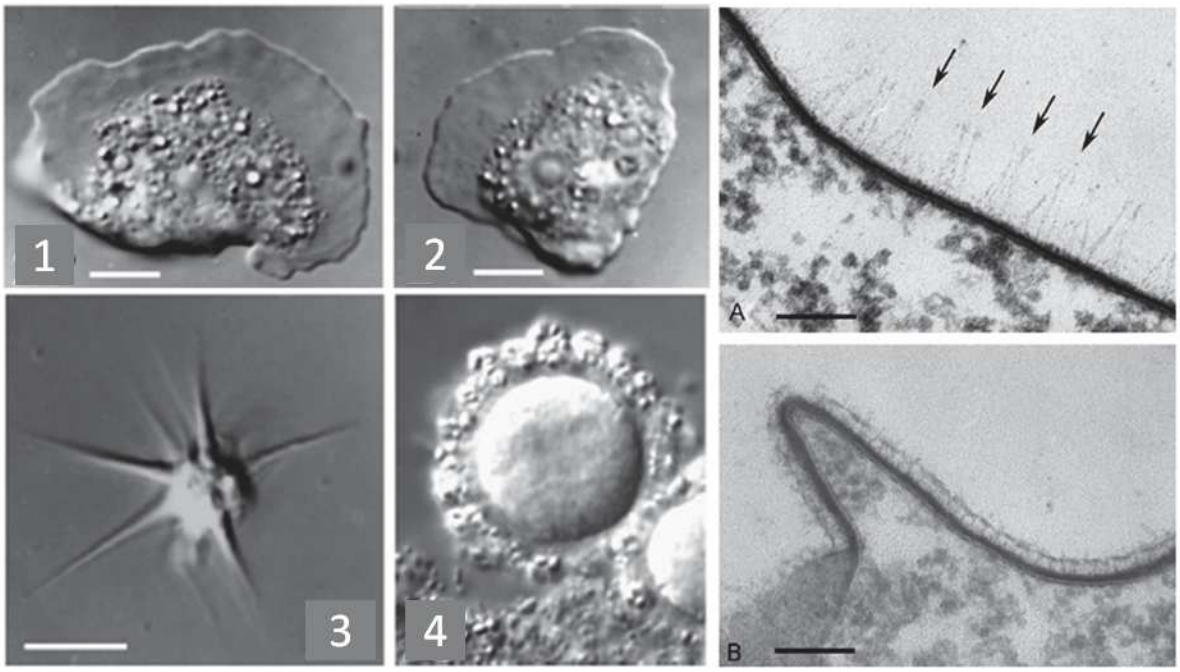


Figure 8. Morphologie de l'amibe *Vannella danica* (1, 2, 3 et 4) et organisation du glycocalyx (A et B). Morphologie de la forme trophozoïte **(1 et 2)**, la forme pélagique **(3)** et la forme kystique **(4)** de l'amibe *Vannella danica*. Les trophozoïtes du genre *Vannella* sont aplatis en forme d'éventail. Echelle : 10µm. **(A)** Surface d'une amibe du genre *Vannella* possédant des glycostyles indiqués par des flèches. **(B)** Surface d'une amibe du genre *Platyamoeba* ne possédant pas de glycostyles. Echelle : 100 nm. (Tiré de Smirnov *et al.*, 2007)

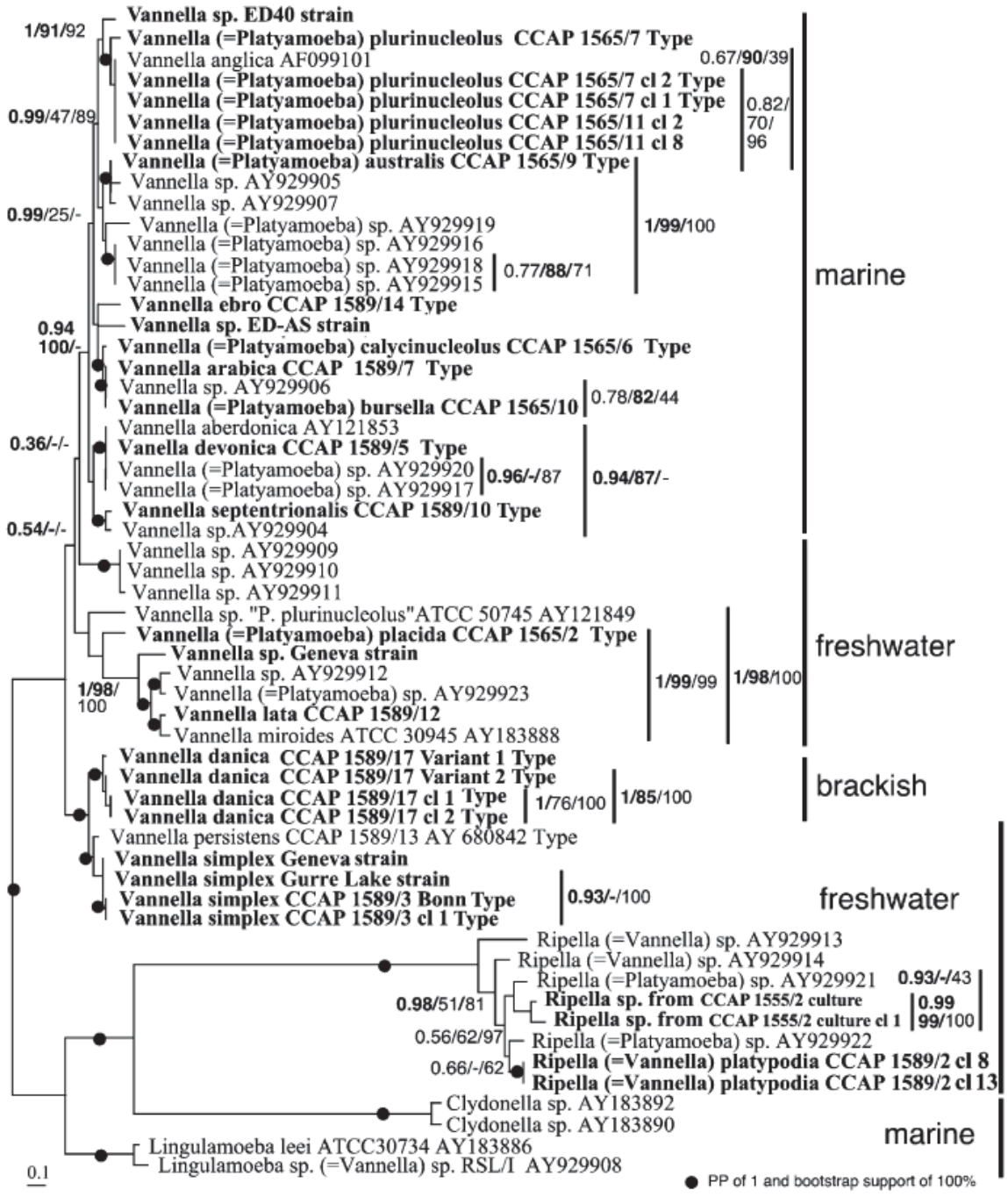


Figure 9. Phylogénie des amibes appartenant à la famille des *Vannellidae* basée sur la séquence du gène SSU 18S rDNA. La famille des *Vannellidae* est composée des 4 genres *Vannella, Ripella, Clydonella* et *Lingulamoeba*. Les amibes du genre *Vannella* issues de l'environnement marins sont dans un seul clade distinct des *Vannella* issues de l'eau douche ou saumâtre. (Smirnov *et al.*, 2007)

1.4. Les amibes du genre *Paramoeba*

Les amibes du genre *Paramoeba* sont également communes dans les environnements marins et étudiées car certaines espèces sont responsables de pathologies en ciblant la branchie (Amoebic Gill Disease) de divers organismes (Page, 1973; Munday *et al.*, 2001; Feehan *et al.*, 2013; Oldham *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017). Comme pour les autres amibes, les premières classifications étaient faites par observation des caractères morphologiques rendant la taxonomie instable jusqu'à l'utilisation des outils moléculaires. Le genre *Paramoeba* a été défini en 1896 par le protistologue F. Schaudinn après avoir décrit l'amibe *Paramoeba eilhardy*. La famille des *Paramoebidae* a elle été définie par Poche en 1913. L'espèce *schaudinni* appartenant au genre *Paramoeba* a été décrite en 1922 par Faria et collaborateurs (Faria *et al.*, 1922). Par la suite, les espèces *perniciosa, pemaquidensis, aestuarina* et *invadens* ont été décrites (Sprague *et al.*, 1969; Page, 1970; Jones, 1985). La classification de ces espèces a été réalisée par microscopie optique et électronique à l'aide de la forme et de la taille des cellules, de la taille des noyaux et mitochondries et des glycostyles (Cann and Page, 1982; Page, 1983, 1987b). La classification a également été effectuée grâce à une particularité des *Paramoeba*. En effet les amibes de ce genre possèdent toutes un parasome appelé aussi second noyau qui est en réalité un endosymbionte eucaryotique associé au noyau (Page, 1987b; Nowak and Archibald, 2018) (Figure 10). Cet endosymbionte eucaryote non photosynthétique appartient à la classe des *Kintoplastida* et au genre *Perkinsela* (Sibbald *et al.*, 2017). Suite à cette classification Page a déterminé les nouveaux genres *Neoparamoeba* et *Pseudoparamoeba* sur la base de différences au niveau des glycostyles (Page, 1987b; Dyková *et al.*, 2000). Aujourd'hui encore, l'utilisation de ces glycostyles pour différencier les 3 genres fait débat et soulève la question de savoir si ces genres appartiennent réellement à des clades distincts (Feehan *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2014).

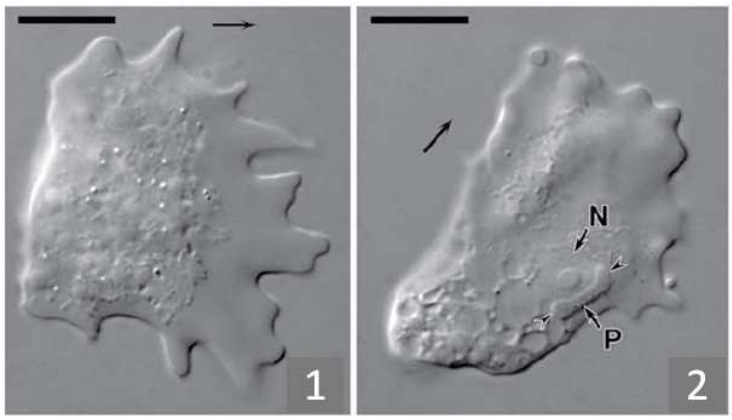


Figure 10. Morphologie de l'amibe *Paramoeba atlantica* par microscopie optique. (1) Trophozoïte de l'amibe *Paramoeba atlantica* avec la direction de déplacement indiqué par la flèche. **(2)** Trophozoïte de l'amibe *Paramoeba antlantica* avec N qui indique le noyau et P qui indique le parasome de l'amibe. Le parasome est une particularité des amibes du genre *Paramoeba* qui possèdent un endosymbionte eucaryotique associé au noyau. Echelle : 10 µm. (Tiré de Kudryavtsev *et al.*, 2011)

Par des phylogénies moléculaires basées sur la séquence du gène SSU 18S rDNA, les espèces *branchiphila, perurans, atlantica* et *longipodia* ont été déterminées au sein du genre *Paramoeba* (Dyková *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2007; Kudryavtsev *et al.*, 2011; Volkova and Kudryavtsev, 2017) (Figure 11). La famille des *Paramoebidae* est composée des genres *Paramoeba, Korotnevella, Neoparmoeba* et *Pseudoparamoeba* et le genre *Paramoeba* est lui-même composé des 9 espèces *perurans, eilhardy, aestuarina, pemaquidensis, branchiphila, invadens, atlantica, perniciosa* et *longipodia* (Kudryavtsev *et al.*, 2011; Sibbald *et al.*, 2017; Volkova and Kudryavtsev, 2017; Nowak and Archibald, 2018).

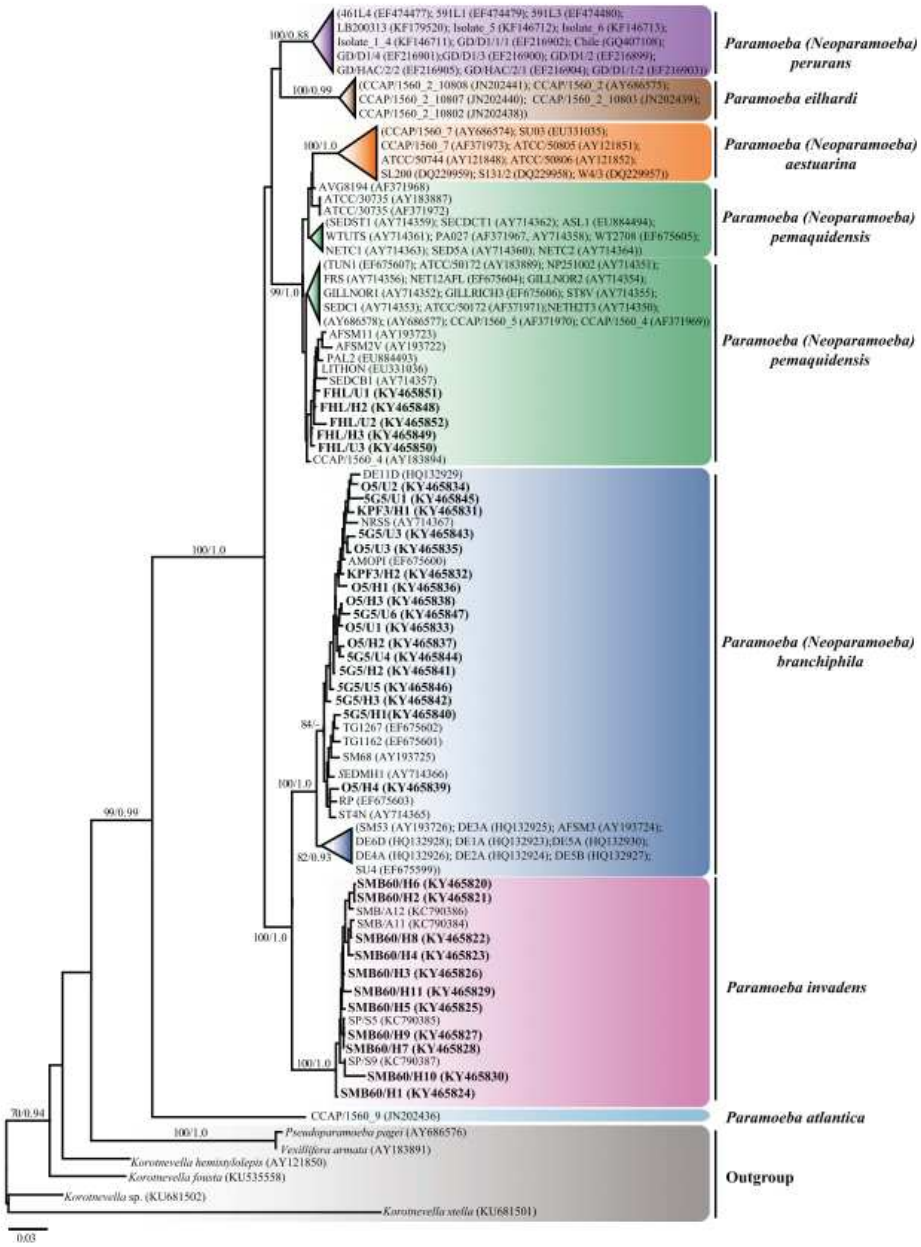


Figure 11. Phylogénie des amibes appartenant au genre *Paramoeba* basée sur la séquence du gène SSU 18S rDNA. Le genre *Paramoeba* contient les 9 espèces *perurans, eilhardy, aestuarina, pemaquidensis, branchiphila, invadens, atlantica, perniciosa* (non représentée ici) et *longipodia* (non représentée ici). (Sibbald *et al.*, 2017)

2. La phagocytose

Elie Metchnikoff fut le premier à décrire le processus de phagocytose en 1882 (Cavaillon and Legout, 2016). Pour cette découverte et ces travaux, il reçut en 1908 le prix Nobel. Il est considéré comme le père de l'immunologie « naturelle » appelée aujourd'hui immunité innée. Elie Metchnikoff utilisait des organismes transparents et réalisait des expérimentations simples suivies d'observations directes. L'histoire la plus connue concerne l'utilisation de larves d'étoiles de mer transparentes et d'épines de roses. En effet, après avoir blessé les larves, Elie Metchnikoff observa la migration et l'accumulation de cellules au niveau des blessures, les phagocytes (Gordon, 2008). Par différentes techniques de microscopies et de marquages, Elie Metchnikoff a notamment montré, que la phagocytose est un processus actif impliquant des organismes vivants, qu'il y a une acidification des vacuoles avec une destruction et une digestion des micro-organismes ingérés (Gordon, 2008).

2.1. Un processus conservé

La phagocytose est définie par l'internalisation de grosses particules, c'est-à-dire des particules d'une taille supérieure à 0,5 µm, au sein d'une vacuole appelée phagosome. Contrairement à la pinocytose, la phagocytose implique une reconnaissance des proies par des récepteurs exprimés à la surface des cellules phagocytaires (Flannagan *et al.*, 2012; Rosales and Uribe-Querol, 2017; Dunn *et al.*, 2018).
La phagocytose telle que nous la connaissons aujourd'hui est impliquée dans de nombreux processus biologiques (Figure 12). Cependant, sa première fonction chez les organismes unicellulaires concerne la nutrition par internalisation d'autres organismes comme source nutritive. La nutrition représente toujours la fonction principale de la phagocytose chez les organismes unicellulaires comme les protistes phagotrophes tel que les amibes (phagotrophie). Au cours de l'évolution, des changements complexes se sont opérés et des nouvelles fonctions biologiques de la phagocytose ont émergées (Desjardins *et al.*, 2005). Chez les organismes multicellulaires, la phagocytose peut avoir un rôle lors du remodelage des tissus pour le recyclage des cellules mortes. Ceci a notamment été montré chez l'organisme modèle *C. elegans* (Reddien and Horvitz, 2004). Les cellules qui internalisent les cellules apoptotiques ne sont pas des phagocytes professionnels mais les cellules voisines de celles-ci (Metzstein *et al.*, 1998; Reddien and Horvitz, 2004). Chez les vertébrés supérieurs, des phagocytes professionnels sont impliqués dans le recyclage des cellules mortes lors de l'embryogénèse (Lichanska and Hume, 2000). Enfin, la phagocytose est aussi impliquée chez les phagocytes professionnels pour l'élimination des agents infectieux. L'immunité des invertébrés est principalement innée alors que les vertébrés possèdent une immunité innée et adaptative. Par

exemple, chez *Drosophila melanogaster* l'immunité innée a été bien décrite et les hémocytes de *D. melanogaster* possèdent des récepteurs impliqués dans la reconnaissance de bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Melcarne *et al.*, 2019). Chez les vertébrés, comme l'Homme, l'immunité adaptative est largement décrite. Elle est caractérisée par l'existence de cellules immunitaires spécifiques, les lymphocytes, qui assurent la très grande spécificité de reconnaissance des antigènes ainsi que la mémoire immunitaire. Certains de ces lymphocytes, les lymphocytes T, nécessitent la présentation d'antigènes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, suite à une rencontre d'un agent infectieux permettant une réponse spécifique et adaptée. Chez les vertébrés il existe donc une interdépendance entre la réponse immunitaire innée et adaptative notamment au travers de la présentation antigénique via la phagocytose des pathogènes (Dempsey *et al.*, 2003).

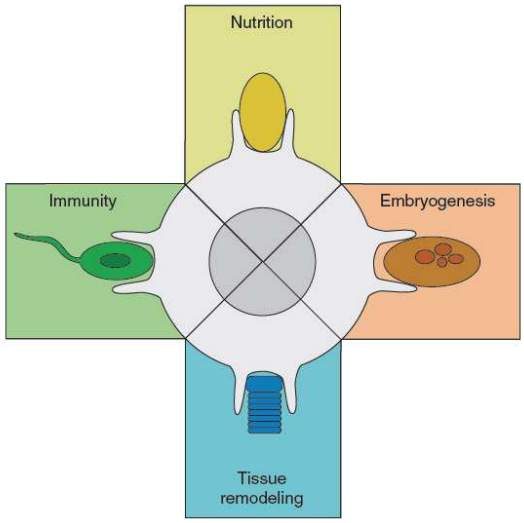


Figure 12. Fonctions biologiques majeures de la phagocytose. Chez les eucaryotes unicellulaires comme les amibes elle est impliquée dans la nutrition alors que chez eucaryotes multicellulaires elle a évolué pour être impliquée dans l'embryogénèse, le remodelage tissulaire et l'immunité. (Desjardins *et al.*, 2005)

Le processus de phagocytose reste très conservé entre des organismes distants. Par différentes approches, un certain nombre de protéines avec des domaines conservés voire des protéines orthologues ont été identifiées entre les phagocytes professionnels chez les animaux et les amibes. Ceci a notamment été montré chez les amibes des genres *Acanthamoeba* (Yan *et al.*, 2004; Siddiqui and Khan, 2012; Clarke *et al.*, 2013) et *Dictyostelium* (Cornillon *et al.*, 2000; Bozzaro *et al.*, 2008; Sattler *et al.*, 2018). Une étude plus globale a été menée en 2010 par Boulais et collaborateurs (Boulais *et al.*, 2010). Les auteurs ont comparé le protéome du phagosome de trois organismes distants qui utilisent la phagocytose : la souris, la drosophile et l'amibe *D. discoideum*. Ces travaux ont mis en évidence que les éléments du cytosquelette, les protéines associées au trafic cellulaire et

les GTPase sont très conservées entre les trois organismes. De plus, une large proportion des protéines du phagosome de la souris ont des orthologues chez la drosophile et *D. discoideum*. Une analyse comparative sur 39 taxa (*Rattus norvegicus, Plasmodium falciparum, Saccharomyces cerevisiae, D. discoideum, Paramecium tetraurelia, Homo sapiens, Canis familiaris* …) a été menée afin de déterminer l'origine des 1385 protéines du phagosome de la souris. Ils ont identifié que 73,1% de ce protéome est conservé chez les organismes eucaryotes unicellulaires comme les amibes qui utilisent la phagocytose pour leur nutrition (Figure 13). 16,7% du protéome est conservé chez les organismes qui utilisent l'immunité innée et 10,2% du protéome est conservé chez des organismes où le phagosome joue un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (Boulais *et al.*, 2010).

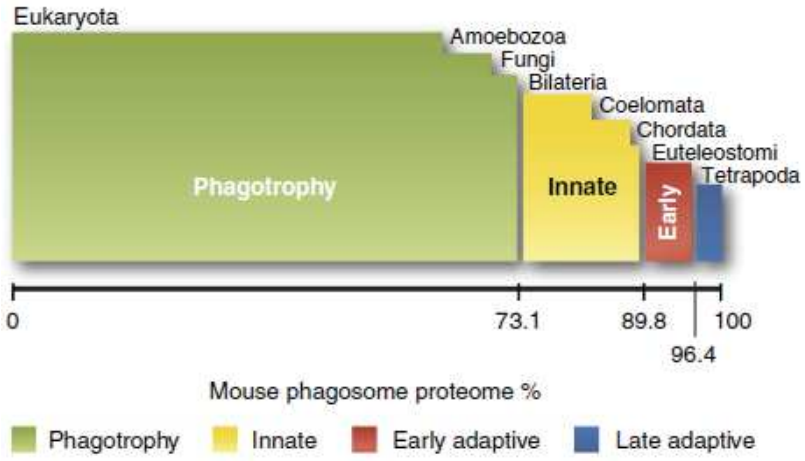


Figure 13. Conservation du protéome du phagosome au cours de l'évolution. 73.1% du protéome du phagosome de la souris est conservé chez les organismes eucaryote unicellulaires comme les amibes. Ainsi ces protéines conservées sont impliquées dans le processus de phagotrophie. (Boulais *et al.*, 2010)

Toutes les études présentées précédemment ont décrit le processus de phagocytose chez des organismes phylogénétiquement distants, ce qui a permis de mettre en évidence des gènes ou des protéines conservés au cours de l'évolution. Afin d'appuyer ce postulat, il est intéressant d'étudier la réponse des bactéries phagocytées par différents types de cellules phagocytaires. En effet, de plus en plus d'études montrent que la réponse transcriptomique d'une bactérie, où les mécanismes d'interactions mis en jeux chez deux hôtes distants, sont très similaires, soulignant un peu plus le caractère conservé du processus de phagocytose. Par exemple, des gènes codants pour un système de sécrétion de type IV et pour des facteurs permettant à *Legionnella pneumophila* d'assurer sa multiplication intracellulaire sont impliqués à la fois lors de l'interaction de la bactérie avec les amibes du genre *Acanthamoeba* et avec les macrophages humains (Segal and Shuman, 1999; Al-

Khodor *et al.*, 2008). *Vibrio cholerae* exprime les mêmes gènes VAS, impliqués dans la formation du T6SS, nécessaires à l'expression de sa cytotoxicité chez des macrophages murins et chez l'amibe *D. discoideum* (Pukatzki *et al.*, 2006). *Mycobacterium avium* possède un ilot de pathogénicité nécessaire à une bonne invasion des cellules hôtes, qu'il s'agisse de macrophages humains ou de l'amibe *A. castellanii* (Danelishvili *et al.*, 2007). Des études plus globales ont également été menées. Une banque de mutants de *Mycobacterium marinum* a mis en évidence qu'un certain nombre de gènes non essentiels en milieu de culture sont nécessaires à la survie de la bactérie dans différentes cellules phagocytaires comme des macrophages humains, *A. castellanii* et *D. discoideum* (Weerdenburg *et al.*, 2015). De même, en déterminant la réponse transcriptomique de *Cryptococcus neoformans* suite à son ingestion par *A. castellanii* ou par des macrophages murins, il a été montré que 38% des gènes de la levure sont exprimés de manière similaire chez les deux hôtes (Derengowski *et al.*, 2013).

2.2. Les étapes de la phagocytose

Les 3 grandes étapes de la phagocytose sont la reconnaissance de la particule, suivie de l'internalisation de celle-ci puis la maturation du phagosome afin de tuer et digérer l'organisme ingéré (Flannagan *et al.*, 2012).

- La reconnaissance de l'organisme à phagocyter se fait par des récepteurs exprimés à la surface des cellules phagocytaires. Cette reconnaissance peut parfois faire intervenir des opsonines.

- L'internalisation, initiée suite à la reconnaissance d'un organisme par les récepteurs déclenche une cascade de signalisations qui va permettre la polymérisation de l'actine. Le remodelage du cytosquelette d'actine va permettre la formation de pseudopodes qui vont entourer la proie pour l'internaliser. Les deux lamella fusionnent pour donner le phagosome dans lequel est enfermée la proie.

- L'acquisition d'activités microbicides via la maturation du phagosome permet de tuer et digérer la proie internalisée. Elle se fait par des échanges avec d'autres compartiments cellulaires (endosomes, lysosomes) qui vont permettre notamment son acidification ainsi que l'apport d'enzymes lytiques. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ainsi que l'homéostasie des métaux sont également impliqués. Le phagosome mature permettant une destruction optimale des proies est appelé phagolysosome.

La biologie cellulaire des amibes libres étant mal connue, nous avons choisi de décrire le processus de phagocytose à l'aide des amibes modèles *A. castellanii* et *D. discoideum* où ce processus a été plus largement étudié.

2.2.1. La reconnaissance

Chez les amibes, la détection des particules étrangères se fait grâce à différents récepteurs encore mal décrits, appelés PRRs (pattern recognition receptors), capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs). Les métazoaires possèdent un panel de récepteurs de reconnaissance comme les intégrines, les récepteurs « scavenger », les lectines ou encore les récepteurs opsoniques (récepteurs aux immunoglobulines ou aux fragments du complément) (Stuart and Ezekowitz, 2005).

-Les intégrines

D. discoideum possède le groupe des protéines Sib impliquées dans la reconnaissance et considéré comme potentiellement le plus important (Cornillon *et al.*, 2006). Ce groupe contient 5 protéines membranaires nommées SibA à SibE dont les domaines extracellulaires, membranaires et intracellulaires possèdent des caractéristiques similaires aux intégrines. En effet, la partie extracellulaire contient 3 domaines impliqués dans l'adhésion (immunoglobulin-like fold, domaine riche en cystéine et un domaine VWA). Le domaine VWA est notamment retrouvé dans des protéines de métazoaires associées à des sous unités β intégrines. De plus, les domaines extracellulaires contiennent des motifs protéiques répétés qui sont également trouvés sur des protéines de surface bactériennes comme VCBS et RTX. Les protéines bactériennes VCBS et RTX contenant ces motifs répétés sont notamment impliquées dans l'interaction avec les cellules hôtes. Le domaine transmembranaire quant à lui possède des régions riches en glycine, ce qui est caractéristique des intégrines. Enfin le domaine cytosolique contient des motifs conservés proches des chaines β des intégrines (Niewöhner *et al.*, 1997; Tuxworth *et al.*, 2005).

Les protéines à 9 domaines transmembranaires Phg1 et SadA que l'on pensait initialement impliquées dans la reconnaissance et l'adhésion se sont révélé être impliquées dans le contrôle du niveau d'expression de *sibA*, la stabilité de la protéine ainsi que le niveau de protéines SibA présentes à la surface des cellules (Cornillon *et al.*, 2000; Fey *et al.*, 2002; Froquet *et al.*, 2012). En effet, une mutation du gène *phg1* entraîne un défaut d'internalisation des particules très hydrophiles comme des billes de latex coatés par du milieu HLB5. Cependant dans un tampon phosphate, milieu dans lequel les billes de latex ont une surface très hydrophobe, les billes sont alors reconnues et internalisées par un autre récepteur indépendant de Phg1. Ainsi un récepteur de type lectine pourrait être mis en jeu dans le tampon phosphate (Cornillon *et al.*, 2000). De plus, chez une souche mutée pour le gène *sadA,* la phagocytose de bille est totalement interrompue. En revanche, lorsqu'on utilise une souche de *D. discoideum* mutée pour le gène *sadA* complémenté avec une protéine fusion GFP-SadA, on observe que le marquage GFP se situe au cortex au niveau de la coupe

phagocytaire signe d'une bonne localisation de la protéine et que le processus de phagocytose est restauré. Contrairement à *D. discoideum*, *A. castellanii* ne possède pas de protéines Sib mais possède des intégrines qui sont potentiellement impliquées dans la reconnaissance de bactéries (Clarke *et al.*, 2013).

-Les lectines

D. discoideum possède différentes lectines capables de reconnaître différents sucres (Bozzaro and Roseman, 1983; Sanchez *et al.*, 2006). Ces lectines sont capables d'interagir avec le glucose, le mannose et le N-acetylglucosamine. Chez *A. castellanii*, des lectines de type C capables de reconnaître le mannose et nommées MBP (Mannose Binding Protein) ont été mises en évidence (Garate *et al.*, 2004; Alsam *et al.*, 2005; J. H. Kim *et al.*, 2012; Arnold *et al.*, 2016). Le séquençage du génome d'*A. castellanii* a permis d'identifier de nouveaux récepteurs membranaires (Clarke *et al.*, 2013). En plus de la MBP déjà décrite, le génome d'*A. castellanii* code pour deux paralogues de MBP. Ces lectines appelées SUEL ciblent le D-galactoside et le L-rhamnose qui sont notamment des sucres microbiens. De plus, le génome compte de nombreuses copies d'une lectine de type H qui est prédite pour cibler le N-acetylglucosamine. Ces lectines de type H ont également été décrites chez *D. discoideum* et d'autres vertébrés pour jouer un rôle dans la reconnaissance de pathogènes. Enfin, le génome d'*A. castellanii* possède 6 gènes codant pour des protéines de la famille des BPI (Bactericidal permeability-increasing protein)/ LBP (lipopolysaccharide-binding protein) capables de lier le LPS ainsi que deux protéines liant le peptidoglycane (Clarke *et al.*, 2013).

-les récepteurs « scavenger »

Les récepteurs « scavenger » sont capables de reconnaitre de nombreux ligands et notamment des composants de la paroi bactérienne. *D. discoideum* possède les récepteurs LmpA, LmpB et LmpC homologue des récepteurs « scavenger » de classe B CD36/LIMPII retrouvés chez l'Homme (Janssen *et al.*, 2001; Sattler *et al*., 2018).

-Les récepteurs couplés aux protéines G

Dans une étude récente, il a été montré que *D. discoideum* possède le récepteur fAR1 couplé à une protéine G qui est impliqué dans le chimiotactisme et la phagocytose (Pan *et al.*, 2018). En effet, fAR1 permet de reconnaître le folate sécrété pas les bactéries ainsi que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif et ainsi permettre leur internalisation (Pan *et al.*, 2018).

Il faut garder à l'esprit que l'ensemble des protéines de reconnaissances décrites ici ne reflètent potentiellement pas l'entièreté des récepteurs existants et qu'il est nécessaire de poursuivre les

recherches afin de mieux appréhender la diversité des récepteurs. Il faut également garder à l'esprit qu'un certain nombre de récepteurs décrits ici ont été trouvés sur la base de fonctions hypothétiques à partir de séquences protéiques et qu'une étude fonctionnelle n'a pas été menée pour l'ensemble des récepteurs. Autre point non négligeable, la plupart des études présentées ici prennent en compte les récepteurs de façon individuelle. Cependant, la reconnaissance de particules par les cellules phagocytaires humaines est médiée par plusieurs récepteurs en même temps et/ou de façon séquentielle (Stuart and Ezekowitz, 2005).

2.2.2. L'internalisation

Après reconnaissance par les récepteurs de phagocytose, une cascade de signalisation est engagée et va provoquer un réarrangement du cytosquelette d'actine pour permettre l'internalisation des microorganismes par la formation d'une structure membranaire particulière appelée coupe phagocytaire (Figure 14).

Chez *D. discoideum* la transduction du signal des récepteurs de phagocytose va provoquer l'activation de petites protéines G appelées Rho GTPases. Ces protéines sont homologues des Rho GTPases retrouvées chez les macrophages. *D. discoideum* possède une vingtaine de Rho GTPases appelées Rac (Rivero and Xiong, 2016). Suite à la reconnaissance, les phosphatidylinositol phosphates (PIP) vont également être synthétisées. Les PIP, messagers lipidiques au niveau de la membrane, sont impliqués dans le recrutement et l'activation des protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine. Le PI(4,5)P_2 est phosphorylé en PI(3,4,5)P_3 par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) puis hydrolysé en diacylglycerol et inositol (1,4,5)-triphosphate (Dormann *et al.*, 2004). Après activation de la cascade des PIP et des Rho GTPases, le complexe SCAR/WAVE est recruté et va activer le complexe Arp2/3 responsable de la polymérisation de l'actine (Insall *et al.*, 2001). En effet, lorsque le gène *scar* est muté, on observe une diminution de la phagocytose. L'utilisation de cytochalasine A qui inhibe la polymérisation de l'actine provoque le même phénotype, suggérant que SCAR participe à la polymérisation de l'actine (Seastone *et al.*, 2001). Il a été montré que la protéine Dd5P4 homologue de la phosphatase OCRL est nécessaire pour que la coupe phagocytaire se referme et que l'organisme phagocyté soit enfermé dans une vacuole (Luscher et *al.*, 2019). La phosphatase joue également un rôle dans la déphosphorylation du PI(3,4,5)P_3 en PI(3,4)P_2 (Loovers *et al.*, 2007). Une autre protéine, la kinase Phg2 participe aussi à la dynamique de PI(3,4)P_2 et intervient à différent temps de l'internalisation (Blanc *et al.*, 2005). Après internalisation, il a été démontré que le complexe WASH est impliqué dans le recyclage, notamment des récepteurs membranaires (Buckley *et al.*, 2016). Ceci a pu être confirmé par Buckley et collaborateurs grâce à l'utilisation de souches de *D. discoideum* mutées pour le complexe WASH et du suivi de la protéine fusion SibC-GFP qui est une

intégrine impliquée dans la reconnaissance. Les auteurs ont également montré que la présence de WASH permet une meilleure efficacité de phagocytose par un meilleur maintien de levure dans la coupe phagocytaire (Buckley *et al.*, 2016).

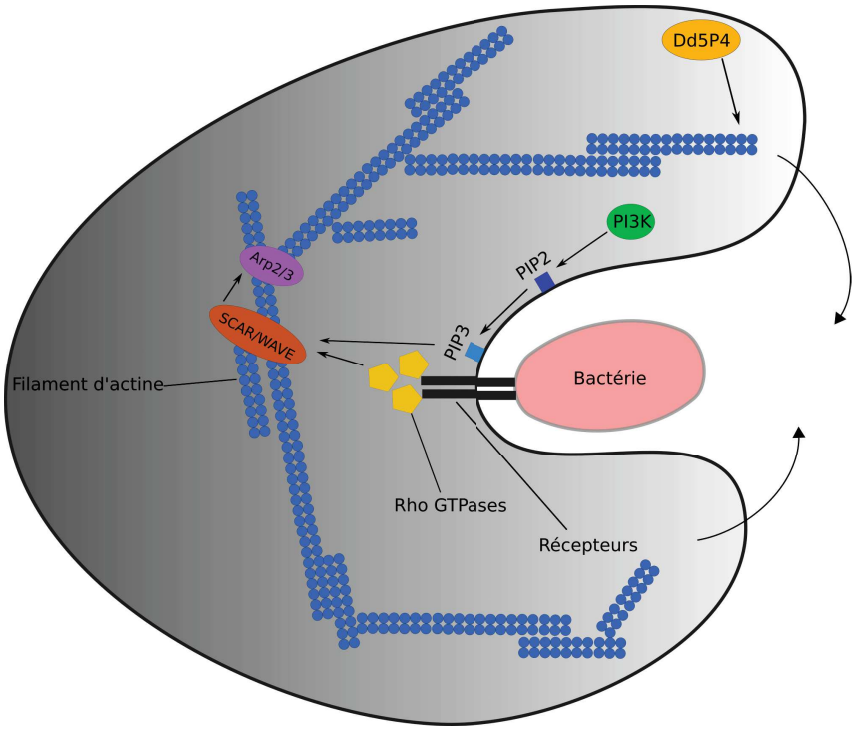


Figure 14. Schéma simplifié de l'étape d'internalisation d'une bactérie pendant le processus de phagocytose chez *D. discoideum*. Brièvement, après reconnaissance par différents récepteurs, les petites protéines G Rho GTPases sont activées et le PI(4,5)P_2 est phosphorylé en PI(3,4,5)P_3 par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) . Le PI(3,4,5)P_3 et les Rho GTPases recrutent le complexe SCAR/WAVE et Arp2/3 nécessaires à la polymérisation des filaments d'actines. Ceux-ci provoquent la formation de pseudopodes qui entourent la proie. La phosphatase Dd5P4 ciblant PIP2 et PIP3 permet à la coupe phagocytaire de se refermer et ainsi enfermer la bactérie dans un compartiment vacuolaire clôt : le phagosome. (Adapté de Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004).

2.2.3. La maturation du phagosome

Après la reconnaissance et l'internalisation, les microorganismes phagocytés se retrouvent dans un compartiment vacuolaire clos appelé phagosome. Immédiatement après sa formation, le phagosome va subir des étapes de maturation. Cette maturation se fait par recrutement séquentiel de différents effecteurs qui lui confèrent son activité microbicide vis-à-vis des microorganismes ingérés qui sont détruits et digérés. Ainsi, au moment de sa formation, le phagosome est encore un phagosome précoce (Figure 15).

Chez *D. discoideum*, le phagosome perd son « coating » d'actine et ses récepteurs qui sont recyclés à la surface de l'amibe via les complexes WASH et Arp2/3. Dans les premières minutes, le phagosome précoce est associé à la GTPase Rab 5 qui permet la fusion des endosomes précoces avec le phagosome (Duclos *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003). Ensuite, par vagues successives, des GTPases et

notamment la protéine Rab7 recrutent des endosomes et lysosomes qui fusionnent avec le phagosome pour aboutir à un phagolysosome qui est mature et qui possède son activité microbicide maximale (Rupper *et al.*, 2001; Harrison *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2003; Urwyler *et al.*, 2009). L'ensemble de ces fusions permet l'accumulation de pompes à proton vacuolaire ATPases (V-ATPase) à la membrane du phagosome (Clarke *et al.*, 2002). Ceci va avoir pour effet de rendre la lumière vacuolaire de plus en plus acide en raison de l'accumulation de protons pour atteindre un pH compris entre 3,5 et 4 (Marchetti *et al.*, 2009). Via l'activité microbicide de différents effecteurs, les bactéries ingérées sont tuées et digérées. Les résidus de bactéries non digérées sont ensuite éliminés par exocytose. Durant cette étape d'externalisation, le phagosome va être recouvert d'actine grâce au complexe WASH et arp2/3. Ceci va permettre le recyclage des protéines lysosomales et des pompes à proton ATPase faisant ainsi augmenter le pH au sein du phagosome (Carnell *et al.*, 2011; King *et al.*, 2013).

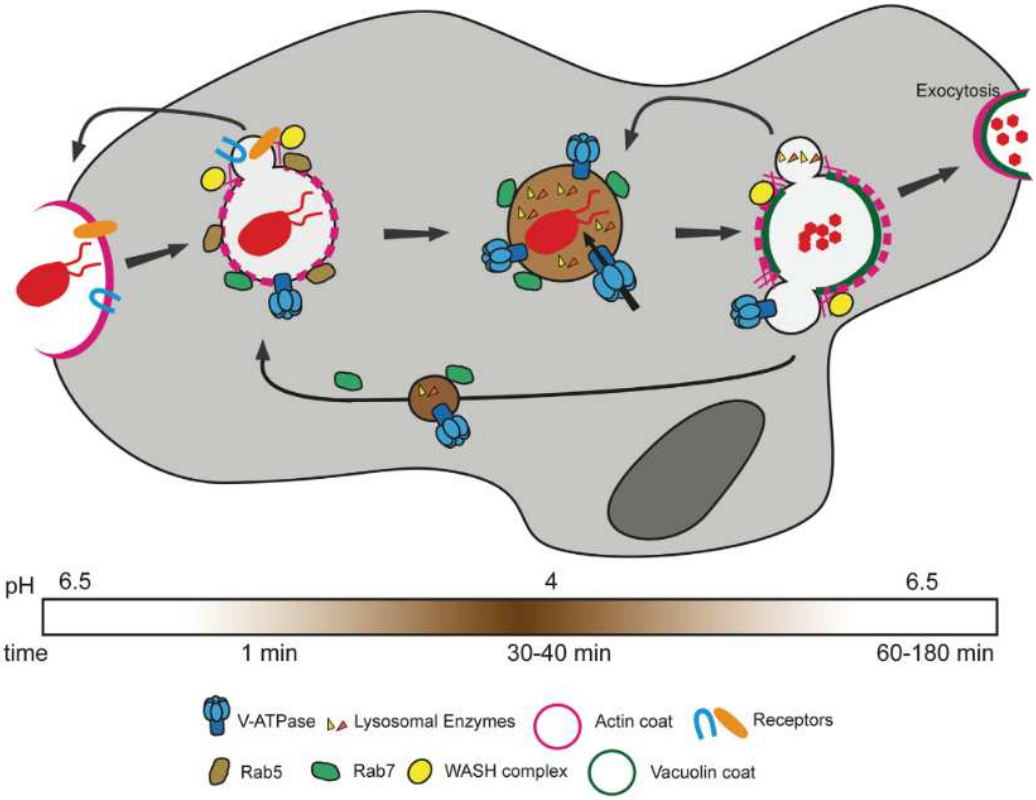


Figure 15. Schéma simplifié de la maturation du phagosome chez *D. discoideum* après internalisation d'une bactérie. Rapidement après internalisation, les récepteurs de reconnaissance sont recyclés à la surface de l'amibe grâce aux complexes WASH et arp2/3. Les GTPases Rab jouent un rôle dans la fusion des endosomes et lysosomes qui vont permettre notamment l'apport de pompes à protons V-ATPase, de lysozymes et d'hydrolases acides. Lorsque le phagosome est mature, il possède un pH égal à 4 et son activité microbicide est maximale. La proie phagocytée est tuée et digérée. Les résidus de bactérie sont éliminés par exocytose. Dans le même temps le phagosome est recouvert d'actine via les complexes WASH et arp2/3 et les pompes V-ATPases et les enzymes lysosomales sont recyclées vers des phagosomes plus précoces. (Dunn *et al.*, 2018)

2.3. Les effecteurs microbicides de la phagocytose

Lors de la maturation du phagosome, une accumulation de protons médiés par les pompes V-ATPase va faire diminuer son pH. Bien qu'une diminution du pH soit essentielle pour tuer les proies, elle n'est pas suffisante à elle seule. Pour cela, d'autres effecteurs en contact direct de la proie dans le phagolysosome sont impliqués afin de la tuer et la digérer. Ces effecteurs sont des peptides antimicrobiens, des enzymes hydrolytiques et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Figure 16). L'homéostasie des métaux participe également de manière importante à l'activité microbicide du phagosome (Figure 16).

2.3.1. L'homéostasie des métaux

La présence de métaux est essentielle à la vie des organismes car ils sont impliqués dans de nombreux processus métaboliques. En effet les métalloprotéines sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires comme la transcription, la traduction ou encore la division cellulaire (Hood and Skaar, 2012). Afin d'éviter une croissance intra-vacuolaire des proies, une régulation fine des métaux est nécessaire (German *et al.*, 2013). Deux stratégies sont mises en place par les cellules phagocytaires. Ces deux stratégies sont la séquestration de métaux aussi appelée « nutritional immunity » et l'influx massif de métaux dans le phagosome aussi appelé « metal poisoning » (Figure 16). La séquestration du fer et du manganèse défavorise les fonctions cellulaires des proies, en revanche une augmentation du niveau de cuivre et zinc créée un environnement toxique pour les proies (Soldati and Neyrolles, 2012; German *et al.*, 2016).

2.3.1.1. Le Zinc

Le zinc qui est un ion stable est trouvé sous état d'oxydation Zn(II) dans les cellules. Le zinc possède différents mécanismes d'action microbicide. Il est capable d'oxyder les groupements thiols causant une déplétion de ces groupements et ainsi diminuant la quantité de molécules antioxydantes et augmentant le stress oxydatif. Le zinc peut aussi altérer les groupes Fe-S des protéines et inactiver l'activité d'un certains nombres d'enzymes (Lemire *et al.*, 2013).

Il existe deux types de transporteurs de zinc. Les premiers sont les transporteurs ZnT qui contrôlent l'efflux du zinc du cytoplasme hors de la cellule et dans les vésicules. Les deuxièmes sont les transporteurs Zrt et Irt (transporteurs ZIP) qui contrôlent l'influx de zinc de l'extérieur de la cellule et des vésicules dans le cytoplasme (Kambe *et al.*, 2015, 2017; Subramanian Vignesh and Deepe, 2016; Hara *et al.*, 2017).

Par recherche d'homologie de séquences contre le génome de *D. discoideum*, Sunaga et collaborateurs ont pu identifier 11 transporteurs de zinc potentiel (Sunaga *et al.*, 2008). Une

phylogénie de ces protéines a permis de les regrouper en 3 groupes distincts (Sunaga *et al.*, 2008). Il a été confirmé par phylogénies basées sur des séquences protéiques ZIP et ZnT connues que 4 protéines seraient des transporteurs ZnT et 7 des transporteurs ZIP (Dunn *et al.*, 2018). Néanmoins, pour le moment la fonction de ces protéines hypothétiques n'a pas été confirmée expérimentalement.

Par comparaison de séquences Chez *A. castellanii*, 21 potentiels transporteurs de zinc ont été identifiés (Ribeiro *et al.*, 2017). Par des analyses plus précises, les auteurs ont pu déterminer qu'*A. castellanii* possède des protéines ZIP et ZnT orthologue de la souris *Mus musculus* et de la levure *S. cerevisiae*. De façon intéressante, lors de l'interaction entre *Cryptococcus gattii* et *A. castellanii,* il n'y a pas d'augmentation de la concentration en zinc dans le phagosome mais plutôt un environnement à faible concentration en zinc. Ceci a un effet délétère pour *C. gattii* qui n'a pas assez de zinc pour mener à bien ses fonctions biologiques (Ribeiro *et al.*, 2017).

2.3.1.2. Le cuivre

Contrairement au zinc, le cuivre possède deux états d'oxydation, le Cu(I) et le Cu(II). Le cuivre peut donc subir des réactions d'oxydo-réduction. Par conséquence, c'est un cofacteur idéal pour le transfert d'électrons lors notamment de la détoxification des radicaux libres (Besold *et al.*, 2016). De plus, le cuivre possède différentes propriétés microbicides. En effet, comme il a deux états d'oxydation, par les réactions de Fenton et Herber-Weiss il peut permettre la production de radicaux hydroxyles (HO). Les radicaux hydroxyles provoquent des dégâts aux lipides, protéines et acides nucléiques (Hodgkinson and Petris, 2012; Lemire *et al.*, 2013). Le cuivre peut également altérer la structure des protéines en réagissant avec les polypeptides par la réaction de Biuret et altérer les groupes Fe-S (Hodgkinson and Petris, 2012; Lemire *et al.*, 2013; Dunn *et al.*, 2018). Le cuivre étant toxique, il est séquestré dans les cellules par des métallothionéines. Pour l'heure, aucune métallothionéine n'a été détecté chez *D. discoideum* (Burlando *et al.*, 2002). Chez *D. discoideum*, le cuivre est internalisé dans la cellule par 3 perméases de type Ctr dont p80 analogue à la perméase CTR1 des mammifères (Buracco *et al.*, 2018; Dunn *et al.*, 2018). *D. discoideum* possèderait également trois ATPases de type P (ATP1, ATP2 et ATP3) qui permettraient la translocation du cuivre dans le phagosome (Buracco *et al.*, 2018; Dunn *et al.*, 2018).

L'amibe *A. castellanii* possède également des protéines potentiellement impliquées dans le transport du cuivre. En effet, cette amibe possède des protéines de type Ctr homologue à la protéine p80 identifié chez *D. discoideum* et des ATPase de type P homologue au transporteur de cuivre ATPase 1 identifié chez *Homo sapiens* (German *et al.*, 2013).

2.3.1.3. Le fer et le manganèse

Contrairement au cuivre et au zinc, le fer et le manganèse sont plutôt séquestrés par les phagocytes (nutritional immunity). En effet le fer et le manganèse sont des métaux présents en faible quantité mais indispensables à la croissance bactérienne (Hood and Skaar, 2012). Un appauvrissement de la lumière phagosomale de ces deux composés est délétère pour les bactéries phagocytées. Le génome de *D. discoideum* code pour deux protéines appelées NRAMP qui permettent le transport du fer et du manganèse (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) (Buracco *et al.*, 2018). Les deux protéines sont NRAMP1 qui est une protéine orthologue de NRAMP1 des mammifères et NRAMPB qui semble plus proche des transporteurs trouvés chez les bactéries (Bozzaro *et al.*, 2013; Peracino *et al.*, 2013; Buracco *et al.*, 2015). Le transporteur NRAMP1 est localisé à la membrane du phagosome et permet l'efflux du fer et du manganèse vers le cytosol tandis que NRAMPB est localisé à la vacuole contractile et permettrait également l'efflux des métaux vers le cytosol (Bozzaro *et al.*, 2013; Peracino *et al.*, 2013; Buracco *et al.*, 2015). Il a été montré que le transporteur NRAMP1 est important lors de l'interaction entre *D. discoideum* et *L. pneumophila* car son inactivation augmente la susceptibilité de l'amibe (Peracino *et al.*, 2006, 2010).

Une protéine potentiellement impliquée dans le transport de fer et du manganèse a également été identifiée chez *A. castellanii*. Ce transporteur potentiel est similaire au transporteur NRAMPB de *D. discoideum* (German *et al.*, 2013).

2.3.2. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Une part importante de l'activité microbicide du phagosome est due à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) en son sein. Les ROS et RNS peuvent réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les protéines ou les lipides de l'organisme phagocyté en les oxydant (Fang, 2004). Chez l'Homme, le processus de formation des ROS et RNS a été bien décrit. La majorité de la production des ROS dépend des NADPH oxydase (NOX). Il existe 5 NADPH oxydase (NOX1 – NOX5) localisées à la membrane du phagosome et de la membrane plasmique. Les NOX sont composées d'une sous unité catalytique et une sous unité régulatrice (Babior, 2004; Flannagan *et al.*, 2012; Thomas, 2017). Les NOX catalysent l'oxydation du NADPH et permettent la formation d'ions superoxydes (O2-). L'ion superoxyde est ensuite pris en charge par une superoxyde dismutase (SOD) qui permet la formation de peroxyde d'hydrogène (H2O2) qui lui-même est transformé en acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase (MPO) chez les neutrophiles et macrophages. L'acide Hypochloreux possède un pouvoir microbicide important. La production de RNS se fait par une oxyde nitrique synthèse (NOS) qui permet la synthèse d'oxyde nitrique (NO). Le NO étant réactif, il permet la

formation d'autres molécules toxiques comme des nitrites (NO2-) ou des peroxynitrites (ONOO-) (Fang, 2004; Flannagan *et al.*, 2012). La production de ROS cause donc de nombreux dommages aux organismes phagocytés mais peut également provoquer des dommages à l'hôte lui-même. Pour éviter les dommages, la cellule produit des enzymes détoxifiantes comme des superoxydes dismutases (SOD), des peroxydases et des catalases (Fang, 2004).

Le génome de *D. discoideum* code pour 3 sous unités catalytiques (NoxA, NoxB et NoxC), une sous unité régulatrice (CybA) et une sous unité cytosolique (NcfA) qui est prédit comme un facteur d'activation (Lardy *et al.*, 2005; Bedard *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). L'ensemble de ces sous unités sont homologues à des sous unités présentent chez l'Homme (Bedard *et al.*, 2007). De plus, *D. discoideum* exprime plusieurs SOD dépendantes de différents métaux et catalases homologues de l'Homme (Garcia *et al.*, 2000; Akaza *et al.*, 2002; Tsuji *et al.*, 2003; Yasukawa, 2009; Nomoto *et al.*, 2010). La fonction des NOX et du burst oxydatif chez les amibes reste peu décrite et mal connue. En effet, lorsqu'on utilise une souche double Knockout pour les gènes *noxA* et *noxB* il n'y a pas d'effet sur la phagocytose de *Klebsiella* (Benghezal *et al.*, 2006). Les NOX seraient plutôt impliquées dans la différenciation cellulaire et la morphogénèse (Lardy *et al.*, 2005).

Des SOD dépendantes du Fer ou du zinc et du cuivre ont également pu être identifiées chez l'amibe *A. castellanii* (Choi *et al.*, 2000; J. Y. Kim *et al.*, 2012).

2.3.3. Les Lysozymes et enzymes lysosomales

Les lysozymes

Les lysozymes sont des enzymes hydrolytiques capables d'hydrolyser les liaisons β(1-4) glucosidiques entre les résidus acide N-acétylmuramique (NAM) et N-acétylglucosamine (NAG) du peptidoglycane qui est le composant principal de la paroi des bactéries à Gram positif (Vollmer *et al.*, 2008; Callewaert and Michiels, 2010). Du fait de leur membrane externe particulière, le peptidoglycane des bactéries à Gram négatif n'est pas accessible directement par les lysozymes. D'autres effecteurs doivent intervenir pour déstructurer et perméabiliser la membrane externe (Callewaert and Michiels, 2010). Cependant certains lysozymes ont montré des effets sur des bactéries à Gram négatif (Hikima *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007).

Il a été montré que *D. discoideum* possède 5 lysozymes de la famille Aly (Müller *et al.*, 2005; Nasser *et al.*, 2013). Les gènes codant les lysozymes AlyA, AlyB, AlyC et AlyD sont surexprimés lorsque l'amibe est en contact avec des bactéries à Gram positif et le gène codant le lysozyme AlyL est surexprimé quand l'amibe est en contact avec des bactéries à Gram négatif (Nasser *et al.*, 2013).

Aucun lysozyme n'a été décrit chez l'amibe *A. castellanii* à ce jour.

Les enzymes lysosomales

Les lysosomes qui fusionnent avec le phagosome au cours de sa maturation contiennent différentes enzymes, les hydrolases. Parmi les hydrolases, on retrouve les lipases qui dégradent les lipides, les protéases qui dégradent les protéines, les glycosidases qui dégradent les sucres et les nucléases qui ciblent les acides nucléiques (Botelho and Grinstein, 2011). Ces enzymes qui ont leur activité maximale à pH acide sont appelées hydrolases acides. L'ensemble de ces hydrolases acides participe activement à la destruction des bactéries phagocytées (Botelho and Grinstein, 2011; Flannagan *et al.*, 2012).

D. discoideum possède des protéases à cystéine (Souza *et al.*, 1995; Nasser *et al.*, 2013). Elle possède également des α-mannosidases, β-glucosidases et des cathépsines (Souza *et al.*, 1997; Journet *et al.*, 1999). Il a également été identifié chez *A. castellanii* des ribonucléases, phosphatases, protéases, α-glucosidases, β-N-acétylglucosaminidases, β-glucuronidases et N-acétyl-β-Hexosaminidases (Müller, 1969; Baldwin and Bowers, 1995).

2.3.4. Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des petites molécules composées généralement de moins de 200 acides aminés capables de tuer les organismes phagocytés (Bulet *et al.*, 2004; Zhang and Gallo, 2016). Ils sont classés globalement en 4 classes en fonction de leur structure, c'est-à-dire en fonction de l'organisation des hélices α, des feuillets β et des ponts disulfures (Koehbach and Craik, 2019). Il existe une grande diversité d'AMPs qui ont été isolés de nombreux organismes allant des bactéries aux vertébrés (Zhang and Gallo, 2016). La plupart des AMPs eucaryotes sont cationiques et amphipathiques, ce qui leur permet d'interagir efficacement avec les parois anioniques des bactéries ainsi qu'avec les phospholipides de leurs membranes plasmiques (Bulet *et al.*, 2004). Les AMPs peuvent avoir des organismes cibles spécifiques ou avoir un spectre d'action large. Du fait de leurs grandes diversités structurelles, les AMPs possèdent différents mécanismes d'action. Ils peuvent avoir un effet direct en perméabilisant les membranes bactériennes ou indirect en inhibant des fonctions intracellulaires (inhibition de la synthèse de la paroi, de la transcription, de la traduction, des activités enzymatiques…) (Brogden, 2005; Zhang and Gallo, 2016).

Les peptides formant des pores ont été identifiés chez *Entamoeba histolytica* qui est un pathogène de l'Homme et provoque des amibiases (Leippe *et al.*, 1991). En effet, ces AMPs appelés

amoebapores sont capables de créer des canaux ioniques dans les cellules de l'organisme hôte et participent de façon conséquente à la pathologie (Leippe *et al.*, 1991; Andrä *et al.*, 1996). Par la suite trois isoformes ont été identifiés dans les granules de l'amibe (Andrä *et al.*, 1996). Les isoformes ont montrés des effets bactéricides ou bactériostatiques sur *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Yersinia enterocolitica* et différentes souches d'*Escherichia coli* (Andrä *et al.*, 1996). En 2003, Andrä et collaborateurs ont confirmé par immunomarquages que les amoebapores sont au niveau des membranes des bactéries à Gram positif et négatif phagocytées et que certaines bactéries observées sont désintégrées (Andrä *et al.*, 2003). Ils ont également pu confirmer que les amoebapores sont dans des granules cytoplasmiques semblables à des lysosomes qui fusionnent avec le phagosome (Andrä *et al.*, 2003). Ils émettent l'hypothèse que les amoebapores fonctionneraient en synergie avec d'autres effecteurs comme les lysozymes (Leippe, 2014).

Plus récemment, des AMPs ont été décrits chez *Acanthamoeba culbertsoni*, les acanthaporines (Michalek *et al.*, 2013). Les acanthaporines seraient stockées dans des compartiments semblables à des lysosomes et ciblent les bactéries à Gram positif et négatif. Elles pourraient également entrer en synergie avec des enzymes hydrolytiques comme des lysozymes et des protéases (Michalek *et al.*, 2013). En effet il a été montré que son activité maximale est à pH égal à 5,2 et qu'elle devient inactive à pH égal à 7,4 (Michalek *et al.*, 2013).

Par similarité de séquence, il a été montré que l'amoebapore A d'*E. histolytica* appartient à la famille des protéines appelées SAPLIP (SAPosin-LIke Protein) (Hecht *et al.*, 2004). Les protéines SAPLIP sont caractérisées par un motif de liaison disulfure et un repli de 5 hélices. De plus, comme l'amoebapore A, les protéines SAPLIP interagissent avec les lipides et perméabilisent les membranes (Hecht *et al.*, 2004). *D. discoideum* possède 17 gènes *apl* (*aplA* à *aplR*) qui peuvent potentiellement former 33 peptides SAPLIP (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). Le stade multicellulaire d'une souche de *D. discoideum* qui est muté pour le gène *aplD* devient sensible à la souche avirulente *Klebsiella pneumoniae*. Une complémentation pour AplD restaure le phénotype de résitance. Les auteurs ont également montré que la protéine recombinante purifiée AplD est capable de perméabiliser la membrane de *Bacillus megaterium* mais pas celles des bactéries Gram négatives comme *Klebsiella* ou *E.coli* (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2018). L'hypothèse émise par les auteurs est que la diversité des peptides SAPLIP de *D. discoideum* permet à l'amibe de faire face à la diversité des microbes rencontrés dans l'environnement.

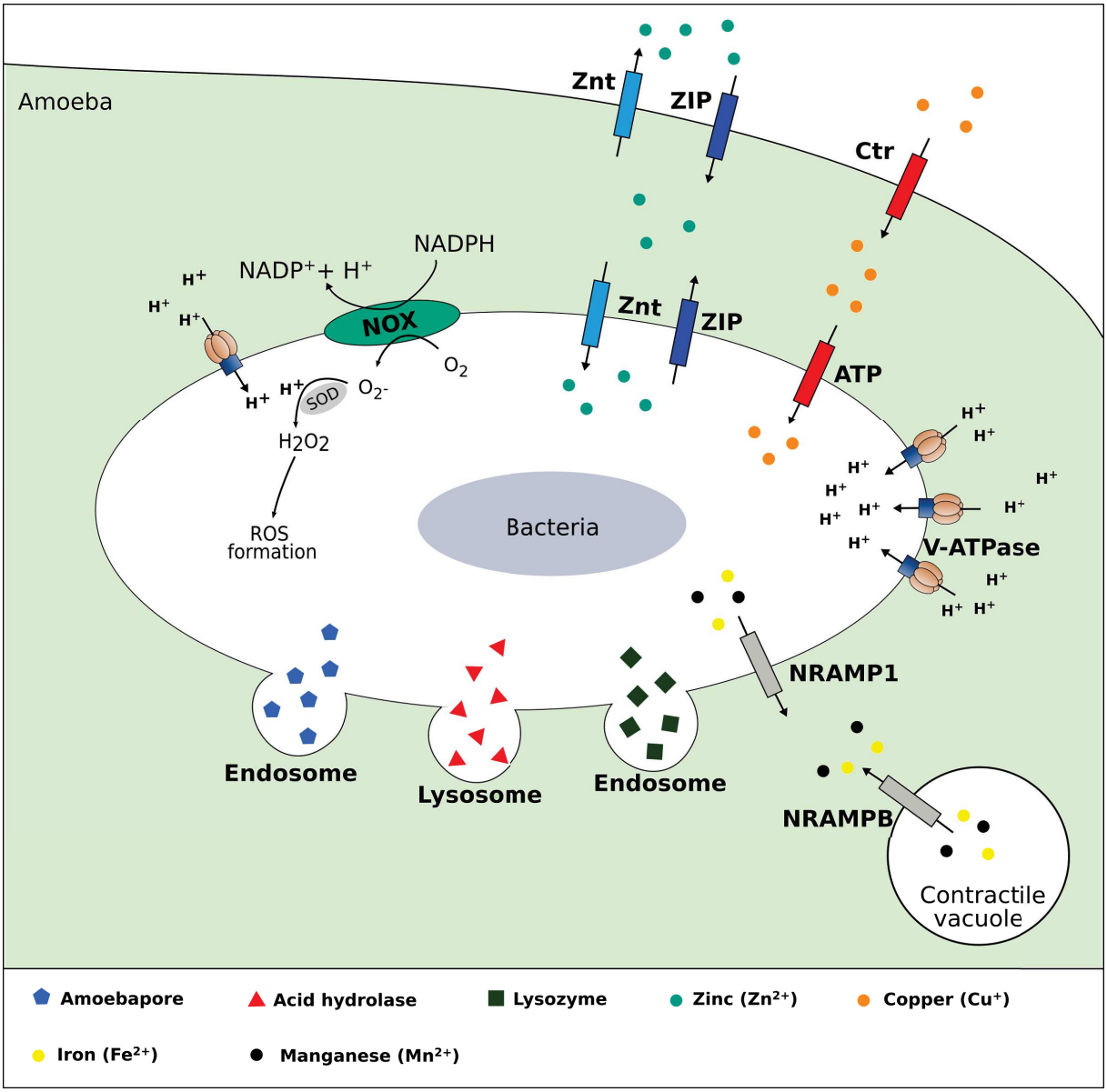


Figure 16. Effecteurs impliqués dans la destruction des bactéries phagocytées par les amibes au sein du phagosome. Après internalisation, la maturation du phagosome permet de rendre la lumière de celui-ci toxique pour les bactéries grâce à différents effecteurs. L'accumulation de pompe à protons V-ATPase permet une acidification du compartiment vacuolaire. Il y a également une accumulation de peptides antimicrobiens (Amoebapores), d'hydrolases acides, de lysozymes, de ROS ainsi que de cuivre et de zinc. Au contraire, la lumière du phagosome voit sa concentration en fer et manganèse diminuer ce qui est délétère pour les bactéries qui ne peuvent pas mener à bien certains processus biologiques. (D'après Soldati and Neyrolles, 2012 ; Flannagan *et al.,* 2012 ; Nasser *et al.*, 2013 ; Andrä *et al*., 2013 ; German *et al.,* 2016 ; Dunn *et al.*, 2018)

3. Les vibrios

3.1. Généralités

Les vibrios sont des γ-proteobactéries ubiquitaires des environnements aquatiques aussi bien marins que d'eaux douces ou saumâtres (Uchiyama, 2000). Ce sont des bacilles droits ou incurvés, à Gram négatif, flagellés, anaérobie facultatifs et capables de se développer à des températures allant de 10°C à plus de 40°C en fonction des espèces (Beuchat, 1975; Igbinosa and Okoh, 2008). La majorité des vibrios se développent à un pH neutre ou alcalin (Igbinosa and Okoh, 2008).

Des études récentes ont montré que l'environnement benthique pouvait servir de réservoir de vibrios lorsque la température de l'eau diminue (Vezzulli *et al.*, 2009; Chase *et al.*, 2015; Abia *et al.*, 2017; Lopez-Joven *et al.*, 2018). Les vibrios sont également retrouvés libres dans la colonne d'eau ou en association au sein de biofilms attachés sur des surfaces abiotiques, biotiques ou encore à l'interface eau/air (Hood and Winter, 2006; Lutz *et al.*, 2013). La formation de biofilms permet notamment une protection face aux prédateurs, aux antibiotiques, aux toxines et apporte un avantage lors de situation de carence (Dawson *et al.*, 1981; Wai *et al.*, 1999; Dang and Lovell, 2016). Les nutriments sont accumulés aux interfaces liquide/surfaces et la formation du biofilm permet de les piéger et de les absorber, les rendant ainsi plus accessibles aux vibrios. Les surfaces biotiques sur lesquelles se forment les biofilms peuvent elles-mêmes être source de nutriments (Lutz *et al.*, 2013). Par exemple, des vibrios ont été retrouvés sur des surfaces composées de chitine comme l'exosquelette des crustacés (Noga *et al.*, 2000; Vogan *et al.*, 2002). En effet, le catabolisme de la chitine via différentes chitinases est conservé au sein de la famille des *Vibrionaceae* (Meiborn *et al.*, 2004; Hunt *et al.*, 2008; Grimes *et al.*, 2009). De plus, certains vibrios possèdent des enzymes comme des agarases, des alginases, des mannanases et des cellulases leurs permettant de dégrader la paroi des algues (Goecke *et al.*, 2010).

Les vibrios ont également pour caractéristique de posséder deux chromosomes circulaires (Okada *et al.*, 2005). Le chromosome 1, qui est le plus grand, porte des gènes impliqués dans la virulence et dans des fonctions essentielles comme la réplication de l'ADN, la transcription ou encore le métabolisme. Le chromosome 2 qui est plus petit contient une quantité importante de gènes dont la fonction est inconnue et serait impliqué dans une stratégie évolutive et d'adaptation aux différentes niches auxquelles les vibrios sont confrontés (Heidelberg *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2005).

La famille des *Vibrionaceae* comporte 7 genres dont le genre *Vibrio*. Une étude de Sawabe et collaborateurs a permis une classification robuste des vibrios par phylogénie moléculaire (Sawabe *et al.*, 2013). Une phylogénie multigénique basée sur les 8 gènes de ménage *ftsZ, gapA, gyrB, mreB, pyrH, recA,* et *topA* de 96 souches de vibrios a permis de classer les vibrios au sein des 22 clades *Damselae, Mediterranei, Pectenicida, Phosphoreum, Profundum, Porteresiae, Rosengergii, Rumoiensis, Anguillarum, Cholerae, Coralliilyticus, Diazotrophicus, Fischeri, Gazogenes, Halioticoli, Harveyi, Nereis, Nigripulchritudo, Orientalis, Scopthalmi, Splendidus* et *Vulnificus* (Figure 17).

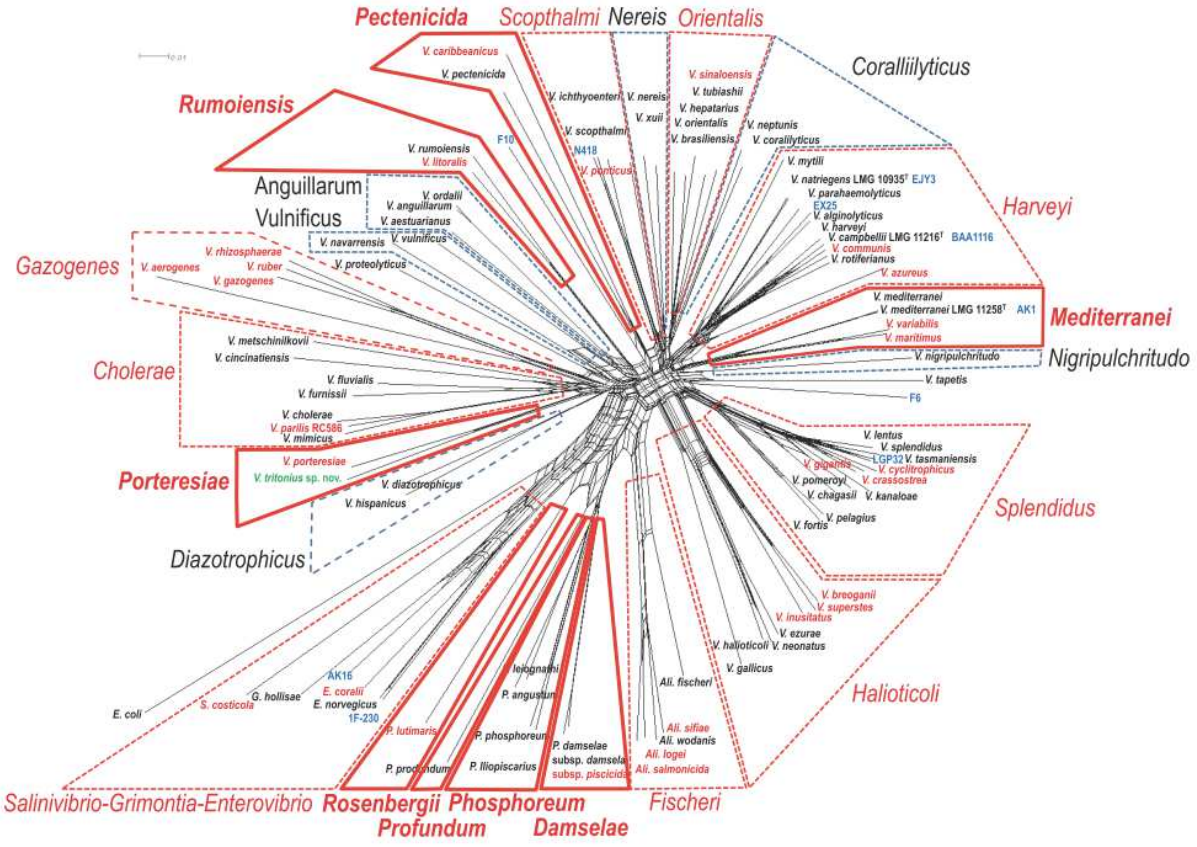


Figure 17. Phylogénie multigénique de 96 souches de vibrios basée sur les gènes *ftsZ, gapA, gyrB, mreB, pyrH, recA*, et *topA*. Les clades en trait plein rouge correspondent aux clades nouvellement identifiés et les clades en pointillé rouge et noir correspondent respectivement aux clades corrigés et inchangés. (Sawabe *et al.*, 2013)

Du fait de leur ubiquité dans les milieux aquatiques et de leur plasticité génomique, les vibrios sont associés à une grande diversité d'organismes, que ce soit de manière transitoire ou stable (Takemura *et al.*, 2014). L'association peut être bénéfique telle la relation étroite et complexe du vibrio luminescent *V. fischeri* qui colonise l'organe lumineux du calmar *Euprymna scolopes* (Mandel and Dunn, 2016; Speare *et al.*, 2018). L'association peut aussi être néfaste comme dans le cas des vibrios responsables de pathologies chez l'Homme et de nombreuses espèces animales. Chez l'Homme, l'exemple le plus connu concerne *V. cholerae* qui est l'agent étiologique responsable du choléra,

responsable de pandémies depuis 1817 et endémique dans certaine région du monde à l'heure actuelle (Thompson *et al.*, 2004; Clemens *et al.*, 2017). *V. cholerae* provoque des vomissements et de fortes diarrhées qui via la fuite d'électrolytes induit une déshydratation importante pouvant mener rapidement à la mort en l'absence de réhydratation (Lippi *et al.*, 2016). Il existe plus de 200 sérogroupes mais ce sont les sérogroupes O1 et O139 qui sont responsables des pandémies (Clemens *et al.*, 2017). *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus, V. fluvialis, V. hollisae et V. mimicus* sont également responsables de pathologies humaines importantes (Baker-Austin *et al.*, 2018). Ces souches sont responsables de gastro-entérites et d'infections au niveau de blessures et pour certaines dans de rares cas de septicémie. *V. vulnificus* est plus problématique car il est responsable de plus de 95% des décès liés à la consommation des produits de la mer aux Etats-Unis. Une infection par une blessure peut nécessiter une amputation ou encore provoquer une septicémie fatale en moins de 48 heures après exposition à la bactérie (Baker-Austin and Oliver, 2018; Baker-Austin *et al.*, 2018).

Le genre *Vibrio* ne contient pas seulement des espèces pathogènes de l'Homme et certaines peuvent être impliquées dans des nécroses induisant le blanchissement des coraux. *V. mediterranei* et *V. coralliilyticus* sont respectivement pathogènes pour les coraux *Oculina patagonica* et *Pocillopora damicornis* (Ben-haim *et al.*, 2003; Rosenberg and Falkovitz, 2004). Il a notamment été montré que leur pathogénicité est dépendante de la température. Il existe d'autres espèces de vibrios induisant d'autres pathologies chez différents coraux (Munn, 2015).

Les vibrios sont responsables de crises importantes en aquaculture car ils sont associés à de nombreuses pathologies. On peut citer *V. nigripulchritudo* pathogène des crevettes *Penaeus japonicus* et *Litopenaeus stylirostris* (Goarant *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2007; Labreuche *et al.*, 2017). *V. anguillarum, V. salmonicida, V. alginolyticus, V. harveyi* ainsi que d'autres espèces sont pathogènes de différentes espèces de poissons (Colwell and Grimes, 1984; Toranzo *et al.*, 2005; Austin and Zhang, 2006; Frans *et al.*, 2011). Certaines espèces comme *V. parahaemolyticus, V. vulnificus, V. mimicus* et *V. splendidus* sont associées à des pathologies en aquaculture comme chez les crabes (Noga *et al.*, 2000; Vogan *et al.*, 2002). *V. harveyi* est impliqué dans les mortalités de l'ormeau *Haliotis discus hannai* (Sawabe *et al.*, 2007). Kesarcodi-Watson et collaborateurs ont montré en 2009 que *V. neptunius* et *V. splendidus* sont responsables de mortalité de larves de moules *Perna canaliculus* (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2009).

Des espèces de vibrios sont responsables de pathologies chez les huîtres aux différents stades de développement de l'animal. Ainsi V. *aestuarianus, V. coralliilyticus, V. neptunius, V. ostreicida, V. alginolyticus, V. bivalvicida, V. europaeus* et *V. tubiashii* sont impliqués dans des pathologies touchant les huîtres (Dubert *et al.*, 2017).

Depuis 2008, les élevages ostréicoles en France sont touchés par des épisodes de surmortalité provoquant des pertes d'huîtres creuses juvéniles *Crassostrea gigas* allant de 60 à 100% (Martenot *et al.*, 2011). Différents pathogènes sont associés à ces mortalités d'huître creuses juvéniles dont l'herpès virus OsHV1 µvar et différents vibrios. Parmi ces derniers, il a été identifié des souches de *V. splendidus*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis* appartenant au clade Splendidus (Waechter *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004; Lemire *et al.*, 2015; Bruto *et al.*, 2017). Récemment, *V. harveyi* appartenant au clade Harveyi a également été identifié comme associé à des huîtres en période de mortalité (Bruto *et al.*, 2017), Lagorce et al., in prep.). Une étude d'envergure a permis de déchiffrer les étapes de la pathogénèse (de Lorgeril *et al.*, 2018). Il a été montré que le virus OsHV1 µvar est le premier acteur, provoquant une immunosuppression des huîtres. En effet, une des cibles du virus est les hémocytes, cellules immunocompétentes de *C. gigas*. Ensuite des bactéries pathogènes opportunistes comme les vibrios sont capables de coloniser l'huître et induire sa mort suite à une septicémie (de Lorgeril *et al.*, 2018).

Il a été mis en évidence que la température est un facteur clé dans le déclenchement des épisodes de surmortalités. En effet, ceux-ci se produisent lorsque la température de l'eau se trouve entre 16°C et 24 °C (Pernet *et al.*, 2012). Ainsi, en méditerranée, les épisodes de surmortalité ont généralement lieu au printemps et en automne lorsque la température augmente ou diminue passant par la gamme de températures déclenchant la pathologie. Sur la côte atlantique française, c'est en été que la maladie est observée.

La question du réchauffement climatique est importante et préoccupante car associée à une augmentation des cas de vibrioses. En effet, l'augmentation moyenne de la température de la surface des sols et des océans est de 0,85 °C depuis la fin du 19ème siècle. Un nombre conséquent d'études se sont intéressées aux hautes latitudes ou le réchauffement des eaux semble plus préoccupant (Baker-Austin *et al.*, 2012). Il a été mis en évidence de profonds changements dans la structuration des communautés bactériennes de la fraction planctonique avec une occurrence de vibrios augmentée incluant des souches pathogènes (Vezzulli *et al.*, 2012, 2013, 2016). De plus, il a été montré que la température influence fortement le métabolisme, le taux de croissance et la pathogénicité de certains vibrios (Vezzulli *et al.*, 2013). Par exemple, la pathogénicité de *V. parahaemolyticus* est augmentée lorsque la température augmente (Mahoney *et al.*, 2010). Ainsi le réchauffement des milieux aquatiques favorise la propagation, la croissance et la pathogénicité de certains vibrios incluant des souches pathogènes, favorisant l'émergence de nouvelles pathologies.

3.2. Les vibrios pathogènes de l'huître juvénile *Crassostrea gigas*

Parmi les vibrios pathogènes d'huîtres on retrouve des souches de *V. splendidus*, *V. cyclitrophicus*, *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis* appartenant au clade Splendidus. Plus récemment, il a été montré que *V. harveyi* appartenant au clade Harveyi est également associé aux mortalités d'huîtres juvéniles, notamment en Méditérannée (Lagorce *et al.*, in prep.). Cependant ces vibrios ont été moins étudiés et les mécanismes mis en jeux lors de la colonisation de l'huître restent inconnus.

La souche ***V. tasmaniensis*** LGP32 a été isolée d'huîtres juvéniles moribondes lors d'un épisode de mortalité et sa capacité à tuer l'huître *C. gigas* a été confirmé expérimentalement (Gay *et al.*, 2004a; Gay *et al.*, 2004b). Différentes études et notamment le séquençage du génome de LGP32 ont été menées afin de décrire les mécanismes de virulence et de résistance d'huîtres (Le Roux *et al.*, 2009). Il a été mis en évidence que LGP32 est capable de résister à l'activité microbicide de la phagocytose des cellules immunocompétentes de l'huître, les hémocytes. Ainsi cette souche est considérée comme un pathogène intracellulaire facultatif (Duperthuy *et al.*, 2011).

LGP32 possède une porine OmpU dont deux rôles ont été mis en évidence dans sa virulence. Cette porine permet à la bactérie de résister aux peptides antimicrobiens (AMPs) Cg-Def (défensine) et Cg-BPI (protéines bactéricides augmentant la perméabilité) impliqués dans l'immunité de *C. gigas* (Duperthuy *et al.*, 2010). La porine OmpU intervient aussi dans l'adhésion et l'internalisation de LGP32 au sein des hémocytes. OmpU joue le rôle d'adhésine reconnue par l'opsonine Cg-EcSOD, une superoxyde dismutase présente dans le plasma d'huître. Une fois opsonisée, la bactérie peut être reconnue par des récepteurs β intégrines et être internalisée au sein des hémocytes (Duperthuy *et al.*, 2011).

LGP32 sécrète des produits extracellulaires (ECP) impliqués dans la cytotoxicité. En effet, l'injection d'ECP dans des huîtres provoque des mortalités importantes. Une des protéines sécrétées identifiée est la métalloprotéase extracellulaire Vsm qui est absente chez la souche *V. tasmaniensis* LMG20012^{T}, souche non virulente proche phylogénétiquement de LGP32. Même si Vsm est un effecteur majeur de la cytotoxicité, il a été montré qu'il n'est pas essentiel à la virulence de LGP32 (Le Roux *et al.*, 2007; Binesse *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence que LGP32 possède la protéase sécrétée InhA/PrtV qui a un rôle mineur (Binesse *et al.*, 2008). Une étude récente a étudié plus en détail la cascade moléculaire aboutissant à la production des métalloprotéases Vsm et InhA/PrtV (Nguyen *et al.*, 2018). LGP32 possède 4 copies de CsrB nommé CsrB1 à 4. Les CsrB sont des petits ARNs non codant conservés chez les bactéries impliquées dans la virulence. Chez LGP32 les différentes copies de CsrB sont régulées différentiellement par plusieurs signaux. Ainsi, la production des métalloprotéases Vsm et InhA/PrtV est régulée via le quorum sensing, les CsrB activés par différents signaux et divers signaux comme la carence (Nguyen *et al.*, 2018).

LGP32 sécrète également des Vésicules de Membrane Externe (OMVs). Les OMVs contiennent des hydrolases comme des protéases, des lipases, des phospholipases, des nucléases ainsi que la sérine protéase Vsp qui est impliquée dans la virulence de LGP32 (Vanhove *et al.*, 2015). Les OMVs sont sécrétées dans le milieu extérieur et internalisées par les hémocytes, pouvant délivrer des facteurs de virulence aux cellules de leur hôte. Elles sont également produites par LGP32 dans les phagosomes des hémocytes ; De plus les OMVs permettraient de résister aux AMPs contre lesquels elles jouent un rôle protecteur (Duperthuy *et al.*, 2010).

Afin de survivre dans le phagosome, LGP32 possède également d'autres stratégies. Face au stress oxydatif, LGP32 surexprime le gène *sodA* et les gènes *ahpC/ahpF* codant respectivement pour la superoxyde dismutase SodA qui convertit l'ion superoxyde en H_2O_2 et une alkyl hydroperoxyde réductase qui convertit l'H_2O_2 and H_2O, non toxique (Vanhove *et al.*, 2016). Pour résister à l'activité antimicrobienne du cuivre dans la lumière du phagosome (mais aussi dans le plasma de l'huître), LGP32 surexprime 5 gènes impliqués dans l'efflux du cuivre et la résistance de la bactérie à ce métal. Les gènes *cusA*, *B*, *C* et *F* codent pour un RND-transporteur (Résistance Nodulation Division transporter) et le gène *copA* code pour une pompe de type P-ATPase (Vanhove *et al.*, 2016). LGP32 est également capable d'inhiber l'acidification de la lumière du phagosome des hémocytes (Duperthuy *et al.*, 2011). Une étude récente a confirmé que la virulence des souches de *V. tasmaniensis* pathogènes*,* et pas seulement de la souche LGP32, est dépendante de la phagocytose et a montré qu'un système de sécrétion de type VI localisé sur le chromosome 1 est nécessaire à la sécrétion intracellulaire d'effecteurs toxiques (Rubio *et al.*, 2019). Plusieurs toxines ont été identifiées comme des toxines RTX putatives (Repeat-in-ToXin). Cependant deux souches LGP32 mutées pour deux toxines RTX n'ont pas vu leur virulence atténuée. Par RNAseq, il a été montré que LGP32 est capable de moduler la réponse de l'huître lors d'une infection notamment en réprimant l'expression de gènes impliqués dans l'immunité. Ainsi, des gènes impliqués dans la production de ROS sont réprimés. Des gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette sont induits et réprimés ce qui est compatible avec la stratégie intracellulaire de LGP32 (Rubio *et al.*, 2019).

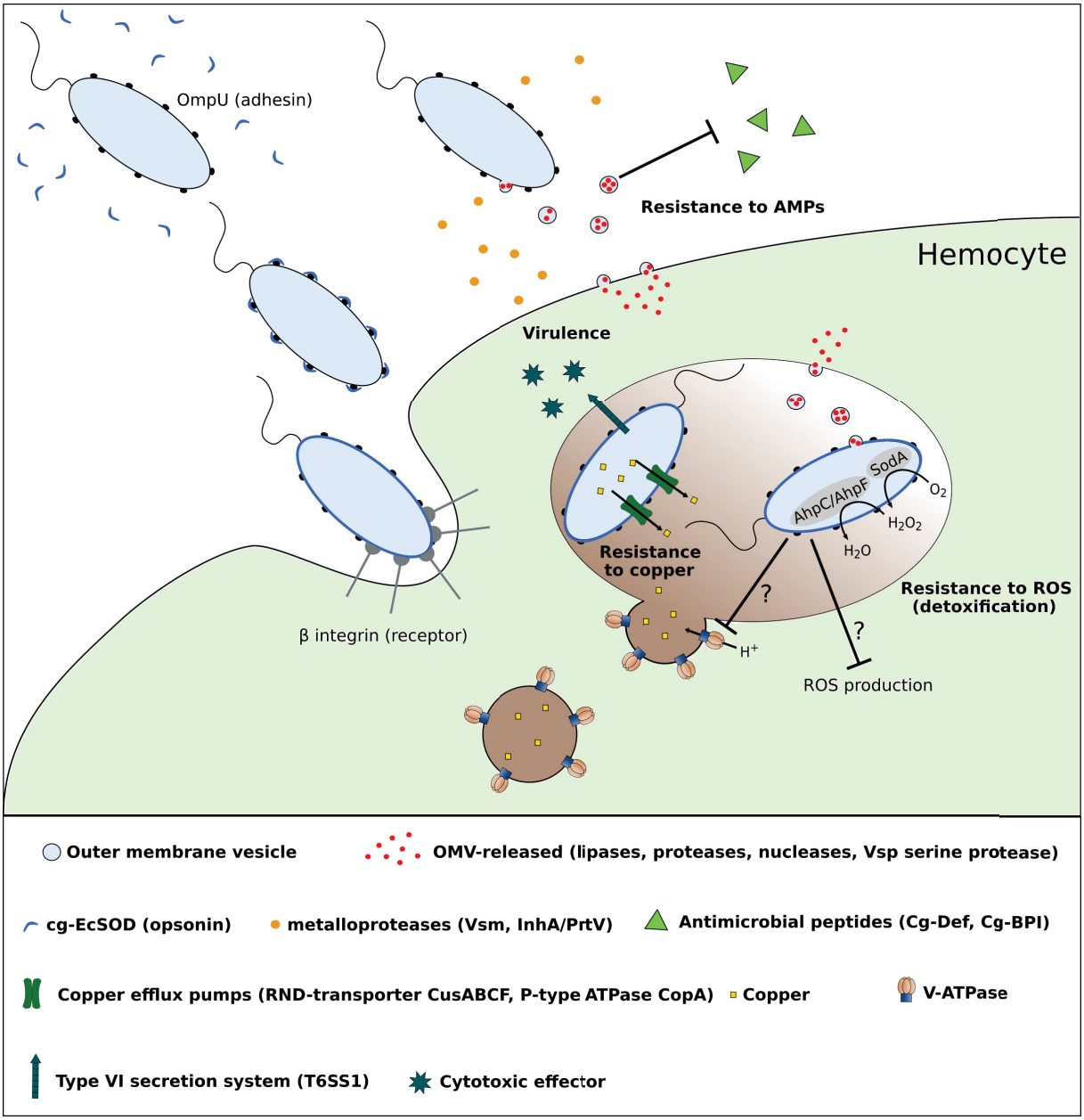


Figure 18. Mécanismes de virulence et de résistance de *V. tasmaniensis* LGP32 impliqué dans la colonisation des hémocytes de l'huître *C. gigas*. LGP32 utilise la porine OmpU pour faciliter son entrée dans les hémocytes via une reconnaissance par des récepteurs β intégrine. Les bactéries extracellulaires sécrètent des effecteurs impliqués dans la virulence et la résistance aux AMPs (Vsm, Vsp/InhA, OMVs contenant des hydrolases). Dans l'environnement intracellulaire, la bactérie possède différentes stratégies pour survivre notamment au stress oxydatif, à une forte concentration en cuivre ou une diminution du pH. Pour diminuer le stress oxydatif, LGP32 possède la superoxyde dismutase SodA et une alkyl hydroperoxyde réductase. Par un mécanisme encore inconnu, LGP32 inhibe l'acidification des phagosomes. Le transfert du cuivre vers le milieu extérieur est médié par des pompes à efflux du cuivre. Le T6SS1 permet à LGP32 d'injecter des effecteurs cytotoxiques directement dans le cytoplasme des hémocytes. (Tiré de Le Roux *et al.*, 2007 ; Binesse *et al.*, 2008 ; Duperthuy *et al.*, 2010, 2011 Vanhove *et al.*, 2015, 2016 ; Rubio et *al.*, 2019)

L'espèce ***V. crassostreae*** a été isolée de l'hémolymphe d'huîtres moribondes *C. gigas* par Faury et collaborateurs (Faury *et al.*, 2004) et les souches de cette espèce se sont révélées en grande majorité pathogènes pour les huîtres juvéniles (Lemire *et al.*, 2015). De manière intéressante, les auteurs ont montré que l'apparition de la pathologie est associée à un remplacement progressif des vibrios non pathogènes associés naturellement à l'huître par des souches de vibrios pathogènes, notamment de l'espèce *V. crassotreae*. Cependant, les souches non pathogènes peuvent jouer un rôle dans la pathologie en augmentant significativemet la mortalité induite par *V. crassotreae* (Lemire *et al.*, 2015). Une étude de génomique comparative a identifié un facteur de virulence présent chez les souches pathogènes de *V. crassostreae* mais absent chez les souches non pathogènes. Ce facteur de virulence fait partie de l'îlot chromosomique R-5 comportant 8 gènes chez les souches virulentes et est codé par le gène R-5.7 qui code pour une protéine sécrétée dont la fonction demeure inconnue (Lemire *et al.*, 2015).

Par un échantillonnage de différentes fractions d'eau et d'huîtres hors période de mortalités et pendant les mortalités d'huîtres en zone ostréicole Atlantique, Bruto et collaborateurs ont montré que les populations de vibrios sont différentes en période de mortalité. De plus, seule la population de *V. crassostreae* est associée uniquement à l'huître en période de mortalité (Bruto *et al.*, 2017). Parmi l'ensemble des populations associées à l'huître, seule la population de *V. crassostreae* est présente dans l'hémolymphe ce qui suggère que cette population est adaptée à survivre dans cet environnement hostile qui est bien protégé par le système immunitaire. Cette étude a montré que la virulence de *V. crassostreae* dépend aussi du plasmide pGV1512 mais qu'il n'est pas nécessaire à la colonisation de l'huître (Bruto *et al.*, 2017). Une annotation de ce plasmide n'a permis d'identifier que 45% de gènes dont des systèmes de sécrétions de type IV (T4SS) et VI (T6SS) et les gènes *cus/cop* impliqués dans la résistance au cuivre. Une mutation pour le T4SS et les gènes *cus/cop* n'a pas montré une atténuation de la virulence. Cependant une mutation des régions non annotées Px2 et Px3 montre une atténuation de la virulence. Une étude récente a mis en évidence le régulateur transcriptionnel TF du T6SS dans la région Px3 (Piel *et al.*, 2019). Dans cette même étude l'implication du T6SS dans la cytotoxicité des hémocytes a également été montrée. Ainsi, la cytotoxicité vis-à-vis des hémocytes d'huîtres des souches *V. crassostreae* pathogènes est extracellulaire, contrairement aux *V. tasmaniensis,* et dépendante du contact avec les hémocytes via la protéine membranaire R-5.7 (Piel *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2019). De plus, chez *V. crassostreae* J2-9, les gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire sont induits (Rubio *et al.*, 2019). On peut citer notamment un groupe de gènes impliqués dans la formation du pilus de type IV. Des gènes codant pour des toxines RTX putatives sont également surexprimés. Enfin, *V. crassotreae* J2-9 pourrait également être capable de moduler la réponse de *C. gigas* lors d'une infection. En effet, les gènes impliqués dans l'immunité sont

réprimés. Par exemple, les gènes codant pour des protéines du complément qui peuvent servir d'opsonines et améliorer la phagocytose sont réprimés.

Des vibrios du clade Harveyi ont également été associés à des huîtres moribondes en période de mortalité (Bruto *et al.*, 2017). Le clade Harveyi comprend différentes espèces de vibrios dont les espèces *V. harveyi* et *V. rotiferianus* (Urbanczyk *et al.*, 2013, 2014). Un échantillonnage d'huîtres juvéniles *C. gigas* et de différentes fractions d'eau en période de mortalités sur l'étang de Thau a permis d'isoler les espèces *V. owensii, V. jascicida, V. harveyi* et *V. rotiferianus* (Lagorce et *al.*, in prep.). Les espèces *V. owensii* et *V. jascicida* ont été principalement isolées de la colonne d'eau alors que les espèces *V. harveyi* et *V. rotiférianus* ont été retrouvées préférentiellement associées aux huîtres. Des infections expérimentales d'huîtres ont confirmé que la majorité des souches de *V. harveyi* et *V. rotiferianus* isolées sont virulentes et provoquent jusqu'à 100% de mortalité (Lagorce et *al.*, in prep.). L'implication des vibrios du clade Harveyi dans les épisodes de mortalité des huîtres juvéniles restent aujourd'hui peu étudié.

Du fait du mode de nutrition des amibes par phagocytose et de la pathogénicité des souches appartenant à l'espèce *V. tasmaniensis* dépendante de la phagocytose par les hémocytes, nous nous sommes focalisés au cours de cette thèse plus précisémments sur l'interaction entre amibe et LGP32.

4. Interactions entre bactéries et amibes libres

Les amibes libres sont en interactions avec divers micro-organismes dans l'environnement dont une grande diversité de bactéries. En effet, comme présenté précédemment, les bactéries sont des proies que les amibes phagocytent pour leur nutrition. Ces rencontres constantes ainsi que l'immense diversité amibienne et bactérienne a donné lieu à une grande variété de types d'interactions. Ainsi, certaines bactéries ont développé un lien étroit et stable avec des amibes allant jusqu'à la symbiose mutualiste tandis que d'autres bactéries interagissent de manière transitoire et sont capables de résister à la prédation par les amibes. Les premières observations microscopiques d'endosymbiontes dans des amibes du genre *Acanthamoeba* date de 1967 et 1975 (Jeon and Lorch, 1967; Proca-Ciobanu *et al.*, 1975). La première bactérie résistante aux amibes décrite et maintenant largement étudiée est *Legionella pneumophila* qui est responsable de la légionellose (Rowbotham, 1980).

Depuis, de nombreux symbiontes et bactéries résistantes aux amibes ont été identifiés et étudiés montrant que les bactéries et les amibes ne sont pas seulement des proies et des prédateurs. Les amibes peuvent permettre la protection, la persistance, la croissance et la dissémination de bactéries

parfois pathogènes (Kebbi-Beghdadi and Greub, 2014). Les amibes sont également considérées comme un lieu favorable à l'échange de gènes et des hypothèses plus récentes suggèrent que les amibes sont des précurseurs évolutifs des interactions et participent à la sélection de traits de virulence et à l'émergence de bactéries pathogènes pour des métazoaires (Salah *et al.*, 2009; Escoll *et al.*, 2013).

La distinction entre endosymbiontes et bactéries résistantes aux amibes est parfois ambiguë. En effet certaines études considèrent que les bactéries associées de façon transitoire avec les amibes et capables de résister à leur prédation sont des endosymbiontes. Pour plus de clarté, nous définirons ces deux types d'interactions dans la suite de ce chapitre.

4.1. Relation symbiotique entre bactéries et amibes

Le concept de symbiose a été formulé en 1879 par Anton de Bary lors de ces études sur les lichens étant une association entre un champignon et une algue (Taylor *et al.*, 2012). Ainsi la symbiose est une association étroite et durable entre deux organismes d'espèces différentes. La symbiose regroupe différents types de relations comme le mutualisme, le parasitisme et le commensalisme. Dans le cas d'une relation mutualiste, les deux organismes retirent un effet bénéfique de cette relation tandis que dans le cas d'une relation parasitaire, le symbionte retire un effet bénéfique de la relation au détriment de l'hôte. Dans le dernier cas, le commensalisme, un organisme retire un effet bénéfique de la relation sans effets positifs ou négatifs sur l'autre organisme.

La symbiose est également classée en fonction de la localisation du symbionte. En effet, si le symbionte est dans la cellule hôte, on parle d'endosymbiose. Au contraire, si le symbionte est associé à l'extérieur de la cellule hôte, on parle d'ectosymbiose.

Ainsi, on définit comme endosymbiontes d'amibes les bactéries considérées comme des intracellulaires obligatoires. Ceci correspond à des bactéries capables de survire au sein des amibes, et dont la relation est indispensable à leur cycle de vie, c'est à dire indispensable à leurs survies et leurs multiplications.

Les premières descriptions d'endosymbiontes ont été faites en 1967 et 1975 chez l'amibe *A. castellanii*, *A. proteus* et *A. discoides* sans pour autant identifier les bactéries (Jeon and Lorch, 1967; Proca-Ciobanu *et al.*, 1975). Par la suite, d'autres bactéries associées aux amibes ont pu être décrites, là encore sans être identifiées (Hall and Voelz, 1985). Ceci est dû au fait que ces bactéries sont souvent non cultivables hors de leurs hôtes avec des milieux de culture classique, rendant leurs identifications difficiles. Cependant, l'utilisation de méthodes basées sur l'ADNr 16S et l'hybridation in situ par fluorescence ont permis d'ouvrir la voie à l'identification de la diversité des

endosymbiontes d'amibes. Ainsi les endosymbiontes d'amibes montrent une grande diversité phylogénétique constamment enrichie avec des représentants appartenant aux α proteobacteria, β proteobacteria, Δ proteobacteria, γ proteobacteria, CFB (Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides) et PVC (Planctomycetes, Verrucomicrobiae, Chlamydiae) (Tableau 1).

Tableau 1. Sélection d'endosymbiontes d'amibes illustrant leurs diversités phylogénétiques.

Endosymbionte	Amibe hôte	Référence
Proteobacteria		
α proteobacteria		
Candidatus Caecibacter acanthamoeba	*Acanthamoeba* sp.	(Horn *et al.*, 1999)
Candidatus Odyssella thessalonicensis	*Acanthamoeba* sp.	(Birtles *et al.*, 2000)
Candidatus Nucleicultrix amoebophila	*Vermamoeba* sp.	(Schulz *et al.*, 2014)
β proteobacteria		
Candidatus Procabacter acanthamoeba	*Acanthamoeba* sp.	(Horn *et al.*, 2002)
Δ proteobacteria		
Candidatus Turbabacter delicatus	*Nuclearia delicatula*	(Dirren and Posch, 2016)
γ proteobacteria		
Candidatus Cochliophilus cryoturris	*Cochliopodium minus*	(Tsao *et al.*, 2017)
Candidatus Occultobacter vannellae	*Vannella* sp.A1	(Schulz *et al.*, 2015)
Candidatus endonucleariobacter rarus	*Nuclearia thermophila*	(Dirren and Posch, 2016)
PVC (*Planctomycetes, Verrucomicrobiae, Chlamydiae*)		
Neochlamydia hartmannellae	*Vermamoeba vermiformis*	(Horn *et al.*, 2000)
Candidatus Parachlamydia acanthamoebae	*Acanthamoeba sp.*	(Amann *et al.*, 1997)
Candidatus Metachlamydia lacustris	*Saccamoeba lacustris*	(Corsaro *et al.*, 2010)
CFB (*Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides*)		
Candidatus Amoebophilus asiaticus	*Acanthamoeba sp.*	(Horn *et al.*, 2001)
Dependentiae (TM6)		
Vermiphilus pyriformis	*Vermamoeba vermiformis*	(Delafont *et al.*, 2015)
Babela massiliensis	*Acanthamoeba castellanii*	(Pagnier *et al.*, 2015)

Certains des endosymbiontes illustrés dans le tableau 1 sont connus pour leur cycle de vie intracellulaire. C'est le cas des bactéries appartenant à l'ordre des *Chlamydiales* qui sont des pathogènes intracellulaires notamment de l'Homme (Borel *et al.*, 2018). C'est également le cas des alphaprotéobactéries *Candidatus Caedibacter acanthamoeba*, *Candidatus Nucleicultrix amoebophila* et *Candidatus Odyssella thessalonicensis*. De plus, il a été montré que différentes espèces de *Caedibacter* sont des endosymbiontes colonisant divers compartiments cellulaires des paramécies (Fokin, 2004). A notre connaissance, *Candidatus Turbabacter delicatus* est l'unique endosymbionte d'amibes décrit à ce jour appartenant au Δ proteobacteria.

La diversité phylogénétique des endosymbiontes est également traduite par une diversité de types de relations avec les hôtes amibiens et notamment au niveau de la localisation intra-amibienne des bactéries. En effet, les endosymbiontes peuvent êtres localisés dans des vacuoles, le cytoplasme, l'espace périnucléaire ou encore le noyau des amibes (Schulz *et al.*, 2014, 2015; Dirren and Posch, 2016) (Figure 19). Ceci implique également différents moyens de dispersion des endosymbiontes. Ainsi les endosymbiontes peuvent être transmis de manière horizontale après lyse des amibes, verticale lors de la division des amibes ou des deux façons, comme dans le cas de *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* (Schulz *et al.*, 2014).

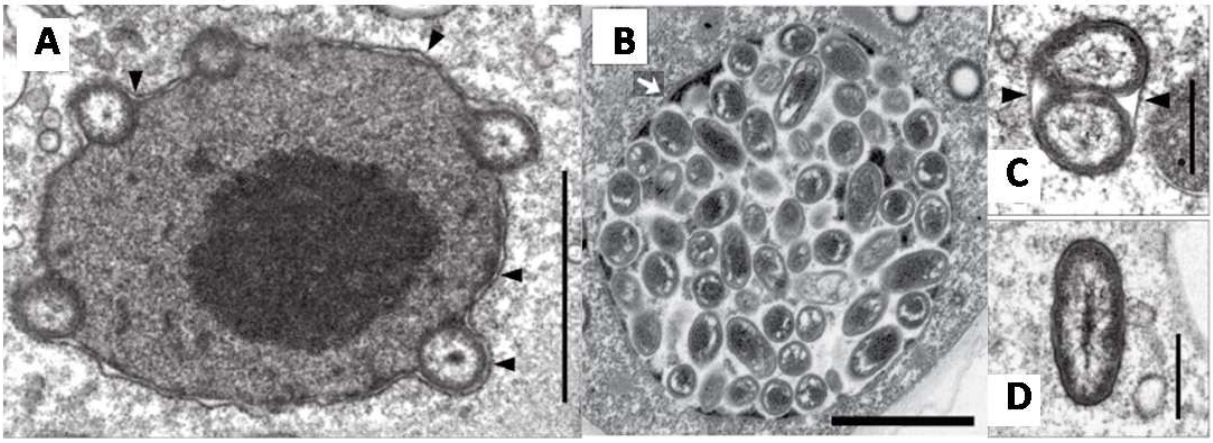


Figure 19. Différentes localisations intra-amibiennes des endosymbiontes. (A) Localisation périnucléaire de *Candidatus Nucleophilum amoebae* au sein de l'amibe JAMX8. Les flèches montrent la membrane externe du noyau. Echelle : 2µm. **(B)** Localisation de *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* dans le noyau de l'amibe *Vermamoeba sp*. La flèche montre la membrane nucléaire. Echelle : 1µm. **(C et D)** Endosymbiontes *Candidatus Occultobacter vannellae* dans l'amibe *Vannella* sp. A1 localisés dans une vacuole et dans le cytoplasme. Les flèches montrent la membrane de la vacuole. Echelle : 500 nm. (Schulz *et al.*, 2014, 2015)

La stabilité des relations symbiotiques est régulée de manière fine et l'endosymbionte peut provoquer la lyse de l'amibe lors de changement environnementaux. Ceci a été mis en évidence avec la bactérie *Parachlamydia acanthamoeba* qui est endosymbiotique de l'amibe *Acanthamoeba Polyphaga* à des températures allant de 25°C à 30°C mais qui devient lytique à des températures comprises entre 32°C et 37°C (Greub *et al.*, 2003). Des effets similaires ont pu être observés avec la bactérie *Candidatus Odyssella thessalonicensis* et l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (Birtles *et al.*, 2000). De plus, des travaux antérieurs ont mis en avant que 24% des amibes libres isolées de l'environnement sont associées à des endosymbiontes (Fritsche *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que les conditions de cultures en laboratoire jouent un rôle important dans notre capacité à identifier de nouveaux endosymbiontes et qu'il est possible de déstabiliser certaines relations stables présentent dans l'environnement entre amibes et bactéries. Ils suggèrent également qu'une grande

partie des amibes libres portent des endosymbiontes et que la diversité phylogénétique de ceux-ci est sous-estimée.

Bien souvent, les relations entre endosymbiontes et amibes mettent en avant un effet positif pour les bactéries qui utilisent leurs hôtes comme lieu de protection et de multiplication. Cependant, des études récentes ont montré un effet bénéfique des endosymbiontes pour leur hôte amibien faisant penser à une relation mutualiste. En effet, deux souches appartenant aux *Chlamydiales* protègent leurs hôtes de l'infection par *Legionella pneumophila* par deux mécanismes différents (Maita *et al.*, 2018; König *et al.*, 2019). Ainsi *Protochlamydia amoebophila* interfère avec le cycle intracellulaire de *L. pneumophila* au sein des amibes *Acanthamoeba* spp. et *Neochlamydia* eS13 empêche l'entrée de *L. pneumophila* dans les amibes.

Les amibes marines étant moins bien décrites, la majorité des endosymbiontes étudiés ont été identifiés au sein d'amibes d'eau douce ou du sol. Cependant, récemment deux endosymbiontes d'amibes marines ont été décrits : il s 'agit de Gammaprotéobactéries appartenant à une lignée proche des *Coxiellaceae* (Schulz et *al.*, 2015). *Candidatus Occultobacter vannellae* est observé au sein de vacuoles et du cytoplasme de l'amibe *Vannella* sp. A1 tandis que *Candidatus Nucleophilum amoebae* est observé dans l'espace périnucléaire de l'amibe JAMX8 (Amoebozoa), c'est-à-dire entre la membrane externe et interne du noyau.

4.2. Les bactéries résistantes aux amibes

Contrairement aux bactéries symbiotiques, certaines bactéries ont acquis au cours de l'évolution la capacité de survivre à la prédation et à la dégradation par les amibes Ce sont des bactéries intracellulaires facultatives appelées ARB pour Bactéries Résistantes aux Amibes (Amoeba-Resistant Bacteria). Pour être considéré comme une ARB, une bactérie doit respecter 3 caractéristiques. Elle doit avoir acquis la capacité de résister à la prédation et la dégradation par les amibes qu'elle soit internalisé ou non ; pouvoir survivre et / ou se multiplier dans les amibes si elle est phagocytée ; et enfin avoir une interaction transitoire avec les amibes libres (Greub and Raoult, 2004; Strassmann and Shu, 2017).

4.2.1. Diversité des bactéries résistantes aux amibes

Depuis l'observation de *L. pneumophila* dans des amibes du genre *Acanthamoeba* (Rowbotham, 1980), des études ont permis d'identifier un grand nombre d'ARB avec un nombre non négligeable de

pathogènes pour l'Homme. Les bactéries ainsi identifiées montrent une grande diversité, appartenant aux grands taxons des Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, PVC (Planctomycetes, Verrucomicrobiae, Chlamydiae) et CFB (Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides). Afin d'illustrer ces propos, le tableau suivant présente certaines espèces d'ARB appartenant aux différents taxons ainsi que les amibes associées. Cependant, il existe beaucoup d'autres ARB qui ne peuvent pas être présentées dans ce chapitre (Greub and Raoult, 2004; Thomas *et al.*, 2008, 2010; Evstigneeva *et al.*, 2009; Scheid, 2014; Balczun and Scheid, 2017; Rubenina *et al.*, 2017; Strassmann and Shu, 2017) (Tableau 2).

Tableau 2. Sélection de bactéries résistantes aux amibes mettant en évidence leurs diversités phylogénétiques.

ARB	Amibe hôte	Référence
Proteobacteria		
α proteobacteria		
Afipia felis	*Acanthamoeba*	(La Scola and Raoult, 1999)
Agrobacterium tumefaciens	*Acanthamoeba*	(Evstigneeva *et al.*, 2009)
Roseomonas gilardii	*Acanthamoeba*	(Thomas *et al.*, 2006)
β proteobacteria		
Burkholderia cepacia	*Acanthamoeba*	(Landers *et al.*, 2000)
Ralstonia pickettii	*Acanthamoeba*	(Michel and Hauröder, 1997)
Taylorella equigenitalis	*Acanthamoeba*	(Allombert *et al.*, 2014)
γ proteobacteria		
Legionella pneumophila	*Acanthamoeba*	(Rowbotham, 1980)
Vibrio cholerae	*Acanthamoeba, Naegleria*	(Thom *et al.*, 1992)
Salmonella enterica	*Acanthamoeba*	(Tezcan-merdol *et al.*, 2004)
Pseudomonas aeruginosa	*Dictyostelium*	(Pukatzki *et al.*, 2002)
ε proteobacteria		
Campylobacter jejuni	*Acanthamoeba*	(Olofsson *et al.*, 2013)
Helicobacter pylori	*Acanthamoeba*	(Tezcan-merdol *et al.*, 2004)
Actinobacteria		
Kocuria kristinae	*Acanthamoeba*	(Thomas *et al.*, 2008)
Mobiluncus curtisii	*Acanthamoeba*	(Tomov *et al.*, 1999)
Mycobacterium marinum	*Dictyostelium*	(Solomon *et al.*, 2003)
Firmicutes		
Staphylococcus aureus	*Acanthamoeba*	(de Souza *et al.*, 2017)
Listeria monocytogenes	*Acanthamoeba*	(Zhou *et al.*, 2007)

PVC ***(Planctomycetes, Verrucomicrobiae, Chlamydiae)***		
Symkania negevensis	*Acanthamoeba*	(Kahane *et al.*, 2001)
Waddlia sp.	*Naegleria*	(Thomas et *al.*, 2008)
Chlamydophyla pneumoniae	*Acanthamoeba*	(Essig *et al.*, 1997)
CFB ***(Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides)***		
Sphingobacterium multivorum	*Acanthamoeba*	(Evstigneeva et *al.*, 2009)
Flavobacterium johnsoniae	*Naegleria*	(Thomas et *al.*, 2008)
Flexibacter canadensis	*Acanthamoeba*	(Evstigneeva et *al.*, 2009)

Il est intéressant de voir que la majorité des ARB décrites le sont au sein des amibes du genre *Acanthamoeba, Vermamoeba, Naegleria* et *Dictyostelium*. Ceci est dû au fait que ces genres amibiens possèdent des représentants pathogènes de l'Homme (*Acanthamoeba* et *Naegleria*) ou qu'ils sont trouvés en abondance dans l'environnement (*Acanthamoeba* et *Vermamoeba*) ou encore qu'ils soient aujourd'hui des organismes modèles parfois plus facile à étudier que d'autres amibes (*Acanthamoeba* et *Dictyostelium*). Peu d'études se sont à ce jour intéressées aux ARBs chez d'autres amibes non modèles comme les amibes marines.

4.2.2. Adaptations bactériennes à la prédation amibienne

La compétition pour l'accès aux nutriments et autres ressources limitées est une des forces sélectives majeures de l'adaptation bactérienne. Cependant, le succès de la colonisation d'une niche dépend également de la capacité à éviter ou résister aux prédateurs naturels comme les amibes qui participent largement à la sélection de traits adaptatifs bactériens. De nombreuses bactéries sont capables de résister à la prédation par les amibes, ce qui implique une diversité de mécanismes mis en jeux. Ainsi, les bactéries ont développé différentes stratégies intracellulaire et extracellulaire afin d'échapper à la prédation amibienne. Matz et Kjelleberg ont répertorié en 2005 différentes stratégies adoptées par les proies bactériennes afin de résister au broutage par les protistes phagotrophes (Matz and Kjelleberg, 2005) (Figure 20). Généralement, afin d'augmenter leurs chances de survie face à la prédation par les protistes phagotrophes, les bactéries mettent en jeu plusieurs mécanismes.

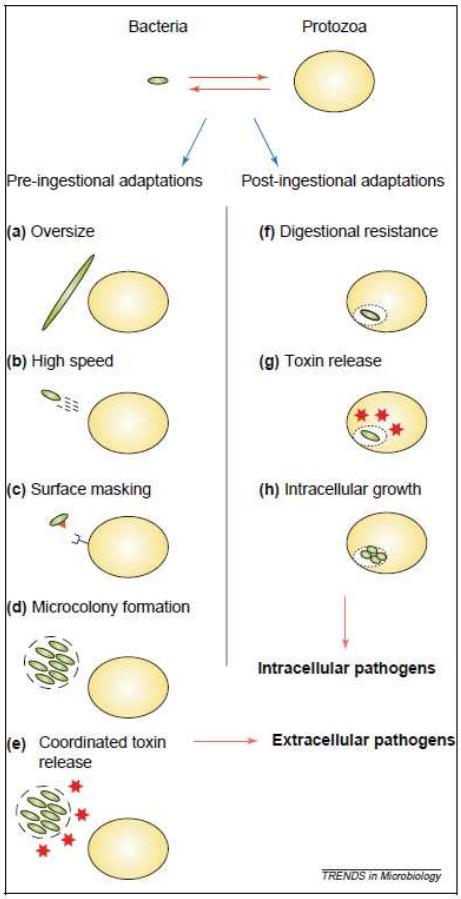


Figure 20. Mécanisme d'échappement bactérien à la prédation par les protistes. Les bactéries possèdent des mécanismes d'adaptations extracellulaire et extracellulaire afin d'échapper à la prédation par les protistes. Les mécanismes d'échappement pré-ingestionnels comprennent **(a)** un changement de morphologie, **(b)** la mobilité, **(c)** un changement de surface masquant la reconnaissance de la proie, **(d)** la formation de micro-colonies puis de biofilms et **(e)** la production de toxines. Les mécanismes post-ingestionnels comprennent **(f)** la résistance à l'activité microbicide du phagosome, **(g)** la sécrétion intracellulaire de toxines et **(h)** la capacité à croître dans les protistes. Les flèches rouges indiquent la potentielle origine de la pathogénicité des bactéries chez des hôtes supérieurs comme l'Homme. (Matz and Kjelleberg, 2005)

4.2.2.1. Stratégies extracellulaires

L'échappement à l'internalisation par les protistes constitue la première défense mise en place par les bactéries de l'environnement face à la prédation amibienne. Différentes stratégies sont alors adoptées comprenant un changement de morphologie, la motilité, un changement de surface masquant la reconnaissance de la proie, la formation de micro-colonies puis de biofilms et la production de toxines (Matz and Kjelleberg, 2005 ; Pernthaler, 2005). Ce chapitre fait un inventaire non exhaustif des stratégies extracellulaires utilisées par les bactéries afin d'illustrer leurs diversités.

-Les protistes en fonction des espèces possèdent un intervalle de taille optimale de particules qu'ils peuvent phagocyter. En 1996, Pernthaler et collaborateurs ont classé les bactéries en 4 classes en fonction de leurs tailles et de leurs susceptibilités à la prédation par les protistes. Ainsi, les bactéries

de moins de 0,4 µm et de plus de 2,4 µm sont mal broutées tandis que les tailles intermédiaires sont sensibles à la prédation par les protistes (Pernthaler *et al.*, 1996). En effet, les protistes modifient la composition, l'abondance et la morphologie des bactéries sous pression de prédation favorisant les tailles extrêmes des proies (Hahn and Höfle, 1999; Hahn and Ho, 2001; Jürgens and Matz, 2002) (Figure 21). La présence du protiste flagellée *Ochromonas sp.* au sein d'une communauté bactérienne induit l'apparition de bactéries filamenteuses (Hahn et Höfle, 1999). Il a été observé le même mécanisme lors de l'interaction entre *Bacillus thuringiensis* et *A. polyphaga* ou *D. discoideum* (Beeton *et al.*, 2013) (Figure 21). Dans cet exemple, la filamentation est induite par une concentration élevée en amibes et inhibe la phagocytose de la bactérie. Cette bactérie est capable de former des filaments allant de 20 µm à plusieurs millimètres.

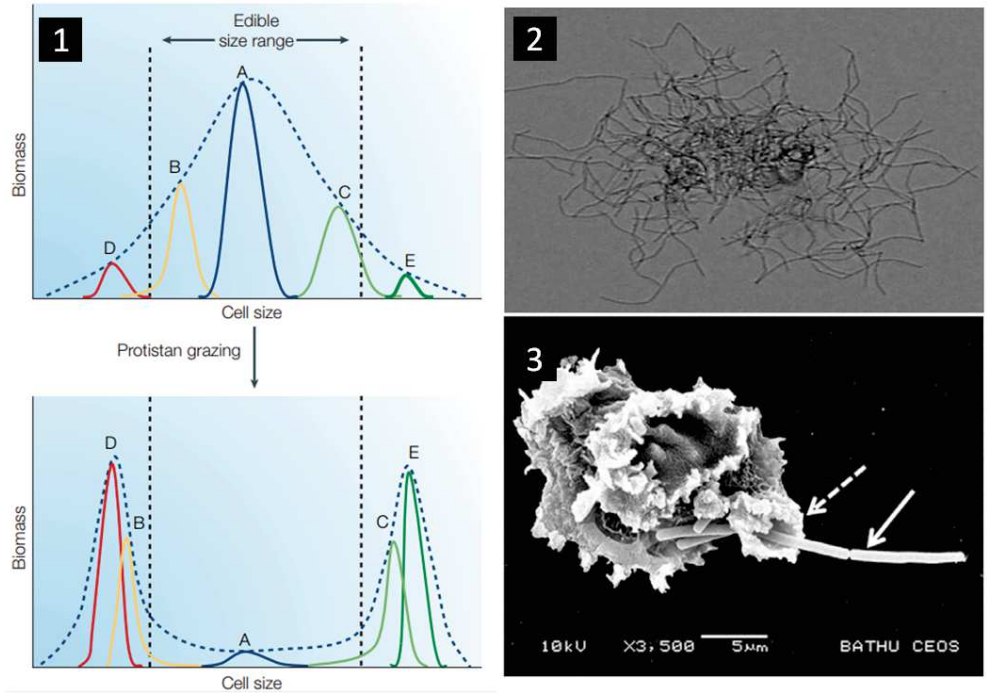


Figure 21. Effet de la prédation par les protistes sur la structuration des communautés microbiennes et la morphologie des bactéries. (1) Modèle représentant le changement de morphologie de différentes populations microbienne suite à la prédation par les protistes. L'abondance des espèces bactériennes n'étant pas dans l'intervalle de broutage des protistes augmente (D et E) tandis que la morphologie de certaines espèces évolue pour échapper au broutage (B et C). Les espèces ne pouvant pas moduler leurs morphologies sont broutées et voient leurs abondances diminuer (A). **(2)** formation de filaments de *B. thuringiensis* en réponse à la présence de l'amibe *D. discoideum*. **(3)** Observation par microscopie électronique à balayage d'*A. polyphaga* essayant de phagocyter un filament de *B. thuringiensis*. Flèche : *B. thuringiensis*, flèche en pointillé : coupe phagocytaire, échelle : 5µm. (Tiré de Pernthaler, 2005 ; Beeton et *al.*, 2013)

-Il est aisé de comprendre que la mobilité d'une bactérie grâce aux flagelles lui permet de fuir les protistes et ainsi éviter la prédation. Ceci a été mis en évidence lors de l'interaction entre différentes bactéries possédant des vitesses allant de 0,6 à 59,3 µm par seconde avec les protistes nanoflagellés *Spumella sp.*, *Ochromonas sp.* et *Bodo saltans* (Matz and Jürgens, 2005). Les bactéries hautement

mobiles montrent des contacts plus fréquents avec les protistes mais une capture diminuée pour les bactéries allant à plus de 25 µm/s. De plus les souches les plus mobiles montrent une survie plus élevée après 10h de prédation (Matz and Jürgens, 2005). Ces résultats suggèrent un défaut d'internalisation au moment du contact dus à une vitesse trop élevée des bactéries. A notre connaissance, il n'existe pas d'études montrant l'implication de la mobilité dans la survie à la prédation aux amibes. Cependant, il paraît possible que le même résultat soit observé et que ce processus soit impliqué.

-Pour ne pas être reconnu par les protistes, certaines bactéries modifient leur surface. C'est notamment le cas du pathogène humain *Klebsiella pneumoniae*. L'utilisation de souches mutantes pour la synthèse de la capsule montrent une internalisation plus faible que la souche sauvage par l'amibe *D. discoideum* (Pan *et al.*, 2011; March *et al.*, 2013). Le LPS (lipopolysaccharide) situé à la membrane externe de la bactérie joue un rôle dans la résistance à la prédation par *D. discoideum* et plus précisément l'antigène-O et le coeur composé de sucres à la base de celui-ci (March et *al.*, 2013). Les protéines de la membrane externe OmpA et OmpK36 sont également impliquées dans la résistance puisque des souches mutantes de ces protéines deviennent sensibles au broutage par *D. discoideum* (March et *al.*, 2013). Chez *Salmonella enterica*, il existe une grande diversité de sérovar exprimant des antigènes-O très variables à leurs surfaces. Cette variation des antigène-O induit des différences de résistance à la prédation par les amibes qui est dépendante de l'environnement duquel les amibes proviennent et non de l'espèce amibienne (Wildschutte *et al.*, 2004; Wildschutte and Lawrence, 2007). Ainsi les auteurs émettent l'hypothèse d'une adaptation spécifique aux prédateurs présents au sein de la même niche écologique que les bactéries (Wildschutte and Lawrence, 2007).

-La formation de micro-colonies puis la sécrétion d'exopolysccharides (EPS) activées par le quorum sensing (QS) aboutissant à la formation de biofilm apportent également un avantage face à la prédation amibienne. Le QS est un mode de signalisation bactérien dépendant de la densité de bactérie et médié par des molécules appelées autoinducteurs. En plus de la protection physique, le biofilm via le QS permet l'induction de nombreux gènes impliqués dans la formation et la sécrétion de métabolites secondaires toxiques. Les souches *Pseudomonas fluorescens* SS101 et SBW25 produisent respectivement la massetolide et la viscosine, deux composés ayant des propriétés détergentes. Ces composés protègent les bactéries de la prédation par l'amibe *Naegleria americana* en la lysant (Mazzola *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été observés avec la souche *Pseudomonas fluorescens* DR54 qui sécrète de la viscosinamide qui a un effet nocif sur les amibes *V. vermiformis* et *A. castellanii* (Andersen and Winding, 2004).

-Différents systèmes de sécrétion sont également utilisés par les bactéries pour lutter contre la prédation par les protistes. *Vibrio vulnificus* sécrète une MARTX (multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) via le système de sécrétion de type I (T1SS). Cette toxine cible le cytosquelette d'actine provoquant une altération de la croissance de *Neoparamoeba pemaquidensis* (Lee *et al.*, 2013). *V. cholerae* sécrète la protéase PrtV via le système de sécrétion de type II (T2SS), qui est cytotoxique pour le cilié *Tetrahymena pyriformis* et le flagellé *Cafeteria roenbergensis* (Vaitkevicius *et al.*, 2006). L'effet de cette protéase n'a jamais été démontré sur une amibe libre mais il est possible d'imaginer que celle-ci est également active contre une amibe. *Pseudomonas aeruginosa* sécrète différents effecteurs par le système de sécrétion de type III (T3SS) dont les effecteurs ExoU, ExoS et ExoT qui causent une mortalité importante de l'amibe *A. castellanii* (Matz *et al.*, 2008). L'utilisation de souches mutées pour le T3SS ou pour les 3 effecteurs montre un taux de mortalité d'*A. castellanii* nettement diminué. *V. cholerae* injecte dans une cellule cible des effecteurs ciblant notamment le cytosquelette d'actine par le système de sécrétion de type VI (T6SS) (Zheng *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2017). Ce mécanisme impliqué dans l'interaction avec *D. discoideum* sera plus largement décrit dans le chapitre abordant la résistance des vibrios à la prédation amibienne.

4.2.2.2. Stratégies intracellulaires

Après internalisation par les amibes, les bactéries doivent mettre en œuvre différents mécanismes pour résister à l'activité microbicide de la phagocytose. Cette résistance s'accompagne d'une croissance intracellulaire pour certaines espèces. Bien qu'il existe une diversité importante d'ARB identifié, les mécanismes de résistance impliqués sont peu décrits.

- *Legionella pneumophila* est la première ARB décrite et les mécanismes de résistance impliqués sont aujourd'hui largement étudiés en raison de sa pathogénicité envers l'Homme. Cette bactérie responsable de la légionellose est retrouvée au sein des mêmes environnements aquatiques que les amibes libres, subissant une pression de prédation constante. *L. pneumophila* a évolué afin de résister à cette prédation en perturbant l'activité microbicide de la phagocytose. Le cycle d'interaction de *L. pneumophila* peut être divisé en 4 étapes : l'entrée dans la cellule hôte, la formation de la niche réplicative, la réplication intracellulaire et la sortie de l'hôte (Figure 22).

L'adhésion et l'entrée de *L. pneumophila* est la première étape de l'infection. Diverses adhésines sont impliquées dans l'adhésion de la bactérie aux amibes *A. castellanii* et *A. polyphaga* (Stone and Abu Kwaik, 1998; Cirillo *et al.*, 2000, 2002). La lectine galactose/N-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc) facilite également l'attachement de *L. pneumophila* à l'amibe *V. vermiformis* (Venkataraman *et al.*, 1997). Lorsque cette lectine est bloquée par différent sucres, *L. pneumophila* n'est plus capable

d'adhérer à l'amibe *V. vermiformis* mais peut toujours adhérer à l'amibe *A. polyphaga* (Harb *et al.*, 1998). De manière intéressante, ce résultat montre donc que *L. pneumophila* possède des mécanismes d'attachement différent en fonction des espèces amibiennes. L'internalisation de *L. pneumophila* est induite par les amibes mais le système Dot/Icm qui est un système de sécrétion de type IV (T4SS), qui utilise l'injection d'effecteurs dans la cellule hôte, favorise l'entrée chez *A. castellanii* (Hilbi *et al.*, 2001). Cependant, les effecteurs impliqués chez les amibes n'ont pas été identifiés. L'internalisation met en jeu des pseudopodes enroulés chez *A. castellanii* comme chez les macrophages humains (Bozue and Johnson, 1996), une phagocytose classique chez *V. vermiformis* (Kwaik, 1996), et une macropinocytose chez *D. discoideum* (Peracino *et al.*, 2010). De plus, l'entrée de la bactérie est dépendante de l'actine et de la coronine (Lu and Clarke, 2005).

Après internalisation, le phagosome contenant *L. pneumophila* ne va pas suivre la voie endo-lysosomale classique mais un ensemble de processus qui vont aboutir à la formation d'une structure appelée « vacuole contenant *L. pneumophila* » ou LCV (*Legionella*-containing vacuole). La LCV est une niche favorable à la persistance et la multiplication de la bactérie. Le système Dot/Icm injecte plus de 300 effecteurs dans la cellule hôte qui vont permettre de perturber les processus cellulaires de l'hôte et détourner différents composants qui vont décorer la LCV (Isberg *et al.*, 2009; Hubber and Roy, 2010; Hilbi *et al.*, 2011; Simon and Hilbi, 2015). Au cours de l'infection, la LCV est entourée de vésicules détournées du réticulum endoplasmique, de mitochondries, de protéines et de ribosomes hôtes créant une membrane ressemblant au réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Horwitz, 1983; Tilney *et al.*, 2001). L'ensemble de ces modifications change l'identité du compartiment contenant la bactérie, lui permettant de passer inaperçu et de créer une LCV favorable à sa multiplication. Même si une grande partie des effecteurs sont encore inconnus, certains ont tout de même été caractérisés. Par exemple, chez *D. discoideum*, la protéine VipD cible Rab5 et bloque la fusion des endosomes avec la LCV, inhibant ainsi l'acidification de la LCV (Best and Abu Kwaik, 2019). L'effecteur LegK2 inhibe la polymérisation de l'actine au niveau de la LCV, ce qui empêche la fusion des endosomes (Michard *et al.*, 2015).

L. pneumophila possède un cycle de vie bi-phasique avec un changement d'expression de gènes entre les phases réplicatives et transmissives. En effet, en phase réplicative *L. pneumophila* réprime l'expression de gènes impliqués dans la virulence et surexprime les gènes impliqués dans le métabolisme et la biosynthèse. Ainsi l'expression des gènes permettant la production du flagelle, du T4SS et des différents effecteurs toxiques sont réprimés pendant la phase réplicative (Molofsky and Swanson, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006; Faucher *et al.*, 2011).

Lorsque le cycle réplicatif de la bactérie est terminé, *L. pneumophila* entre dans la phase transmissive et surexprime les gènes impliqués dans l'invasion et la virulence afin de retourner dans l'environnement (Brüggemann et *al.*, 2006). Les bactéries sont capables de sortir des amibes par des

processus lytiques ou non lytiques. Ainsi, *L. pneumophila* peut sortir de l'hôte de façon non lytique en détournant la voie de l'exocytose grâce aux effecteurs LepA et LepB sécrétés par le système Dot/Icm. En effet, des souches mutantes des gènes *lepA* et *lepB* sont capables de se multiplier dans l'amibe *A. castellanii* mais incapables de sortir (Chen *et al.*, 2004). La bactérie peut également sortir de l'amibe *A. polyphaga* en formant des pores dans la LCV puis en lysant l'amibe (Molmeret and Abu Kwaik, 2002).

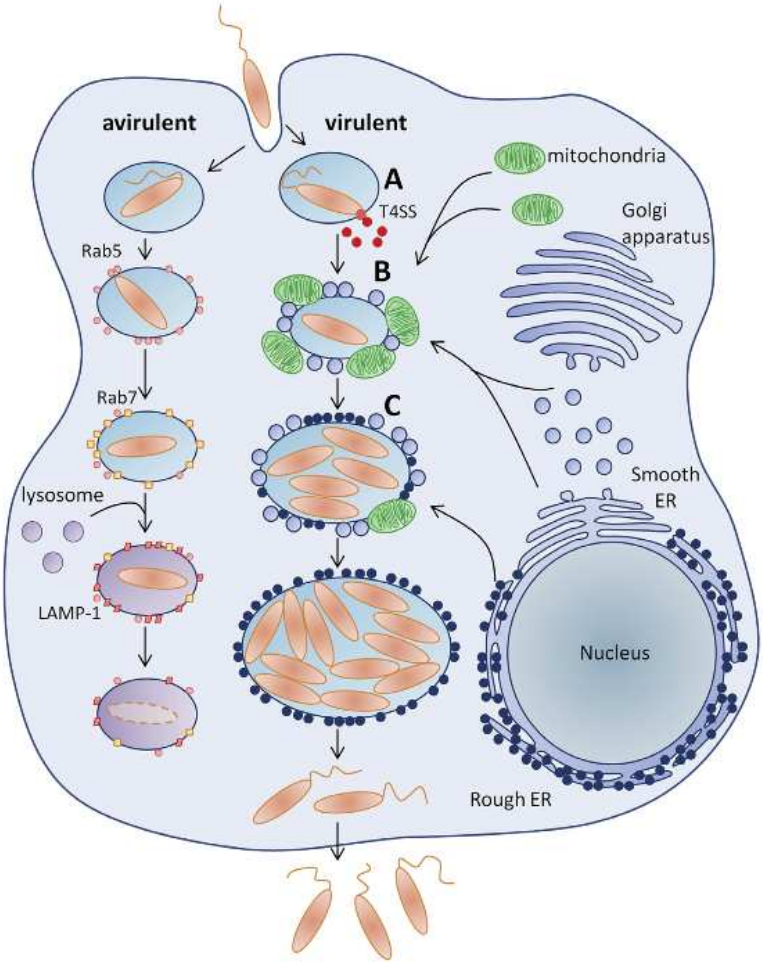


Figure 22. Cycle infectieux de *Legionella pneumophila*. Après internalisation dans un phagosome, la souche virulente injecte plus de 250 effecteurs dans la cellule hôte grâce au système Dot/Icm T4SS. L'injection d'effecteurs va perturber les processus cellulaires de l'hôte et permettre de détourner différents composant qui vont décorer la LCV (vésicules détournées du réticulum endoplasmique, mitochondries, protéines et ribosomes). La LCV ressemble fortement au RER créant une niche favorable pour la multiplication et permettant à la bactérie de passer inaperçu. La sortie de l'hôte est non lytique en détournant la voie de l'exocytose ou par lyse de La LCV suivi de celle de l'amibe. La souche non virulente déficiente pour le T4SS n'est pas capable de d'injecter d'effecteurs et suit la voie endosomale classique permettant la maturation du phagosome et la destruction de la bactérie. (Allombert *et al.*, 2013)

- Le cycle d'infection de ***Mycobacterium marinum*** est également très étudié. *M. marinum* qui est trouvé dans les environnements aquatiques, est pathogène de vertébrés marins comme les poissons mais est également un pathogène opportuniste de l'Homme (Aubry *et al.*, 2017). Le cycle d'infection

de *M. marinum* est un modèle d'étude puisqu'il est très proche de celui de *M. tuberculosis* qui est un pathogène de l'Homme (Figure 23). De plus, le génome de *M. marinum* possède 85 % de similarité avec celui de *M. tuberculosis*. Ainsi les deux espèces partages un certain nombre de facteurs de virulences comme des systèmes de sécrétion de type VII (T7SS) injectant divers effecteurs dans les cellules hôtes (Tobin and Ramakrishnan, 2008). Le cycle d'infection de *M. marinum* a été bien décrit chez l'amibe modèle *D. discoideum* (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2018).

La reconnaissance et l'internalisation de *M. marinum* sont encore peu décrites mais il semble que les lipo-oligosaccharides (LOS) à la surface de la membrane soient impliqués. En effet, des souches mutées sans LOS présentent une internalisation améliorée chez *A. castellanii* et *A. polyphaga* (Alibaud *et al.*, 2014).

Suite à l'internalisation dépendante de l'actine de la bactérie, la voie endosomale est rapidement subvertie bloquant la maturation du phagosome, permettant la mise en place de la vacuole contenant *M. marinum* (MCV : Mycobacteria-Containing Vacuole). Tout comme chez *L. pneumophila*, la MCV est une niche favorable à la réplication de *M. marinum*. En effet, la vacuoline, la cathépsine D et les pompes à protons ATPases indiquant une bonne maturation du phagosome sont absents de la MCV après 12 heures post-infection (Hagedorn and Soldati, 2007). La polymérisation de l'actine joue un rôle important dans l'arrêt de la maturation du phagosome dans les temps précoces de l'infection. Ainsi les complexes Arp2/3 et WASH sont accumulés au niveau de la MCV (Kolonko *et al.*, 2014). Très rapidement après internalisation *M. marinum* perfore la MCV à l'aide du T7SS (ESX-1) et la sécrétion de l'effecteur ESAT-6. Cette perforation est suivie d'une réponse autophagique finement régulée qui permet la réparation de la MCV par des phagophores (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2018; López-Jiménez *et al.*, 2018). La lumière de la MCV étant pauvre en nutriments, l'hypothèse est que cette perforation permettrait un apport en nutriments.

Après ces étapes, la MCV devient plus large et favorable à la réplication de *M. marinum*. Plusieurs effecteurs sont nécessaires à une bonne multiplication de la bactérie dont la protéine PE-PGRS MAG24-1 (Solomon *et al.*, 2003; Hagedorn and Soldati, 2007). Le T7SS (ESX-1) est également nécessaire à une bonne multiplication de la bactérie (Hagedorn *et al.*, 2009). En effet l'apport exogène de l'effecteur ESAT-6 ne permet pas de restaurer une multiplication optimale de *M. marinum* (Hagedorn et *al.*, 2009).

Lors de la phase précoce, *M. marinum* serait capable de détourner les gouttelettes lipidiques de l'hôte qui sont transloquées par lipophagie dans la MCV (Barisch *et al.*, 2015; Barisch and Soldati, 2017a). En phase de réplication, les phospholipides de l'hôte sont transférés à la MCV par trafic membranaire à partir de l'appareil de Golgi (Barisch and Soldati, 2017b). Les lipides ainsi accumulés servent de sources nutritives pour *M. marinum*.

En phase tardive de l'infection, *M. marinum* est retrouvé dans le cytosol de *D. discoideum* après avoir lysé la MCV grâce au T7SS et l'effecteur ESAT-6 qui forme de pores (Hagedorn and Soldati, 2007; Smith *et al.*, 2008). La sortie de l'amibe peut se faire par lyse de l'amibe probablement par des effecteurs sécrétés par *M. marinum*, mais également par des processus non lytique (Delincé *et al.*, 2016). Ainsi la bactérie peut être exocytée ou sortir par éjection via l'éjectosome impliquant la polymérisation de l'actine afin de maintenir l'intégrité de la membrane de *D. discoideum* (Hagedorn et *al.*, 2009 ; Delincé et *al.*, 2016).

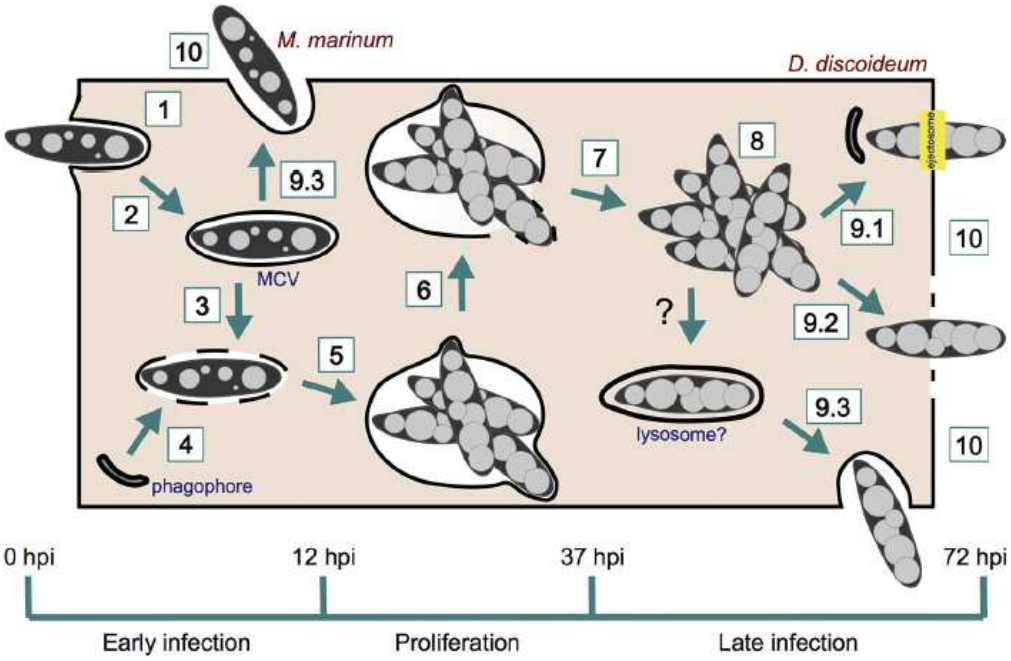


Figure 23. Cycle infectieux de *Mycobacterium marinum*. (1 et 2) Après internalisation par l'amibe *D. discoideum, M. marinum* subvertit la voie endosomale pour créer La MCV, une niche favorable pour la multiplication de la bactérie. **(3 et 4)** Le T7SS (ESX-1) de *M. marinum* perfore la MCV qui induit le recrutement de phagophores afin de réparer la membrane. **(5, 6 et 7)** la bactérie se multiplie dans la MCV jusqu'à lyse de celle-ci et libération des bactéries dans le cytosol. **(8)** La croissance de la bactérie se poursuit dans le cytosol de l'amibe puis sort par dans le milieu extérieur par éjection **(9.1)**, par lyse de l'amibe **(9.2)** ou par exocytose **(9.3)**. (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2018)

Il est fascinant de voir à quel point une bactérie peut subvertir le processus complexe de phagocytose d'un hôte de manière extrêmement fine pour survivre et même en tirer bénéfice. Par les deux exemples présentés précédemment nous avons pu constater que les bactéries sont capables de perturber des processus cellulaires et détourner les ressources d'un hôte. Même si le cycle d'infection global de ces deux bactéries est bien décrit, les régulations les plus fines restent inconnues. Il suffit de prendre pour exemple l'immense quantité d'effecteurs sécrété par *L. pneumophila* dont une grande partie possède des fonctions encore inconnues.

De plus, il existe beaucoup d'autres bactéries résistantes à l'activité microbicide de la phagocytose qui utilisent d'autres stratégies d'échappement (Smith and May, 2013). Enfin, les mécanismes

permettant de survivre à la phagocytose par les bactéries sont majoritairement décrits chez d'autres cellules que chez les amibes (Macrophage, hémocytes…). Il faut garder à l'esprit que même si le processus de phagocytose est conservé entre les cellules phagocytaires (des protistes aux métazoaires), un nombre croissant d'études montrent que certains gènes de virulences peuvent être mineur chez un hôte et majeur chez un autre (Boamah *et al.*, 2017; Van der Henst *et al.*, 2018).

4.2.3. Les vibrios résistant à la phagocytose par les amibes libres

4.2.3.1. *Vibrio cholerae*

Le vibrio le plus étudié en association avec les amibes libres est *V. cholerae* du fait de la pathogénicité de certaines souches vis-à-vis de l'Homme. Certains gènes impliqués dans la virulence de *V. cholerae* ont pu être identifiés lors de l'interaction avec des amibes libres.

Une partie des recherches ont visé à suivre la survie et la croissance de différentes souches de *V. cholerae* au sein d'amibes ou encore de suivre leurs occurrences dans l'environnement en association potentielle avec des amibes libres. Une première étude a montré que 6 souches de *V. cholerae* sont capables de survivre et de croître au sein des trophozoïtes de *Naegleria gruberi* et *Acanthamoeba polyphaga* (Thom *et al.*, 1992). La souche 152 a également pu être isolée d'un kyste de *N. gruberi* (Thom et *al.*, 1992). Les souches O1 et O139 provoquant les pandémies de choléra ont été plus étudiées. Ces souches sont capables de survivre et de croître dans les trophozoïtes d'*A. castellanii* dans le cytoplasme ou dans des vacuoles sans altérer la croissance de l'amibe (Abd *et al.*, 2005, 2007; Saeed *et al.*, 2007). Ces souches survivent dans les kystes amibiens et des observations microscopiques ont permis d'observer les vibrios dans le cytoplasme ou entre les deux parois des kystes (Abd et *al.*, 2005 ; Abd et *al.*, 2007). Les mêmes observations ont été faites lors de l'interaction avec l'amibe *A. polyphaga* avec une croissance des vibrios dans les trophozoïtes. Là encore, la croissance des amibes n'est pas altérée et les vibrios ont été localisés dans des vacuoles (Sandström *et al.*, 2010). Dans une étude plus récente, Shanan et collaborateurs se sont intéressés aux souches non-O1/non-O139 qui ne sont pas impliquées dans les pandémies mais qui sont néanmoins pathogènes et qui peuvent induire des gastro-entérites et des infections pouvant provoquer des septicémies dans de rares cas (Baker-Austin *et al.*, 2018). Les 5 isolats cliniques utilisés peuvent survivre de 5 à 14 jours en co-culture avec *A. castellanii* en fonction de la souche (Shanan *et al.*, 2016). La recherche de co-occurence de *V. cholerae* et des amibes du genre *Acanthamoeba* dans des échantillons d'eau au Soudan en zone endémique de *V. cholerae* a mis en évidence que 89% des *V. cholerae* détectés le sont en même temps que des amibes du genre *Acanthamoeba* (Shanan *et al.*, 2011).

D'autres recherches se sont intéressées à l'identification et à la compréhension des effecteurs *de V. cholerae* impliqués dans l'interaction avec les amibes. Plusieurs études ont permis d'identifier Le système de sécrétion de type VI et les effecteurs cytotoxiques associés. Il a été montré que le T6SS est associé à la virulence chez l'amibe *D. discoideum* (Pukatzki *et al.*, 2006) (Figure 24). En effet, lorsque les gènes *vasK* et *vasF* qui codent pour des protéines de structure du T6SS au niveau de la membrane sont mutés, on observe une perte de virulence. Le même résultat a été observé lorsque les gènes *hcp-1*, *hcp-2*, *vipA*, *vipB* et *clpV* sont mutés. Les gènes *hcp-1* et *hcp-2* codent pour la protéine Hcp (Hemolysin coregulated protein) qui compose le tube interne du T6SS et les gène *vipA* et *vipB* codent pour les protéines qui composent le tube externe du T6SS (Pukatzki *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2017). Le gène *clpV* code lui pour l'ATPase ClpV qui va permettre la dissociation des protéines VipA et VipB (Zheng et *al.*, 2011 ; Joshi et *al.*, 2017). Les protéines sécrétées VgrG-1, VgrG-2 et VgrG-3 (Valine-glycine repeat G) sont également impliquées dans la cytotoxicité de *V. cholerae*. Ces trois protéines forment un trimère qui est en interaction avec les protéines de la famille PAAR qui coiffent la seringue du T6SS (Pukatzki *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2017). Les protéines VgrG possèdent un domaine ACD (Actin Crosslinking Domain) qui permet la formation d'oligomères d'actine bloquant la filamentation et inhibant la phagocytose (Pukatzki *et al.*, 2007; Satchell, 2009). Seul les protéines VgrG-1 et VgrG-2 sont impliquées dans l'interaction avec les cellules eucaryotes comprenant *D. discoideum* (Zheng et *al.*, 2011 ; Joshi et *al.*, 2017). La protéine cargo VasX sécrétée par le T6SS est également un effecteur impliqué dans la virulence vis-à-vis de *D. discoideum* (Miyata *et al.*, 2011).

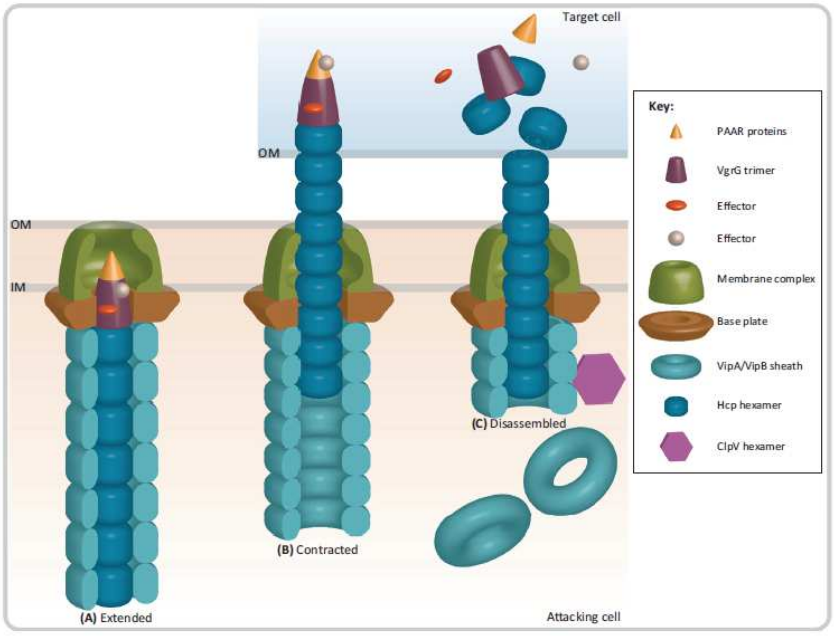


Figure 24. Contraction du T6SS permettant l'injection de protéines effectrices. (A) Le T6SS est composé d'un tube interne composé de la protéine Hcp et d'une gaine externe composée des protéines VipA/VipB. Le sommet de la seringue contient

le trimère de protéines VgrG et des protéines PAAR qui recrute différents effecteurs. Le plateau et la complexe membranaire (composé essentiellement des protéines Vas) viennent stabiliser la seringue. **(B)** la propulsion du tube interne dans la cellule cible est possible grâce à la contraction de la gaine externe. **(C)** Après translocation, Les protéines PAAR, VgrG et les autres effecteurs toxiques sont relâchées dans la cellule cible. Simultanément, l'ATPase ClpV désassemble la gaine pour que les composant du T6SS soit recyclé. (Joshi et *al.*, 2017)

Le quorum sensing (QS) et la formation de biofilm ont également un rôle dans la résistance de *V. cholerae* face à la prédation par divers protistes (Sun *et al.*, 2013; Sakib *et al.*, 2018). Le gène hapR est le régulateur global du QS qui va permettre l'activation ou la répression de l'expression des gènes *vps* permettant la production de polysaccharides (VPS) et la formation de biofilm (Conner *et al.*, 2016). Lorsqu'il y a une forte densité de bactéries, HapR réprime l'expression des gènes *vps* tandis qu'à faible densité de cellules, HapR est inactivé et la formation de biofilm a lieu (Conner et *al.*, 2016). Une invalidation des gènes *vps* ou *hapR* montre un défaut dans la capacité à former un biofilm et une diminution de la résistance à la prédation par les protistes (Sun et *al.*, 2013). En outre, la souche *V. cholerae* mutée pour le QS est plus sensible à la prédation que la souche mutée pour les gènes *vps*, indiquant que le QS participe par d'autres moyens à la résistance au broutage (Sun et *al.*, 2013).
V. cholerae exprime la protéine ToxR qui est un activateur transcriptionnel transmembranaire qui influence l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires. ToxR permet notamment de réguler l'expression des gènes *ompU* et *ompT* qui code pour des porines de la membrane externe. Chez *V. cholerae,* comme chez *V tasmaniensis* LGP32, OmpU confère une résistance aux peptides antimicrobiens (Mathur and Waldor, 2004). Une mutation de *toxR* induit une répression de l'expression de *ompU* et la formation de OmpT augmente la formation de biofilm mais diminue la survie à la prédation par l'amibe *A. castellanii* (Valeru *et al.*, 2012). De plus, lorsque *toxR* est muté, *V. cholerae* forme un biofilm rugueux alors que la souche sauvage produit un biofilm lisse (Valeur et *al.*, 2012). Ainsi, la régulation de l'expression de *toxR* est fine et complexe et participe potentiellement à différentes étapes du cycle de vie de *V. cholerae*. Une troisième porine nommée OmpA est présente chez *V. cholerae*. Une mutation du gène *ompA* est corrélée à une surproduction d'OMVs par rapport à la souche sauvage. Les OMVs sont sécrétées par les vibrios et contiennent généralement des hydrolases impliquées dans la virulence (Vanhove et *al.*, 2015). Les OMVs de LGP32 lui permettent également de résister aux AMPS de l'huître *C. gigas* (Duperthuy et *al.*, 2010). Valeru et collaborateurs ont estimé que les OMVs de la souche mutée pour le gène *ompA* diminue la viabilité de l'amibe *A. castellanii* par rapport aux OMVs de la souche sauvage (Valeru *et al.*, 2012). Cependant ces résultats semblent peu robustes et des expérimentations complémentaires doivent être menées afin de confirmer ces résultats.

Un séquençage du transcriptome de biofilm de *V. cholerae* en présence d'amibes *A. castellanii*, a révélé que 131 transcrits sont différentiellement régulés par rapport au contrôle sans l'amibe. Les gènes impliqués dans le métabolisme de la tyrosine sont notamment sous exprimés. Lorsque la voie catabolique normale de la tyrosine est inhibée, il y a une accumulation d'homogentisate qui va permettre la production du pigment pyomelanine par différentes étapes d'oxydation. Ces réactions d'oxydation induisent la production de ROS (Valeru *et al.*, 2009). L'utilisation du mutant *hgmA* permet d'invalider la voie catabolique de la tyrosine et de favoriser la formation de pigments, ce qui augmente la protection de *V. cholerae* au sein de biofilms contre la prédation de *A. castellanii* (Noorian *et al.*, 2017). Ce résultat suggère que sous la pression de prédation par les amibes, *V. cholerae* est capable de moduler la voie métabolique de la tyrosine augmentant ainsi la production de ROS au sein des biofilms, permettant une protection contre *A. castellanii*.

Les études fonctionnelles présentées précédemment se sont intéressées à certains effecteurs ou voies métaboliques de manière isolée. Cependant, grâce aux avancées des connaissances concernant *V. cholerae*, deux études plus globales ont étudié le cycle de vie de cette bactérie en interaction avec l'amibe *A. castellanii* qui est retrouvée dans les mêmes environnements (Van der Henst *et al.*, 2016, 2018) (Figure 25). En effet, les auteurs ont identifié des effecteurs de virulence mineurs et majeurs de *V. cholerae* impliqués à différentes étapes de l'interaction avec *A. castellanii*, allant de l'entrée à la sortie de la bactérie de l'amibe.

Lorsque *V. cholerae* est phagocytée par les trophozoïtes d'*A. castellanii*, certaines vacuoles digestives endosomales fusionnent entres elles pour former de plus larges vacuoles. Une partie de ces vacuoles subit un processus d'exocytose relarguant ainsi des vibrios viables dans le milieu extérieur. Une partie moins importante des vacuoles digestives fusionne avec la vacuole contractile (CV), libérant des vibrios en son sein. La vacuole contractile permet à l'amibe de maintenir un équilibre osmotique. Le QS et la production de *Vibrio* polysaccharide (VPS) via la protéine régulatrice HapR sont impliqués dans la colonisation de la CV puisqu'une double mutation de *hapR* et *vpsA* montre une colonisation accrue de la CV (Van der Henst et *al.*, 2016, 2018). La protéine HapR répresse la formation de biofilm et VpsA est une enzyme permettant la production de biofilm. Une fois colonisée, la CV est une niche réplicative pour les vibrios atteignant environ 200 bactéries par CV 20 heures post-infection.

V. cholerae sécrete la zinc-metaloprotéase HapA capable d'hydrolyser la fibronectine, la mucine ou encore la lactoferrine ainsi qu'une toxine HlyA qui est une toxine formant des pores (PFT) pouvant altérer l'intégrité des membranes. La toxine HlyA provoque un défaut d'intégrité de la membrane de la CV, une morphologie anormale des trophozoïtes, un défaut d'exocytose ainsi qu'une incapacité pour l'amibe de former des kystes matures avec des parois composées de celluloses. Afin d'éviter une

intoxication prématurée de l'amibe et de la maintenir intègre afin de profiter de la niche réplicative le plus longtemps possible la protéase sécrété HapA dégrade HlyA. En effet, la mutation du gène *hapA* induit un défaut de formation du kyste et un double mutant *hapA/hlyA* restaure une morphologie normale de l'amibe et la possibilité de produire un kyste mature.

Une fois le kyste formé *V. cholerae* lyse la membrane de la CV et continue de se multiplier dans le cytoplasme du kyste. La lyse de la membrane de la CV implique la production de VPS et la formation de biofilm car un mutant *vpsA* est incapable de lyser correctement la membrane de la CV. L'hypothèse proposée est que l'accumulation de VPS perturbe la vacuole contractile de l'amibe et donc son osmorégulation

Lorsque les vibrios se sont suffisamment développés dans le kyste, celui-ci est lysé grâce à une lecithinase. En effet, une mutation du gène *lec* permet à la bactérie de coloniser la CV et de lyser sa membrane au sein du kyste mais est incapable de lyser la paroi du kyste.

Une mutation du gène *flaA* qui code pour un composant majeur du flagelle présente une souche qui ne possède pas de flagelle et qui est incapable de sortir du kyste d'*A. Castellanii*. Après lyse du kyste, le flagelle joue un rôle majeur dans l'interaction puisqu'il permet à la bactérie de sortir du kyste pour rejoindre l'environnement aquatique. De plus, les kystes morts sont une source nutritive et sont facilement ingérés par les trophozoïtes, ce qui créer un environnement désavantageux pour les vibrios. Les auteurs émettent l'hypothèse que les amibes pourraient contre sélectionner des mutants dépourvus de motilité qui ne sont pas capables de sortir des débris de kyste.

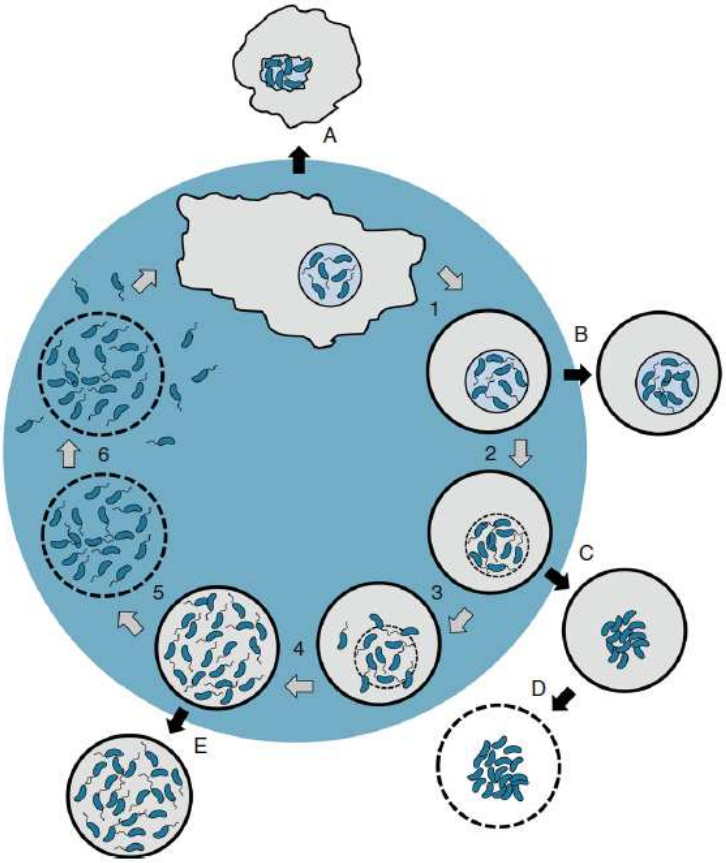


Figure 25. Cycle d'infection de l'amibe *A. castellanii* par *V. cholerae*. (1) après phagocytose les bactéries colonisent la CV des trophozoïtes d'*A. castellanii* et l'utilisent comme niche réplicative jusque dans le kyste amibien. **(2-3-4)** la CV est lysée grâce à la production de VPS et les vibrios continuent de proliférer dans le cytosol du kyste. **(5)** Une lecithinase permet la lyse des parois du kyste **(6)** et les vibrios à l'aide du flagelle quittent le kyste pour rejoindre l'environnement aquatique.
Phénotypes provoqués par la mutation de gènes clés lors du cycle d'infection : **(A)** forme aberrante du trophozoïte, défaut d'exocytoses et de formation de kyste mature (Δ*hapA*), **(B)** impossibilité de lyser la membrane de la CV (*ΔvpsA*), **(C-D)** incapacité de sortir du kyste lysé sans flagelle (Δ*flaA*), **(E)** impossibilité de lyser les parois du kyste (Δ*lec*). (Van der Henst *et al.*, 2018)

D'autre PFT comme la $MARTX_{vc}$ et VasX ont été étudiés mais n'ont pas montré de phénotype sur le cycle d'infection de *V. cholerae* dans les conditions expérimentales utilisées par les auteurs. Le gène *rtxA* code pour une RTX appartenant à la famille des MARTX (multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) sécrétée par le système de sécrétion de type I. Succinctement, après translocation à travers la membrane plasmique de l'hôte le domaine cystéine protéase libère le domaine RID (Rho-Inactivation Domain) et le domaine ACD (Actin Crosslinking Domain). Le domaine RID va favoriser la formation d'actine-G et le domaine ACD forme des oligomères d'actine-G bloquant la filamentation et inhibant la phagocytose (Kudryashov *et al.*, 2008; Satchell, 2009) Une mutation du gène *rtxA* ne change pas le phénotype d'interaction de *V.cholerae* avec *A. castellanii*. Le même phénotype a été observé après mutation du gène *vipA* qui code pour une protéine structurale essentielle du T6SS. Le T6SS permet d'injecter directement au sein d'une cellule des effecteurs toxique comme VgrG-1

(présenté précédemment), la lipase TseL ou encore la PFT VasX (Miyata *et al.*, 2011). Aucun des effecteurs du T6SS ne semble avoir de rôle dans l'interaction entre *V. cholerae* et *A. castellanii* telle qu'elle a été menée. De plus contrairement à ce qui a été observé dans des études précédentes, aucun vibrio n'a été localisé au sein du cytoplasme de l'amibe lors de cette étude.

4.2.3.2. Autres espèces de vibrios

Bien que *V. cholerae* soit le vibrio le plus étudié, l'interaction d'autres vibrios pathogènes avec des amibes a également été décrite. *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. mimicus* sont responsables de pathologies humaines importantes (Baker-Austin et *al.*, 2019). Elles sont la cause de gastro-entérites après ingestion, d'infections au niveau de blessures et pour certaines dans de rares cas de septicémies.

V. parahaemolyticus possède deux systèmes de sécrétion de type III (T3SS1 et T3SS2). Le T3SS2 codé par l'ilot génomique VPaI-7 sur le chromosome 2 permet d'injecter dans la cellule cible les effecteurs toxiques VopA, VopT, VopL, VopV, VopC et VopZ (Li *et al.*, 2019). VopA et VopZ inhibe la réponse immunitaire des cellules de mammifères (Trosky *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2013) ; VopC et VopV interagissent avec le cytosquelette d'actine de la cellule hôte (Hiyoshi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012) ; VopL inhibe la production de ROS par l'hôte (de Souza Santos *et al.*, 2017) ; VopT interagit avec les Ras GTPases (Kodama *et al.*, 2007). Le T3SS2 est associé à la virulence de *V. parahaemolyticus* chez *A. castellanii* sans toutefois connaître l'effet des effecteurs injectés de manière indépendante (Matz *et al.*, 2011). En effet, le temps pour tuer la moitié des amibes *A. castellanii* et *D. discoideum* en co-culture avec *V. parahaemolyticus* est respectivement de 25 et 19 heures. Avec une souche mutée pour le T3SS2, cette mesure n'a pas pu être effectuée du fait de la croissance des amibes (Matz et *al.*, 2011).

V. vulnificus du biotype 2 possède un plasmide de virulence qui contient le gène *rtxA* dupliqué dans le petit chromosome qui code pour la MARTX de type III RtxA1 (Lee *et al.*, 2013). Le biotype 2 contient des souches pathogènes d'organismes aquatiques comme l'anguille de l'espèce *Anguilla anguilla* pouvant provoquer parfois des infections secondaires chez l'Homme. Des amibes ont été isolées de branchies de turbot et identifiées comme appartenant à l'espèce *Neoparamoeba pemaquidensis* qui est impliqué dans des maladies liées aux branchies (Lee et *al.*, 2012). Des expériences de co-cultures entre *N. pemaquidensis* et *V. vulnificus* sauvage ou le double mutant Δ*prtxA1/ΔcrtxA1* ont été menées. En co-culture avec la souche sauvage, la croissance amibienne est très altérée alors qu'avec le double mutant la croissance de l'amibe est restaurée (Lee et *al.*, 2012).

En effet, l'observation des amibes par microscopie à contraste interférentiel montre une morphologie aberrante lors d'une co-culture avec la souche sauvage de *V. vulnificus*.

Comme d'autres espèces de vibrios, *V. mimicus* utilise le QS pour réguler l'expression de gènes dont certains sont impliqués dans la virulence. Parmi la cascade de signalisation du QS, il y a la protéine LuxO qui est un régulateur majeur de l'expression des gènes liés au QS. En effet, à faible densité cellulaire LuxO réprime l'expression des gènes liés au QS tandis qu'à forte densité cellulaire LuxO permet l'expression des gènes (Sultan *et al.*, 2006). Lorsque le gène *luxO* est muté chez *V. mimicus* on observe une expression accrue de protéase (Sultan et *al.*, 2006). Une étude a montré que *V. mimicus* est capable de survivre dans les trophozoïtes d'*A. castellanii* après phagocytose sans altérer pour autant la croissance amibienne. L'utilisation d'une souche mutée pour le gène *luxO* présente les mêmes résultats que la souche sauvage. Par microscopie électronique, les vibrios ont pu être observés dans le cytoplasme des trophozoïtes et dans les kystes (Abd *et al.*, 2010).

5. Implication de la prédation par les protistes dans l'évolution de la virulence bactérienne

5.1. Virulence bactérienne et sélection concomitante

L'évolution des espèces et la compréhension de la virulence ont depuis toujours été des sujets d'étude majeurs. Ainsi, de nombreuses théories et hypothèses ont été émises et décrites. Cependant, les différentes théories proposées n'expliquent pas complètement la trajectoire évolutive de la virulence pour certaines bactéries et notamment les pathogènes opportunistes qui sont relativement fréquents parmi les bactéries. En effet, ces modèles ne prennent pas en compte l'ensemble des facteurs pouvant influencer la virulence, notamment le fait que certains facteurs de virulence sont maintenus pour leurs avantages dans des contextes non infectieux. Ainsi, la compréhension de la virulence est extrêmement compliquée pour les pathogènes opportunistes qui peuvent coloniser plusieurs niches environnementales et être pathogènes chez un à plusieurs hôtes impliquant parfois des facteurs de virulence différents en fonction de l'hôte colonisé (Brown *et al.*, 2012). Pour répondre à cette problématique, d'autres modèles dans lesquels la sélection naturelle peut favoriser la virulence en ne tenant pas compte de la relation entre virulence et transmission ont été proposés dont l'hypothèse de sélection concomitante. Cette hypothèse suggère que la sélection

de facteurs de virulence dans une niche écologique donnée peuvent apparaître bénéfiques de manière fortuite dans une autre niche (Diard and Hardt, 2017) (Figure 26).

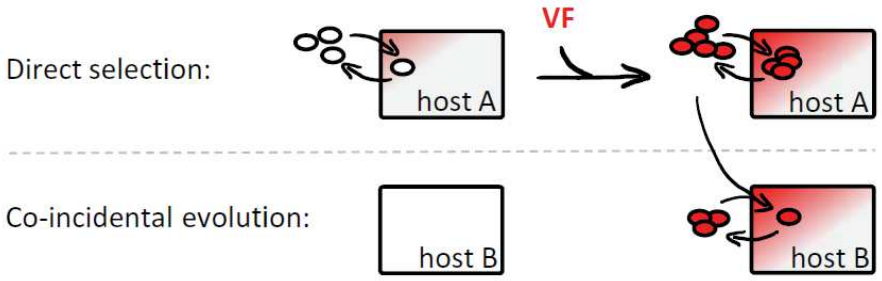


Figure 26. Sélection direct ou concomitante de facteurs de virulence. On parle de sélection directe lorsque les facteurs de virulence sont sélectionnés et utilisés au sein d'une même niche écologique. La sélection concomitante correspond à la sélection de facteurs de virulence au sein d'une niche écologique utilisée au sein d'une autre niche écologique. (Diard and Hardt, 2017)

Il a été montré que des changements environnementaux comme le réchauffement climatique, l'eutrophisation ou la diminution de la salinité jouent un rôle important dans l'émergence et la dissémination de bactéries dont certaines sont pathogènes de l'Homme. Ceci a été bien décrit pour certains vibrios pour lesquels le réchauffement des eaux de surface des océans favorise l'émergence de pathologies ainsi que leurs dispersions (Vezzulli *et al.*, 2013, 2016; Roux *et al.*, 2015).

Au-delà de ces facteurs abiotiques, les interactions biotiques peuvent sélectionner des mécanismes de virulence. Ainsi, de plus en plus d'études mettent en évidence que les protistes bactérivores dont les amibes participeraient également à cette sélection et qu'une grande partie des pathologies induites chez des hôtes métazoaires ne seraient qu'accidentelles (Adiba *et al.*, 2010). En effet, les bactéries et les protistes phagotrophes possèdent une longue histoire co-évolutive favorisant la sélection chez les bactéries de divers mécanismes de défenses impliqués dans la résistance à la prédation au sein de leur niche écologique (Matz and Kjelleberg, 2005). Ces mécanismes de résistance à la prédation par les protistes phagotrophes pourraient jouer le rôle de facteurs de virulences chez d'autres organismes rencontrés de manière fortuite comme l'Homme ou divers animaux. Ceci est en parti dû au fait que le processus de phagocytose est conservé au cours de l'évolution, des protistes aux métazoaires (Boulais et *al.*, 2010). En effet, la biologie cellulaire de la phagocytose et la maturation du phagosome mettent en jeu différents effecteurs microbicides conservés entre les amibes et les cellules immunitaires des animaux et des Hommes.

Un nombre croissant d'études a permis d'étayer cette hypothèse, mettant en évidence qu'un nombre conséquent de facteurs de virulence sont impliqués à la fois dans la résistance à la prédation par les protistes et dans la résistance à la phagocytose chez des hôtes métazoaires (Tableau 3).

Tableau 3. Exemples de facteurs de virulence bactériens impliqués dans la résistance à la prédation chez les protistes et dans la résistance à la phagocytose chez des métazoaires. (Erken *et al.*, 2013; Cardenal-Muñoz *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018)

Facteurs de virulence utilisés chez les protistes et les métazoaires	Bactéries
T1SS	*V.cholerae*
	V. vulnificus
T2SS	*L. pneumophila*
	V. cholerae
T3SS	*V. parahaemolyticus*
	P. aeruginosa
	E. coli
T4SS	*L. pneumophila*
T6SS	*V. cholerae*
	F. tularensis
T7SS	*M. marinum*
LPS	*K. pneumoniae*
	V. cholerae
Flagelle	*L. pneumophila*

En 2010, afin de tester l'hypothèse de sélection concomitante de la virulence, Adiba et collaborateurs ont étudié 31 souches d'*Escherichia coli* commensales de l'Homme ou pathogènes extra intestinaux (ExPEC : Extra-intestinal pathogenic *E. coli*) (Adiba et *al.*, 2010). Les souches commensales par définition utilisent leur hôte comme niche écologique sans effet nocif pour celui-ci. Les souches ExPEC sont trouvées dans le tractus intestinal des mammifères ne causant pas de pathologies. Cependant, ces souches peuvent accidentellement coloniser des niches stériles comme le sang ou le système urinaire et provoquer diverses pathologies (Poolman and Wacker, 2016). Les ExPEC possèdent différents facteurs de virulence absents chez les souches commensales comme des adhésines, des systèmes d'acquisition du fer, une capsule et différentes toxines (Köhler and Dobrindt, 2011).

Pour l'ensemble de ces souches les auteurs possédaient différentes données incluant la présence ou l'absence de certains gènes de virulence, la sensibilité à la prédation par l'amibe *D. discoideum*, la capacité ou non à tuer des souris après infection ainsi que plusieurs phénotypes observés comme la mobilité, la vitesse de croissance ou encore la résistance à la bile et au lysozyme (Adiba et *al.*, 2010).

Par analyse factorielle des correspondances (AFC), les auteurs ont montré que le caractère commensal, la sensibilité à la prédation par *D. discoideum* et l'absence de létalité chez les souris sont groupés entre eux alors que le caractère pathogène (ExPEC), la résistance à la prédation par *D.*

discoideum, l'induction de létalité chez les souris et la présence des facteurs de virulences sont groupés entre eux. Ce résultat suggère fortement que la virulence est associée à la résistance à la prédation chez les protistes. De plus des tests statistiques ont montré une corrélation significative du phénotype de létalité des souris et de la présence des gènes de virulence avec la résistance à la prédation par *D. discoideum* (Abida et *al.*, 2010). De manière intéressante, des amibes non pathogènes du genre *Entamoeba* ont été identifiées dans le tractus intestinal humain (Chihi *et al.*, 2018). La présence des amibes suggère des interactions constantes avec les souches intestinales d'*E. coli*, soutenant également l'hypothèse de sélection concomitante des facteurs de virulence des souches ExPEC.

Un ensemble d'études plus récentes s'est intéressé aux bactéries du genre *Bordetella* comprenant *B. pertussis* qui est un pathogène strict de l'Homme et *B. bronchiseptica* capable d'infecter différentes espèces animales. *B. pertussis* est l'agent éthiologique de la coqueluche chez l'Homme et *B. bronchiseptica* est un pathogène des voies respiratoires notamment des porcs, des chats, des lapins et des chiens (Mattoo and Cherry, 2005). Ces bactéries possèdent un ensemble de facteurs de virulence leur permettant de résister à l'activité microbicide de la phagocytose chez les mammifères (Guzman *et al.*, 1994; Lamberti *et al.*, 2010; Kuwae *et al.*, 2016). Ces facteurs de virulence comprennent notamment différents systèmes de sécrétion, des toxines et des adhésines (Mattoo and Cherry, 2005; Park *et al.*, 2015).

Une phylogénie basée sur l'ARN ribosomique 16S de 52 souches isolées de différents environnements (sol, eau, plantes et animaux) a mis en évidence la présence de 10 clades ainsi que l'origine environnementale du genre *Bordetella* (Soumana *et al.*, 2017). En effet, les séquences des souches environnementales sont présentes dans les 10 clades, incluant les clades présents à la racine de l'arbre phylogénétique. En revanche, les séquences des souches isolées d'animaux ou de l'Homme sont présentes dans seulement 4 clades au sommet de l'arbre (Soumana et *al.*, 2017). Ce résultat suggère que les souches pathogènes ont une origine environnementale et qu'une acquisition de facteurs de virulence a permis une adaptation à différents hôtes comme l'Homme. De plus, les souches environnementales possèdent les génomes les plus grands et les pathogènes stricts pouvant coloniser un seul hôte comme *B. pertussis* possède les génomes les plus petits. Les pathogènes opportunistes capables de coloniser plusieurs hôtes comme *B. bronchiseptica* possèdent des génomes de taille intermédiaire (Linz *et al.*, 2019). Une réduction du génome correspond bien souvent à une spécialisation chez un hôte. En effet, les souches de l'environnement doivent faire face à des stress variés nécessitant un panel de gènes afin de pouvoir s'adapter notamment pour la compétition dans l'accession aux nutriments. Au contraire, chez un hôte, l'environnement et les sources de nutriments sont beaucoup plus stables, ne nécessitant par une diversification des voies

métaboliques. La taille intermédiaire du génome de *B. bronchiseptica* laisse penser à un état transitoire vers une spécialisation d'hôte. Cette réduction de génome associée à la spécialisation d'hôtes explique certainement que *B. pertussis*, contrairement à *B. bronchiseptica*, est incapable de survivre à la prédation par les amibes *D. discoideum* et *A. castellanii* (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017a; Taylor-Mulneix *et al.*, 2017b). En plus d'être associées à des mammifères à une température de 37°C, des cultures de *B. bronchiseptica* sur sol à 25°C montrent une bonne croissance de la bactérie (Soumana et *al.*, 2017). Ceci indique que la souche a conservé sa capacité de survivre dans des conditions environnementales et de répondre à des changements de température.

L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre l'histoire évolutive des bactéries du genre *Bordetella* et suggère que les amibes constituent un point de départ à l'adaptation aux cellules eucaryotes permettant la transition entre l'environnement et la spécialisation chez un hôte comme l'Homme (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017b) (Figure 27).

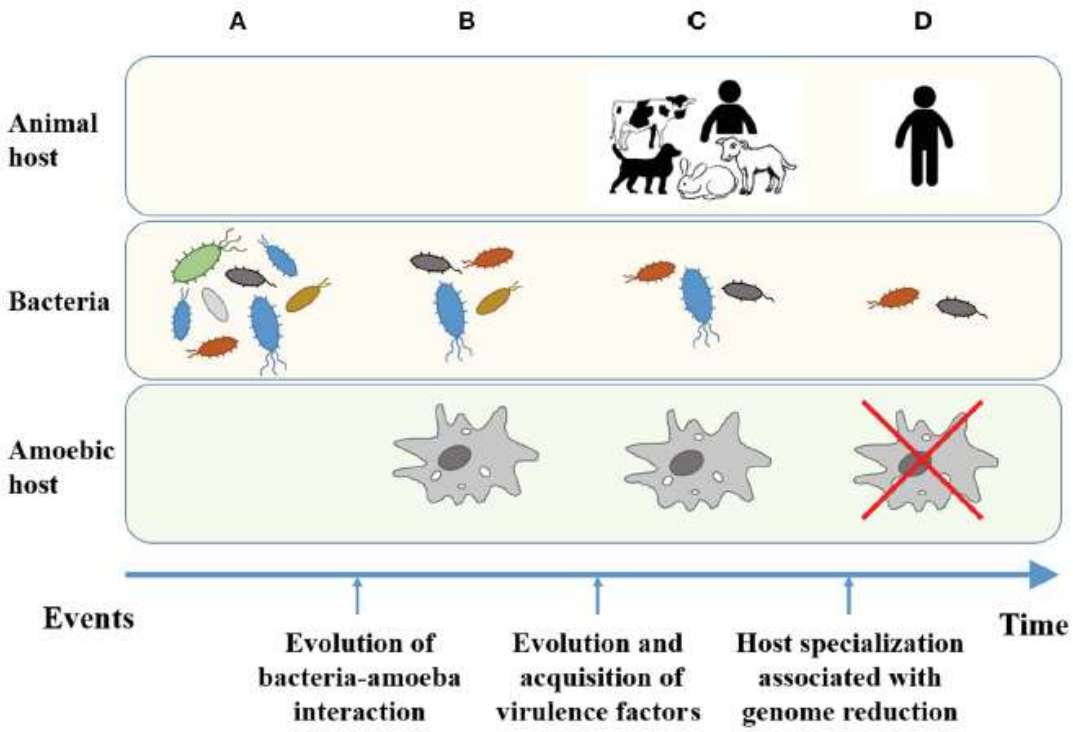


Figure 27. Sélection concomitante des bactéries du genre *Bordetella* de microbes de l'environnement à pathogène spécialisé de l'Homme. Les bactéries de l'environnement utilisées comme source nutritive par les amibes **(A)** développent des stratégies afin de résister à la prédation et à l'activité microbicide de la phagocytose **(B)**. Les bactéries capables de résister à la prédation par les amibes peuvent coloniser de nouveaux hôtes eucaryotes utilisant les mécanismes de défense à la prédation amibienne comme facteurs de virulence **(C)**. La spécialisation de certaines bactéries chez les mammifères comme l'Homme perdent la capacité de résister à la prédation par les amibes **(D)**. (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017b)

Bien que notre étude concerne les bactéries, il est intéressant de noter que l'évolution de la virulence sous pression de sélection par la prédation des protistes a été rapportée pour d'autres organismes comme les champignons. Cette hypothèse de sélection concomitante a été décrite pour

les champignons pathogènes *Cryptococcus neoformans* et *Aspergillus fumigatus* (Novohradská *et al.*, 2017; Casadevall *et al.*, 2019).

Ainsi, les protistes phagotrophes de l'environnement comme les amibes pourraient, sous l'hypothèse de sélection concomitante, participer à la sélection de bactéries résistantes à la phagocytose ensuite capables d'induire des pathologies chez les métazoaires. Cependant, les protistes phagotrophes pourraient aussi être impliqués dans l'évolution de la virulence, c'est-à-dire dans l'acquisition de facteurs de virulence par les bactéries, notamment par transferts horizontaux de gènes.

5.2. Virulence bactérienne et transfert horizontal de gènes

Le transfert horizontal de gènes contribue grandement à l'adaptation et l'évolution bactérienne. En effet, les éléments génétiques mobiles comme les plasmides ou les transposons peuvent notamment permettre d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques ou de nouveaux gènes de virulence (Juhas, 2015). Chez les bactéries, les 3 mécanismes majeurs de transfert horizontaux de gènes sont la transformation, la transduction et la conjugaison (Figure 28) (Blokesch, 2015). La transformation correspond à l'internalisation d'ADN libre par des bactéries compétentes, la transduction correspond à l'injection d'ADN par les bactériophages au sein des bactéries et la conjugaison est un processus impliquant deux bactéries, une donneuse et une receveuse, formant un lien entre elles via un pilus sexuel permettant le transfert d'ADN (Figure 28) (Blokesch, 2015).

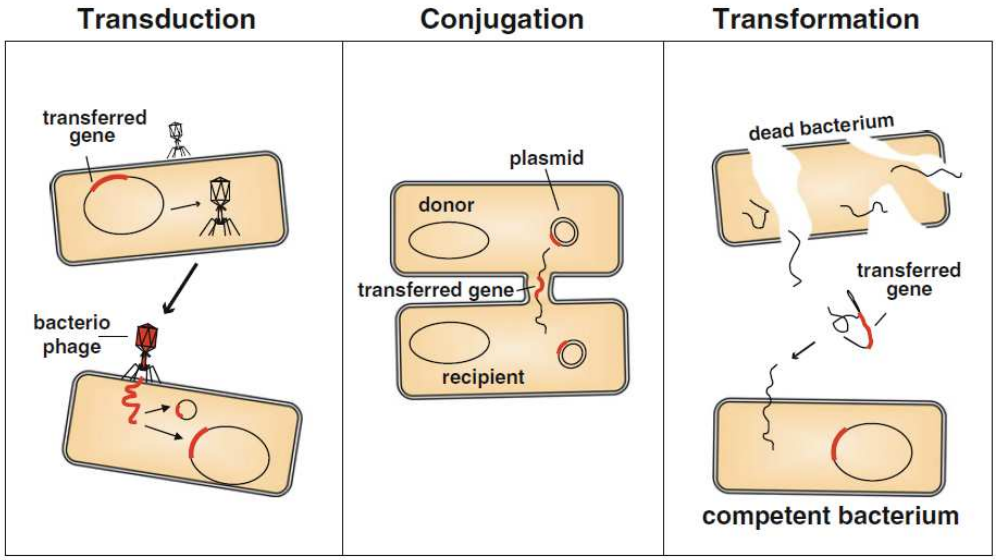


Figure 28. Mécanismes majeurs de transfert horizontaux de gènes chez les bactéries. Lors de la transduction, un bactériophage injecte son propre ADN ou accidentellement de l'ADN bactérien d'une première bactérie dans une seconde. La conjugaison nécessite une proximité entre une bactérie donneuse et une receveuse. Un pilus sexuel permet le transfert de matériel génétique de la donneuse à la receveuse. La transformation correspond à l'internalisation d'ADN libre par une bactérie compétente. (Blokesch, 2015)

Il a été montré que les protistes peuvent jouer un rôle important dans le transfert horizontal de gènes chez les bactéries. En effet ils peuvent favoriser ce processus de différentes manières.

Lors de l'internalisation par les protistes phagotrophes, plusieurs bactéries de la même espèce ou non se trouvent enfermées dans un même phagosome. Ainsi, cet environnement à la fois clos et restreint facilite les interactions entre les bactéries et peut favoriser la conjugaison. Ceci a été montré chez le protiste cilié *Tetrahymena thermophila* après ingestion de souches d'*E. coli* (Schlimme *et al.*, 2006). En effet, la fréquence de conjugaison augmente de 2000 à 4000 fois entre les souches d'*E. coli* donneuses et receveuses durant le cycle de digestion de *T. thermophila*. Une autre étude a suivi le transfert horizontal de gènes entre des souches donneuses du genre *Klebsiella* et receveuses du genre *Salmonella* au sein de protistes du rumen de bovins et de caprins (McCuddin *et al.*, 2006). Il a été mis en évidence qu'un transfert de gènes à lieu entre les deux bactéries et que cet événement est dépendant de l'internalisation par les protistes et réalisé par conjugaison. L'utilisation d'un inhibiteur de la phagocytose ou de la conjugaison perturbe le phénomène et ne permet pas de retrouver de transconjugants. Une étude plus récente a confirmé l'augmentation de la fréquence de conjugaison entre des souches d'*E. coli* au sein des ciliés *Tetrahymena thermophila* et *Tetrahymena pyriformis* et a mis en évidence qu'elle reste inchangée au sein des amibes *A. castellanii* et *D. discoideum* (Matsuo *et al.*, 2010). Cependant, il a été montré que les bactéries *Bartonella rattaustraliani* et *Rhizobium radiobacter* pouvaient potentiellement réaliser des conjugaisons au sein de l'amibe *A. polyphaga* (Saisongkorh *et al.*, 2010).

Les protistes pourraient également jouer un rôle dans le transfert horizontal de gènes en favorisant des évènements de transduction. Il existe des bactériophages lytiques comme le phage T4 se répliquant uniquement lors de cycles lytiques (Figure 29). D'autres bactériophages comme le phage λ sont dit tempérés et sont capables de mener des cycles lytiques mais aussi d'avoir une relation stable avec la cellule infectée appelé cycle lysogénique (Figure 29). En cycle lysogénique, l'ADN du phage appelé prophage peux être intégré au génome de la bactérie hôte ou rester sous forme d'un pseudo-plasmide (Salmond and Fineran, 2015). Durant le cycle lysogénique, le prophage est répliqué en même temps que l'ADN bactérien. Sous des conditions de stress, le prophage passe du cycle lysogénique au cycle lytique, se réplique, s'assemble et sort par lyse de la bactérie (Figure 29). Par exemple, chez *E. coli* O157:H7, le stress oxydatif induit le cycle lytique du prophage ST2-8624 (Loś *et al.*, 2010). Certains prophages codent pour des facteurs de virulence utilisés par les bactéries permettant d'augmenter leurs pouvoirs pathogènes (Boyd and Brüssow, 2002). Ainsi les prophages peuvent coder pour diverses toxines et des protéines impliquées dans la survie intracellulaire et

l'attachement des bactéries aux cellules hôtes. Parmi les différentes toxines, on peut citer la shiga toxine des *E. coli* et la toxine cholérique de *V. cholerae*. Il a été mis en évidence que le protiste *T. thermophila* favorise le transfert horizontal de gènes entre souches d'*E. coli* dans les phagosomes par transduction (Aijaz and Koudelka, 2017). Après internalisation des bactéries dans le phagosome, le stress oxydatif induit la phase lytique du phage 933W montrant une accumulation de phages et aboutissant à la formation de bactéries lysogènes. En effet, la formation de bactéries lysogènes est 6 fois plus importante dans les phagosomes de *T. thermophila* qu'en culture planctonique sans le protiste (Aijaz and Koudelka, 2017).

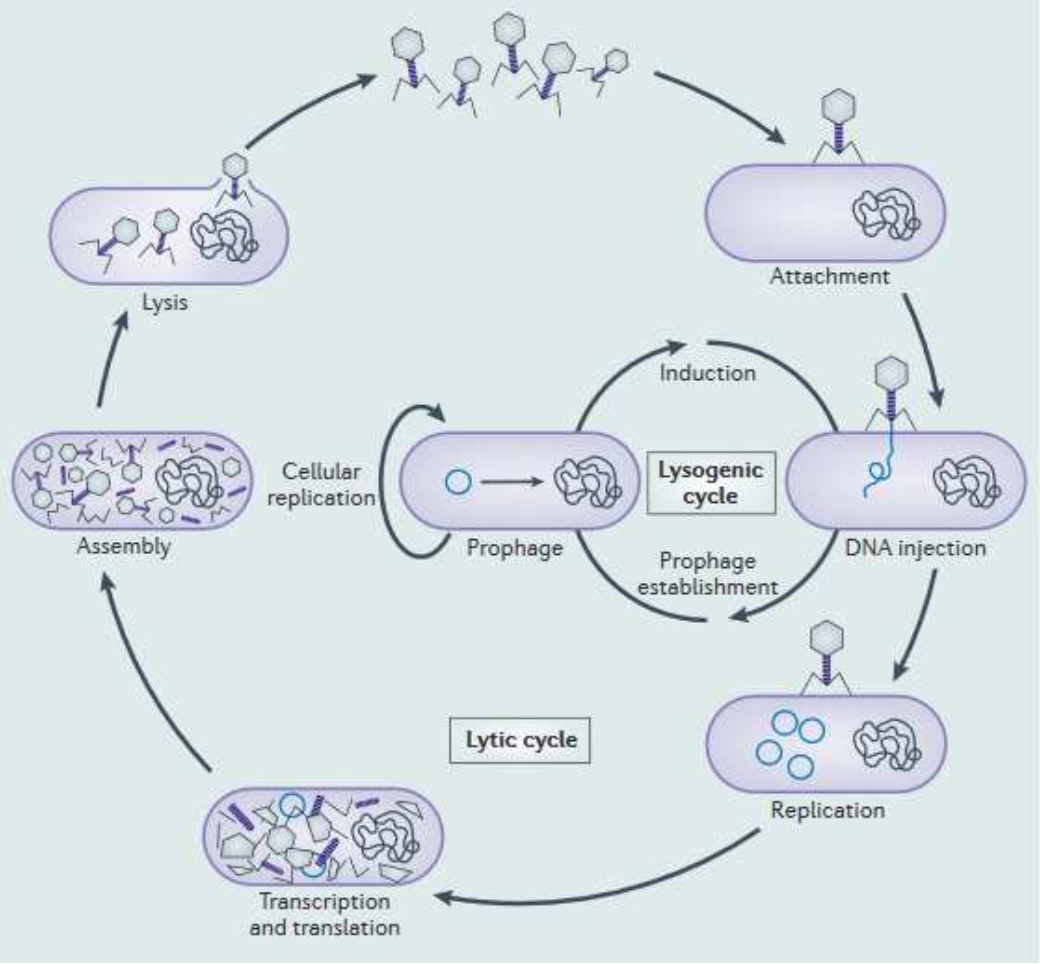


Figure 29. Cycles réplicatifs des phages. Après attachement, le bactériophage injecte son ADN dans la bactérie. Les phages lytiques entrent dans un cycle lytique tandis que les phages tempérés peuvent entrer dans un cycle lysogénique. Lors du cycle lysogénique, l'ADN du phage appelé prophage s'intègre à celui de la bactérie. L'ADN viral est répliqué en même temps que celui de la bactérie hôte. Sous des conditions de stress, le prophage démarre un cycle lytique, se réplique et induit la lyse de la bactérie. (Salmond and Fineran, 2015)

Comme présenté précédemment, la formation de biofilms permet une protection physique contre diverses substances nocives pour les bactéries comme les antibiotiques ou contre les prédateurs

phagotrophes. Ainsi, la prédation par les protistes induit la formation de biofilms (Matz *et al.*, 2005). De plus, les biofilms favorisent les interactions entre bactéries car il s'agit d'environnements clos qui contiennent des communautés bactériennes denses composées généralement de plusieurs espèces. La concentration cellulaire élevée active le QS qui favorise également le communication bactérienne (Madsen *et al.*, 2012). L'ADN extracellulaire relargué par les bactéries joue un rôle important dans la formation du biofilm et son maintien (Madsen *et al.*, 2012; Ibáñez de Aldecoa *et al.*, 2017). La densité cellulaire élevée favorise donc les conjugaisons entre bactéries et la présence d'ADN extracellulaire augmente les évènements de transformation (Madsen et *al.*, 2012).

En conclusion, à travers ce chapitre, nous avons présenté l'importante et complexe diversité des amibes. Nous avons également présenté le rôle clé au sein des réseaux tropiques des protistes phagotrophes par leur activité de prédation. En effet, les amibes pourraient jouer un rôle dans l'évolution de la virulence bactérienne et l'émergence de souches pathogènes en favorisant l'acquisition de facteurs de virulence notamment par les transferts horizontaux de gènes. Cependant, les amibes pourraient également, sous l'hypothèse de la sélection concomitante, participer à la sélection de bactéries résistantes à la phagocytose capables ensuite d'induire diverses pathologies chez les métazoaires. Ceci est dû au fait que le processus moléculaire et cellulaire de la phagocytose est conservé des protozoaires aux cellules phagocytaires des métazoaires.

Problématique et objectifs de la thèse

Comme nous venons de le voir, les bactéries du genre *Vibrio* sont retrouvées dans les milieux aquatiques et peuvent induire diverses pathologies. L'exemple le plus connu étant celui de *V. cholerae* responsable du choléra. Certaines espèces de vibrios sont quant à elles impliquées dans des pathologies animales. Ainsi, les espèces *V. tasmaniensis*, *V. crassostreae* et *V. harveyi* sont impliquées dans les épisodes de mortalité des élevages d'huîtres juvéniles *C. gigas*. Il a été montré que *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 sont capables de résister aux cellules immunocompétentes de l'huître, les hémocytes. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de pathogénicité de *V. tasmaniensis* LGP32 et *V. crassostreae* J2-9 ont été décrits dans des études antérieures, mettant en évidence que celle-ci est dépendante de la phagocytose par les hémocytes d'huîtres pour l'espèce *V. tasmaniensis* et dépendante du contact avec les hémocytes pour l'espèce *V. crassostreae*.

Les amibes libres qui sont présentes dans l'environnement marin se nourrissent par phagocytose et exercent une pression de prédation sur les communautés bactériennes. Ainsi, l'histoire co-évolutive entre les bactéries et les amibes libres a permis à certaines espèces d'acquérir des mécanismes de résistance à la prédation amibienne. Dans certains cas, cette résistance peut apporter un avantage aux bactéries en créant une niche intra-amibienne favorable à la survie et la prolifération comme par exemple pour *Legionella pneumophila.*

Les mécanismes cellulaires et moléculaire de la phagocytose étant conservés des protistes aux métazoaires, l'hypothèse de sélection concomitante de mécanismes de résistance est souvent évoquée. Ainsi, les gènes de résistance à la prédation par les protistes phagotrophes seraient impliqués de manière concomitante chez les métazoaires en tant que facteurs de virulence et/ou de résistance. Les protistes phagotrophes sont donc considérés comme des « terrains d'entrainement » permettant le maintien et l'émergence de bactéries pathogènes pour les métazoaires.

Au cours de ma thèse nous nous sommes interrogés sur la potentiel implication des amibes marines dans l'émergence de vibrios pathogènes d'huître *C. gigas* sous l'hypothèse de sélection concomitante.

Le premier objectif de ce travail de thèse était de **caractériser les amibes libres présentent en zone ostréicole ainsi que de savoir si la résistance à la phagocytose de LGP32 par les hémocytes d'huître est conservée chez les amibes.** Pour cela, une campagne d'échantillonnage mensuelle d'un an d'eau de mer, de sédiment et de branchies d'huîtres au niveau des tables d'huîtres de Bouzigues dans la lagune de Thau a été menée. Par séquençage sanger et barcoding ciblant l'ADNr 18S et 16S, cet

échantillonnage a mis en évidence une faible diversité amibienne et confirmé que l'association entre amibes et vibrios existe dans l'environnement. A partir d'une amibe du genre *Vannella* représentative de l'environnement ostréicole isolée lors de la campagne d'échantillonnage, des co-cultures ont été réalisées avec la souche pathogène d'huître LGP32 et différentes souches délétées pour des facteurs de virulence et de résistance précédemment identifiés chez les hémocytes d'huîtres. Les résultats obtenus ont permis d'émettre des hypothèses concernant l'implication différentielle des facteurs de virulence et de résistance en fonction de l'hôte de LGP32 ainsi que de l'implication potentielle des amibes dans l'hypothèse de la sélection concomitante.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été **d'étudier la dynamique des amibes dans l'environnement méditerranéen ainsi que de définir s'il existe des spécificités d'interactions entre amibes et vibrios.** Pour cela, une nouvelle campagne d'échantillonnage mensuelle d'une durée d'un an a été menée dans trois sites contrastés. La collecte d'eau de mer, de sédiment et de branchies d'huîtres a notamment permis de mettre en évidence une diversité plus importante que précédemment identifié. Nous avons observé que la diversité des amibes du sédiment est spécifique des sites géographiques et qu'elle est significativement plus faible en zone ostréicole de la lagune de Thau. De plus, pour déterminer les spécificités d'interactions, différentes sources nutritives (*E. coli* et trois vibrios pathogènes d'huître) ont été utilisées de manière ponctuelle durant la campagne d'échantillonnage. L'ensemble des résultats obtenus par séquençage sanger et barcoding ciblant l'ADNr 18S ont permis de mettre en évidence des spécificités d'interactions chez certains clades amibiens.

Chapitre II : Résultats

Résultats Section A : La résistance du pathogènes d'huître Vibrio tasmaniensis LGP32 à la prédation par l'amibe marine Vannella sp. AP1411 implique les facteurs de résistance et de virulence Vsm et copA.

Des travaux antérieurs ont montré que la souche *V. tasmaniensis* LGP32, isolée d'huître moribonde lors d'un épisode de mortalité, est capable d'entrer dans les hémocytes de l'huître creuse *C. gigas* et de survivre à l'activité microbicide du processus de phagocytose (Duperthuy et *al.*, 2011). Cette souche dont la virulence est dépendante de la phagocytose est considérée comme un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître. Ce trait est partagé par l'ensemble des souches pathogènes testées appartenant à cette espèce (Rubio et *al.*, 2019). Différents facteurs de virulence et de résistance sont ainsi impliqués lors de l'interaction de LGP32 avec les hémocytes de *C. gigas*. La porine OmpU a été identifiée comme permettant de résister aux peptides antimicrobiens de l'huître, mais le rôle majeur dans l'interaction avec l'huître est de permettre l'adhésion et l'entrée de LGP32 dans les hémocytes, une étape nécessaire à la lyse hémocytaire et à la virulence de la souche (Duperthuy et *al.*, 2010 ; Duperthuy et *al.*, 2011). LGP32 possède également les métalloprotéases scrétées Vsm et InhA qui participent à la toxicité, une sérine protéase Vsp délivrée aux hémocytes par des vésicules de membrane externe et qui est impliquée dans la virulence de LGP32 (Le Roux et *al.*, 2007 ; Binesse et *al.*, 2008 ; Vanhove et *al.*, 2015). Le phagosome, dans lequel sont internalisées les bactéries, subit des étapes de maturation séquentielles créant un environnement toxique permettant la dégradation de celles-ci. Le pH de la lumière du phagosome est progressivement acidifié via l'accumulation de pompes à proton V-ATPase. Il y a également accumulation de composés réactifs de l'oxygène et de métaux comme le cuivre (Rosales and Urib-Querol, 2017). Afin de faire face à ces différents stress et de persister au sein des phagosomes, LGP32 dispose de divers facteurs de résistance. Il a été mis en évidence que LGP32 possède une superoxyde dismutase SodA et l'alkyl hydroxyperoxydases AhpCF pour résister au stress oxydant ainsi que le transporteur de type RND CusABC et la pompe de type P-ATPase CopA, permettant l'efflux du cuivre (Vanhove et *al.*, 2016). Une étude récente a montré que LGP32 possède deux systèmes de sécrétion de type VI, le T6SS1 porté par le chromosome 1 et le T6SS2 porté par le chromosome 2. Le T6SS1 joue un rôle majeur dans la virulence de *V. tasmaniensis* : il permet l'injection intracellulaire d'effecteurs toxiques encore non caractérisés qui induisent la lyse hémocytaire ; Le T6SS2 semble quant à lui impliqué dans la compétition interbactérienne (Rubio et *al.*, 2019).

Les bactéries et les protistes hétérotrophes comme les amibes présentes dans les mêmes environnements sont en constante interaction du fait de la prédation des bactéries par les amibes pour leur nutrition, et possèdent donc une longue histoire co-évolutive. Cette co-évolution favorise l'acquisition et la sélection de facteurs de résistance à la prédation par les amibes (Matz et Kjelleberg, 2005 ; Pernthaler, 2005). Des mécanismes de défenses extracellulaires et intracellulaires peuvent être mis en jeux comme notamment la motilité, le changement de morphologie et la production de toxines ou encore la résistance à l'activité microbicide du phagosome et/ou la croissance intracellulaire (Matz and Kjelleberg, 2005 ; Pernthaler, 2005).

Les protistes de l'environnement sont aujourd'hui considérés comme des précurseurs évolutifs des interactions servant de « terrain d'entrainement » pour les bactéries (Molmeret et *al.*, 2005). En effet, malgré des divergences évolutives, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la phagocytose sont similaires à travers des espèces distantes (Boulais et *al.*, 2010). Du fait de la conservation du mécanisme de phagocytose, et selon l'hypothèse de la sélection concomitante, les adaptations acquises ou sélectionnées par un organisme au sein d'une niche écologique peuvent se révéler utiles voir nécessaires pour que cet organisme colonise une nouvelle niche écologique (Diard et Hardt, 2017). Ainsi les mécanismes de résistance à la prédation par les protistes de l'environnement peuvent devenir des facteurs de virulence chez des protozoaires (Adiba et *al.*, 2010 ; Sun et *al.*, 2018).

En gardant à l'esprit l'hypothèse de sélection concomitante, **nous nous sommes demandé si la capacité de résistance à la phagocytose de LGP32 par les hémocytes d'huîtres est conservée chez les protistes phagotrophes de l'environnement et si les mêmes facteurs de virulence et de résistance sont impliqués.** Sur la base des informations présentées ci-dessus et pour tester notre hypothèse, nous nous sommes donc posé les questions suivantes : (i) Quelles amibes retrouve-t-on majoritairement en zone ostréicole ? (ii) L'interaction entre vibrios et amibes existe-t-elle dans l'environnement ? (iii) Le pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 est-il également résistant à la prédation par les amibes ? (iv) Est-ce que les facteurs de virulence de LGP32 précédemment identifiés chez les hémocytes d'huître sont également impliqués dans la résistance à la prédation par les amibes ?

L'ensemble des résultats répondant à ces questions ont fait l'objet d'une publication dans Environmental microbiology, en 2019 : Resistance of the oyster pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 against grazing by *Vannella* sp. marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors (DOI : 10.1111/1462-2920.14770)**.**

Article 1

environmental microbiology

Environmental Microbiology (2019) **00**(00), 00–00 doi:10.1111/1462-2920.14770

Resistance of the oyster pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32 against grazing by *Vannella* sp. marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors

Etienne Robino,[1¶] Aurore C. Poirier,[1†,¶] Hajar Amraoui,[1] Sandra Le Bissonnais,[1] Angélique Perret,[1] Carmen Lopez-Joven,[1‡] Jean-Christophe Auguet,[2] Tristan P. Rubio,[1§] Chantal Cazevieille,[3] Jean-Luc Rolland,[1] Yann Héchard,[4] Delphine Destoumieux-Garzón[1] and Guillaume M. Charrière[1*]

[1]*IHPE UMR 5244, CNRS, Ifremer, University of Montpellier, University of Perpignan Via Domitia, Montpellier, France.*

[2]*MARBEC, University of Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France.*

[3]*INM, University of Montpellier, Montpellier, France.*

[4]*EBI UMR CNRS 7267, University of Poitiers, Poitiers, France.*

Summary

Vibrios are ubiquitous in marine environments and opportunistically colonize a broad range of hosts. Strains of *Vibrio tasmaniensis* present in oyster farms can thrive in oysters during juvenile mortality events and behave as facultative intracellular pathogen of oyster haemocytes. Herein, we wondered whether *V. tasmaniensis* LGP32 resistance to phagocytosis is specific to oyster immune cells or contributes to resistance to other phagocytes, like marine amoebae. To address this question, we developed an integrative study, from the first description of amoeba diversity in oyster farms to the characterization of LGP32 interactions with amoebae. An isolate of the *Vannella* genus, *Vannella* sp. AP1411, which was collected from oyster farms, is ubiquitous, and belongs to one clade of Vannella that could be found associated with *Vibrionaceae*. LGP32 was shown to be resistant to grazing by *Vannella* sp. AP1411 and this phenotype depends on some previously identified virulence factors: secreted metalloprotease Vsm and copper efflux p-ATPase CopA, which act at different steps during amoeba–vibrio interactions, whereas some other virulence factors were not involved. Altogether, our work indicates that some virulence factors can be involved in multi-host interactions of *V. tasmaniensis* ranging from protozoans to metazoans, potentially favouring their opportunistic behaviour.

Received 20 May, 2019; accepted 4 August, 2019. *For correspondence. E-mail guillaume.charriere@umontpellier.fr; Tel. +33(0) 4-67-14-46-25. Present addresses: †Department of School of Veterinary Medicine, University of Surrey, Guildford, UK; ‡Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile; §MMSB UMR 5086, University of Lyon, Lyon, France. ¶The authors contributed equally to this work.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd.

Introduction

Vibrios are γ-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 (Austin, 2010). Vibrios belong to the microbiota of healthy oysters but some species that behave as opportunistic pathogens can thrive in host tissues and cause disease (Lemire *et al*., 2014; Bruto *et al*., 2017; Rubio *et al*., 2019). This occurs mostly as a result of environmental changes such as shifts in water temperature, exposure to high animal densities and stressful farming practices or upon immune suppression of host defences by other microorganisms such as the OsHV-1 virus (de Lorgeril *et al*., 2018). Currently, vibrioses are recognized as a major factor limiting the development of aquaculture (Le Roux *et al*., 2015). In addition, vibrios can cause severe disease outbreaks in human populations, the best-known example being cholera. As they are multi-host pathogens, the ecology of vibrios depends on a series of biotic interactions in the environment that influence their ecology, their evolution and their transmission to animal and human hosts (Constantin de Magny *et al*., 2008; Takemura *et al*., 2014).

Bacteriovorus protists, such as free-living amoebae (FLA), are bacterial predators present in natural environments. They can be found in most aquatic environments and their predation through grazing activity shapes bacterial communities (Pernthaler *et al*., 2005). However, it has been shown that some bacteria are able to resist grazing, persist and even grow within amoebae (Greub and

Raoult, 2004). The best-known and described example is the facultative intracellular pathogen *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980). Predation activity by protists shares cellular and molecular processes with the antibacterial responses of metazoan immune cells, in particular phagocytosis (Boulais *et al*., 2010). Hence, amoebae have been hypothesized to act as 'evolutionary training ground' for grazing-resistant bacteria, especially for intracellular bacterial pathogens, by favouring the selection of virulence factors (Molmeret *et al*., 2005).

A number of studies have demonstrated that some *Vibrio* species adopt intracellular stages (Rosenberg and Falkovitz, 2004; Ma *et al*., 2009; Vidal-Dupiol *et al*., 2011; Ritchie *et al*., 2012; de Souza Santos and Orth, 2014). In particular, intracellular stages are required for strains of *Vibrio tasmaniensis* to express virulence in oysters (Duperthuy *et al*., 2011; Rubio *et al*., 2019). Virulent strains of this species have been isolated from moribund oysters during juvenile mortality events on the French Atlantic coast (Gay *et al*., 2004; Lemire *et al*., 2014; Bruto *et al*., 2017). This species was also found in oyster flesh during juvenile mortalities, as well as in the water column and the sediment of oyster farms in the Mediterranean Thau Lagoon, France (de Lorgeril *et al*., 2018; Lopez-Joven *et al*., 2018). Some of the *V. tasmaniensis* LGP32 virulence factors have been described in oysters. They include secreted proteases, such as Vsm (Binesse *et al*., 2008) or Vsp (Vanhove *et al*., 2014), antioxidants such as the superoxide dismutase SodA, efflux pumps to detoxify heavy metals such as the copper p-ATPase CopA (Vanhove *et al*., 2016), and a type VI secretion system that mediates the intracellular secretion of toxic effectors (Rubio *et al*., 2019).

Here, we wondered whether some virulence factors of the *Vibrio tasmaniensis* LGP32 playing a key role in its interaction with oysters could also be beneficial during other biotic interactions in the environment. With this objective, we first investigated the natural associations between vibrios and marine amoebae. Second, we did comparative cellular biology to study the interaction between LGP32 and an environmental free-living marine amoeba (*Vannella* sp. strain AP1411) ubiquitous in oyster farms, which belongs to a clade of *Vannella sp*. that establish interactions with vibrios. By performing a combination of flow cytometry, confocal and electron microscopy analyses, we show that LGP32 resists to the predation by *Vannella* sp. AP1411. Using mutant strains inactivated for previously characterized virulence factors in oysters, we found that the copper p-ATPase efflux pump CopA and the secreted metalloprotease Vsm are both involved. CopA appears to play a role in the intracellular survival of LGP32 whereas Vsm appears to play a role in the inhibition of amoebae motility during grazing. Altogether, our results indicate that some of the previously identified virulence factors involved in *V. tasmaniensis* LGP32 interaction with oysters, are also involved in resistance to predation by marine amoeba *Vannella* sp. AP1411, thus potentially favouring opportunism.

Results

Marine amoebae belonging to the Vannellidae *family and present in oyster farming area can interact with vibrios*

Although amoebae represent an important category of benthic bacterial grazers, their diversity remains poorly explored in marine environments, particularly in Mediterranean lagoons exploited for oyster farming. Therefore, we first attempt to identify and isolate FLA in marine environments hosting oyster farms. Amoebae were isolated from the Thau lagoon at the vicinity of an oyster farming area. Samples were collected from the water column, oyster gills and sediment at all seasons between the year 2014 and 2015, and at least two cultures of amoebae per fraction and per season were analysed. Cloning-sequencing of the v7 hypervariable region of 18S rDNA gene was used to identify the isolated amoebae. A total of 110 sequences were analysed. From 24 different cultures, 103 amoebae sequences showed more than 90% sequence homology to the *Vannella* genus, which belongs to the *Vannellidae* family. The 103 sequences were classified into 11 different Operational Taxonomic Units (OTUs) (Fig. 1 and Table S1). In parallel, 16S barcoding of the different amoebae cultures confirmed that only species belonging to the *Vannella* genus were present in the samples (Fig. S1). One OTU of *Vannella* sp. was ubiquitous, as it was found in the three fractions during four seasons, and referred to the isolate AP1411 (arrow in Fig. 1). In an attempt to determine whether marine amoebae could be found associated with *Vibrionaceae* in the environment, a dedicated sampling was performed in 2017 and amoebae were clonally isolated from oyster gills and from water column in another site (Banyuls-sur-mer, France) as an out-group. Then 16s barcoding analyses were performed to characterize the bacteria that remained associated to these *Vannella* clones 4 weeks after culturing. From all the clones analysed, four were found associated with *Vibrionaceae* OTUs (Fig. 2A). In order to validate this association, the presence of *Vibrionaceae* associated with the four *Vannella* sp. clones was then assessed by FISH using a 16s probe specific for vibrios (Huggett *et al*., 2008) (Fig. 2B). Among the four clones that were analysed, two showed an association with *Vibrionaceae* (0517-TOEc-2 and 0517-TOEc-4). The vibrios could be found inside amoebae as well as outside. These results suggest that amoebae of the *Vannella* genus can establish interactions with vibrios in the environment.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

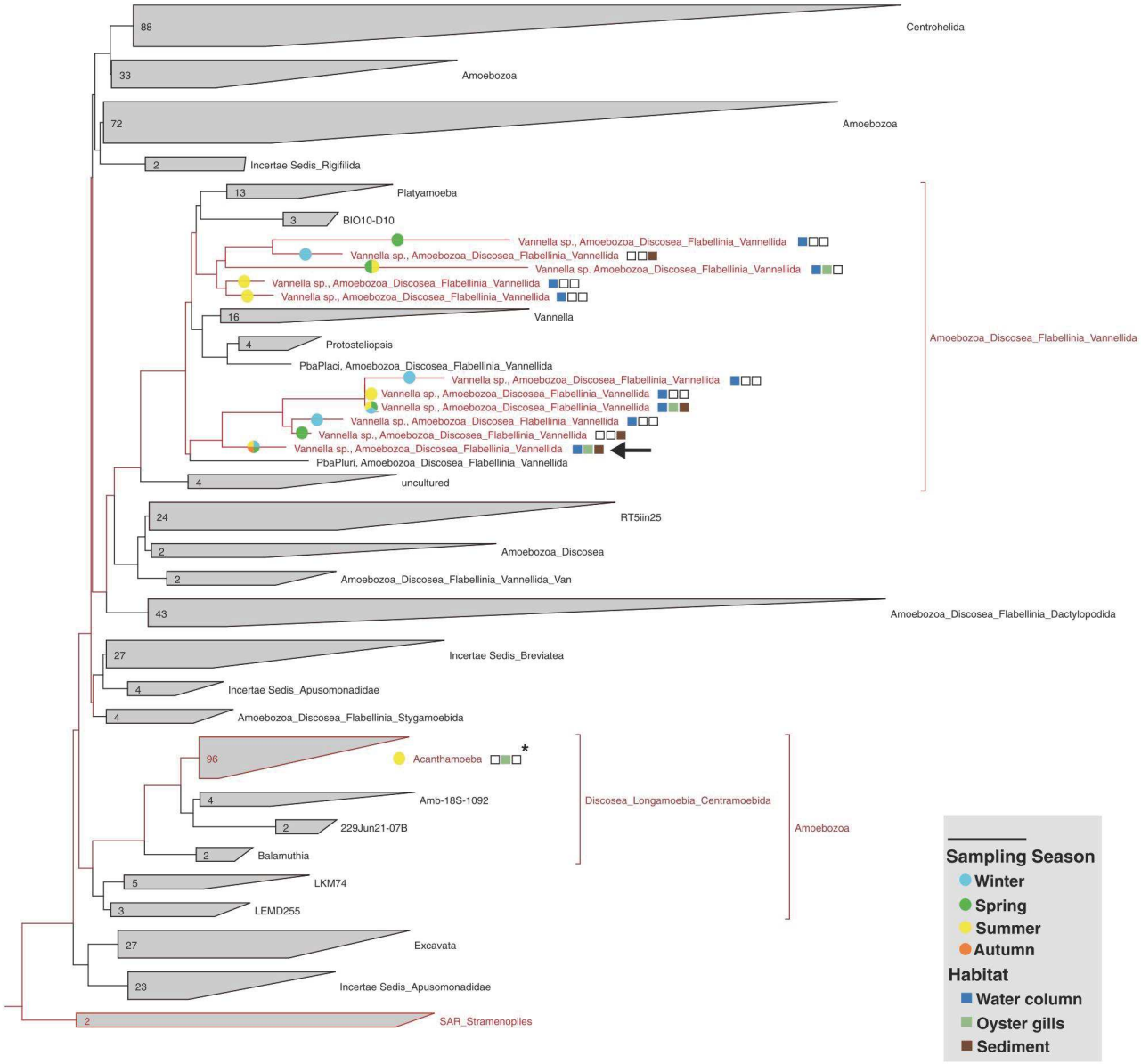


Fig. 1. Most of the isolated free-living amoebae from the Thau lagoon belong to *Vannellidae* family. Phylogenetic 18S rRNA-based trees of the Amoebozoa constructed with ARB software (Ludwig *et al*., 2004; http://www.arb-home.de) loaded with the silva database (http://www.arb-silva.de). A base frequency filter was applied using the parsimony quick add marked tool implemented in ARB. Our isolates are written in red. Most of the isolated amoebae during the environmental survey from water column (blue squares) and/or the sediment (brown squares), and/or oyster gills (light green squares) during winter (light blue circles) and/or spring (green circles) and/or summer (yellow circles) and/or autumn (orange circles) belong to the *Vannellidae* family.

The pathogen V. tasmaniensis *LGP32 resists grazing by* Vannella *sp. AP1411*

To study further the interaction between vibrios and *Vannella* amoebae, we chose the *Vannella* sp. AP1411 clone, which belongs to the most ubiquitous OTU of marine amoebae and which is not already associated with other vibrios, as shown by FISH (Fig. 2B). The trophozoite, planktonic and cystic forms of *Vannella* sp. AP1411 were typical of the *Vannella* genera and very similar to *Vannella plurinucleolus* (Smirnov *et al*., 2007), which was also the closest 18S matching sequence for this isolate (98% BLASTn score). Transmission electron microscopy of trophozoïtes revealed a typical intracellular organization of *Vannella* with a well-defined, thick plasma membrane, one nucleus (sometimes two or three), numerous mitochondria and a rich vacuolar system with large digestive vacuoles containing remnants of degraded bacteria, and some phagosomes containing individual bacteria (Fig. S2).

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

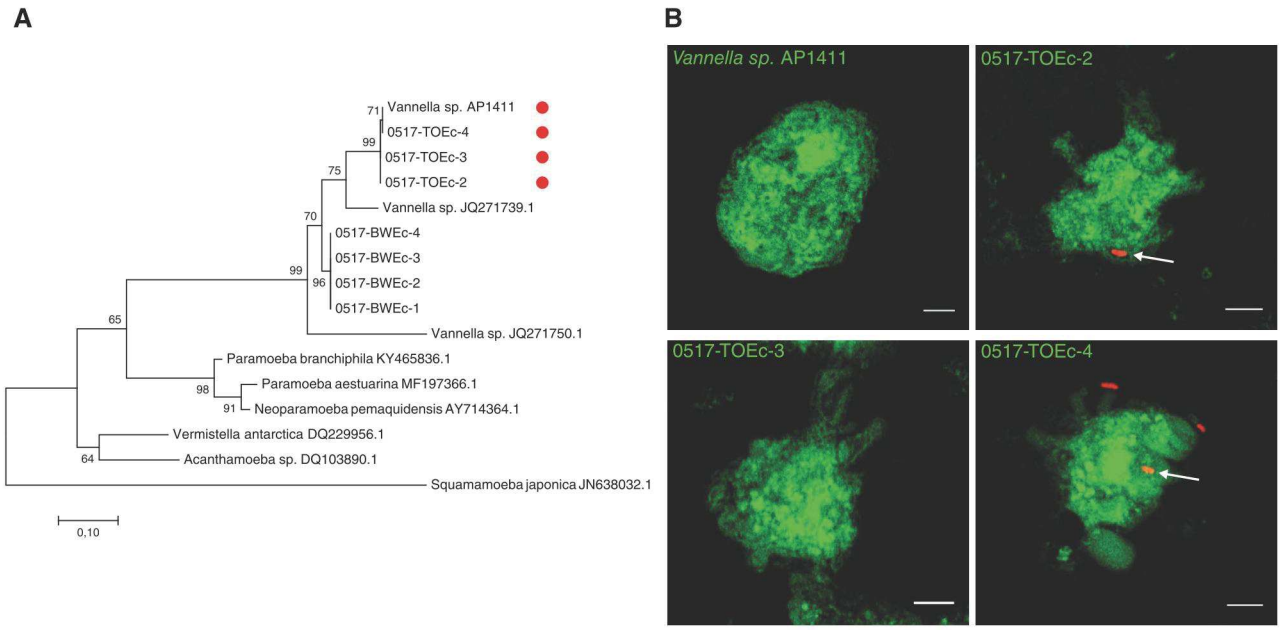


Fig. 2. Amoebae belonging to the *Vannella* genus can be found associated with *Vibrionaceae* bacteria in oyster farms. *Vannella* were clonally isolated from oyster gills from Thau lagoon (*Vannella* sp. AP1411, 0517-TOEc-2, 0517-TOEc-3, and 0517-TOEc-4) or from seawater in Banyuls-sur-Mer (0517-BWEc-1, 0517-BWEc-2, 0517-BWEc-3, and 0517-BWEc-4), then 16s barcoding sequencing was performed to identify potentially associated *Vibrionaceae*.
A, The 18S rRNA tree was constructed with maximum-likelihood by bootstrap method (1000 replications), isolates found associated with *Vibrionaceae* by 16s barcoding analyses are indicated with red dots.
B, *Vibrionaceae* were revealed by FISH using the VIB572a *Vibrionaceae* specific probe (Red) and amoebae cells were counterstained with FITC. Vibrios could be observed both outside and inside (arrows) amoebae by confocal microscopy. Scale bar: 5 μm.

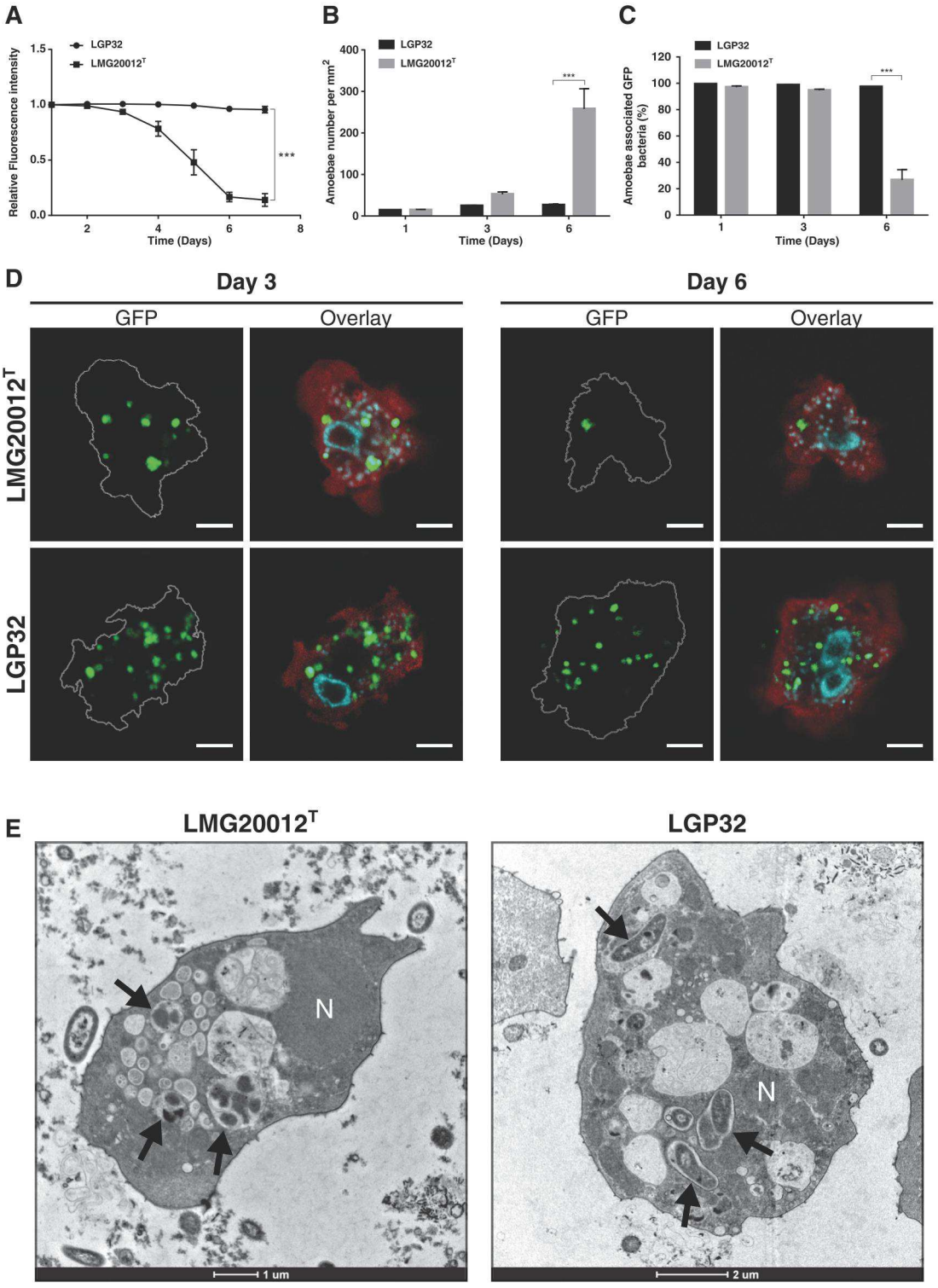
To study LGP32 – *Vannella* sp. AP1411 interactions, grazing assays were performed on solid media (non-nutrient seawater agar). *Vibrio* strains (pathogenic or non-pathogenic to oysters) that constitutively express the Green Fluorescent Protein (GFP) were used to seed the plates and monitor the abundance of living vibrios by fluorescence quantification. In parallel, *Vannella* sp. AP1411 growth was monitored by counting the cell density at the surface of the grazing lawns. When the amoeba was cultured in the presence of the non-virulent *Vibrio tasmaniensis* LMG20012^T, a rapid decay of GFP-expressing bacteria was observed 4 days after the beginning of the experiment, whereas in the case of the pathogenic *V. tasmaniensis* LGP32, the amount of GFP-expressing bacteria remained stable for up to 7 days (Fig. 3A). Amoeba growth (cells count) on the vibrio lawns counter mirrored the kinetics of the decay of GFP-expressing bacteria. Indeed, amoeba density increased much faster in the presence of LMG20012^T than in the presence of LGP32 (Fig. 3B). These data indicate that *Vannella* sp. AP1411 do not prey efficiently on the virulent LGP32, whereas they can feed on the non-virulent LMG20012^T.

To determine whether the amoebal growth defect observed in the presence of LGP32 was due to inefficient phagocytosis and/or resistance to intracellular degradation by LGP32, we next quantified the capacity of *Vannella* sp. AP1411 to phagocytose LGP32 and LMG20012^T, using flow cytometry (Fig. S3). The amount of amoebae carrying GFP-vibrios was quantified 3 and 6 days after grazing, at 3 days after the beginning of the interaction, 100% of amoebae were found to carry GFP-LMG20012^T or GFP-LGP32 (Fig. 3C). However, at day 6, the percentage of amoebae carrying GFP-LMG20012^T decreased down to 20% whereas it remained stable with GFP-LGP32 (Fig. 3C) suggesting that LGP32 could resist intracellular degradation. Confocal microscopy investigations confirmed that the amoebae were able to phagocytose both vibrios (Fig. 3D). These observations also confirmed that 6 days after the onset of the grazing assay, 80% of amoebae were devoid of any GFP-LMG20012^T as quantified by flow cytometry, with only 20% of amoebae that were still carrying intracellular GFP-LMG20012^T, whereas 100% of the amoebae were still carrying numerous GFP-LGP32 (Fig. 3D). This suggests that GFP-LGP32 is able to resist intracellular degradation after engulfment in contrary to the non-virulent control strain GFP-LMG20012^T that seemed to be digested by the amoeba.

To investigate further the intracellular fate of the vibrios inside amoebae, transmission electron microscopy was performed 3 days after the onset of grazing (Fig. 3E). Most LMG20012^T cells were found clustered inside vacuoles and showed altered morphologies whereas LGP32 remained intact inside amoebae and were mostly found in

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

individualized phagosomes confirming that LGP32 is resistant to intracellular degradation compared with LMG20012^T. Altogether, these results show that LGP32 is resistant to grazing by *Vannella* sp. AP1411 as opposed to the non-virulent LMG20012^T, and that LGP32 is able to resist to intracellular degradation by the amoeba.



© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

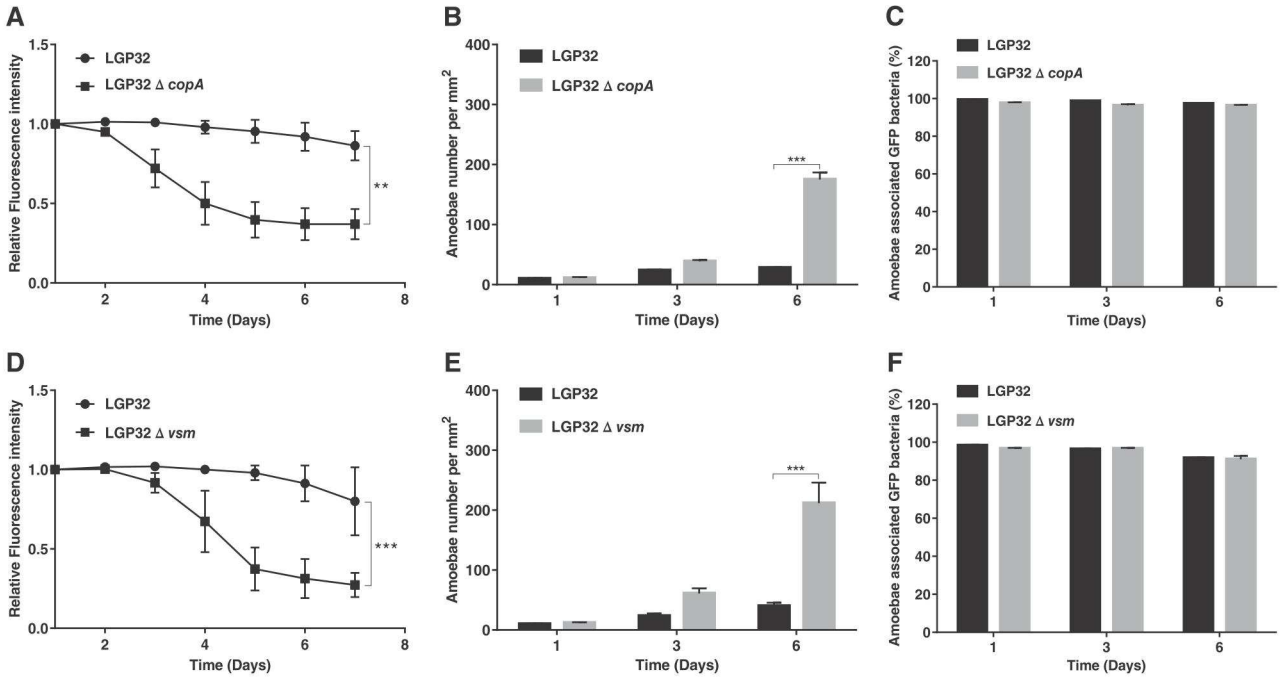


Fig. 4. Copper p-ATPase efflux pump CopA and metalloprotease Vsm are involved in LGP32 resistance to grazing by *Vannella* sp. 1411.
A–D, Bacterial resistance of *ΔcopA* and *Δvsm* strains of LGP32 was assessed by measurement the fluorescence of the GFP-expressing bacteria, after contact with amoebae. Each condition was performed in triplicate and the results shown are the average of three independent experiments. Values are presented ±SEM, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ (RM-ANOVA).
B–E, Amoeba growth was monitored by manual counting under phase light microscopy. Each condition was counted in three technical replicates. The results shown are representative of two independent experiments ±SEM. Data were analysed by two-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparisons test, $^{***}P < 0.001$.
C–F, In two independent experiments, percentage of amoebae associated with GFP bacteria was measured by flow cytometry. Each condition was performed in three technical replicates. The results shown are representative of two independent experiments ±SEM. Data were analysed by two-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparisons test.

The Vsm and CopA virulence factors participate in LGP32 resistance to grazing by marine amoeba

To investigate further the molecular basis of LGP32 resistance to predation by *Vannella* sp. AP1411, we studied the phenotype of mutant strains of LGP32 deleted for virulence factors previously identified to be involved in its interaction with oysters. On the one hand, we examined stress resistance systems, that are, the antioxidant SodA, and the copper resistance systems CopA and CusAB, involved in intraphagosomal resistance to antimicrobial activities of oyster immune cells (Vanhove *et al*., 2016) and on the other hand, we examined secreted virulence factors, that are, the metalloprotease Vsm and the serine protease Vsp that both play a role in oyster pathogenesis (Binesse *et al*., 2008; Vanhove *et al*., 2014); as well as the metalloprotease InhA (the orthologue of PrtV) that has been involved in multiple biotic interactions of vibrios (Vaitkevicius *et al*., 2006), and finally the T6SS1 secretion system required for cytotoxicity towards oyster immune cells (Rubio *et al*., 2019). Among the eight mutant strains of LGP32 tested here, only

Fig. 3. LGP32 is resistant to grazing by marine amoebae *Vannella* sp. AP1411.
Grazing assays were performed with *Vannella* sp. AP1411 with GFP-expressing strains of LGP32 or of the avirulent LMG20012^T.
A, Bacteria survival was assessed by monitoring the intensity of the GFP fluorescence. Each condition was performed in triplicate and the results represent the average of three independent experiments. Values are presented ±SEM $^{***}P < 0.001$ (RM-ANOVA).
B, Amoebae growth was monitored by manual counting under phase light microscopy. Each condition was performed in three technical replicates and depicted results are representative of two independent experiments ±SEM. Data were analysed by two-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparisons test, $^{***}P < 0.001$.
C, The percentage of amoebae carrying GFP-expressing bacteria was quantified by flow cytometry. Each condition was performed in three technical replicates and depicted results are representative of two independent experiments ±SEM. Data were analysed by two-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparisons test, $^{***}P < 0.001$.
D, LMG20012^T and LGP32 were observed inside amoebae by confocal microscopy 3 days and 6 days after contact. Nuclei were stained with DAPI (Blue) and amoeba proteins with Blue Evans (Red). Scale bar: 5 μm.
E, Transmission electron microscopy was performed on amoebae, 3 days after grazing on LGP32 or LMG20012^T lawns. Avirulent LMG20012^T vibrios were found clustered in intracellular vacuoles with an altered shape (arrows), compared with extracellular vibrios around the amoeba. Virulent LGP32 vibrios were found mostly in individualized phagosomes, and appeared intact (arrows). Scale bar: 1 and 2 μm.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

the Δ*copA* and Δ*vsm* deletion mutants were significantly less resistant to grazing by *Vannella* sp. AP1411 than the wild-type strain, as shown by a faster clearance of GFP-vibrios on grazing lawns (Fig. 4A and D; and Fig. S4). Accordingly, on lawns of both Δ*copA* and Δ*vsm*, rapid bacterial clearance correlated with faster amoebal growth as

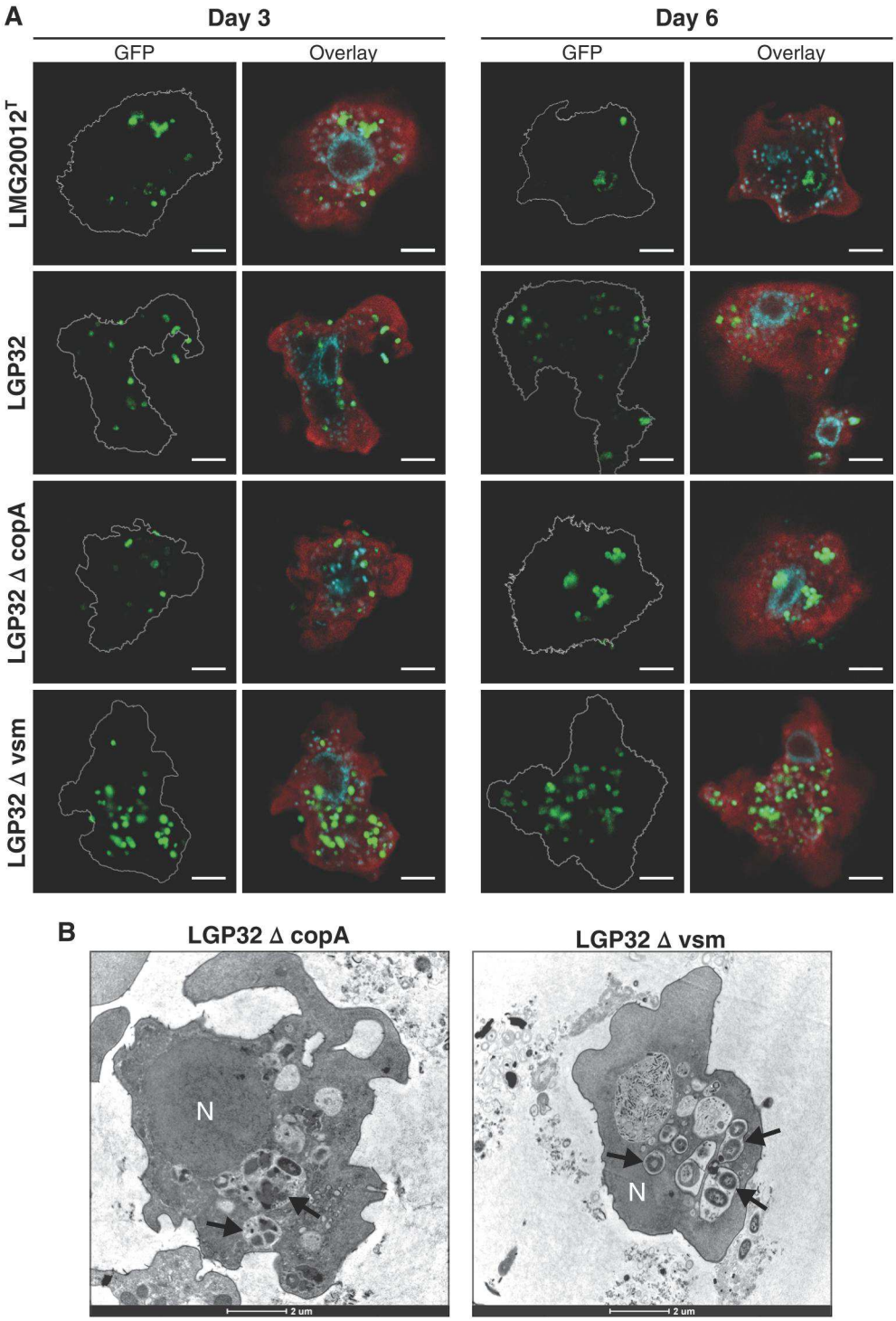


Fig. 5. Copper p-ATPase efflux pump CopA is necessary to resist to intracellular degradation in amoeba whereas the metalloprotease Vsm is not.
A, Intracellular vibrios were observed 3 days and 6 days after infection, by confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI and amoeba proteins with Blue Evans. Scale bar: 5 μm.
B, Transmission electron microscopy was performed on amoeba 3 days after grazing on *ΔcopA* or *Δvsm* mutant strains. Mutant *ΔcopA* vibrios were found clustered in intracellular vacuoles with an altered shape and appearance (arrows). Vibrios *Δvsm* LGP32 were found mostly in individualized phagosomes, and appeared intact (arrows), scale bar: 2 μm.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

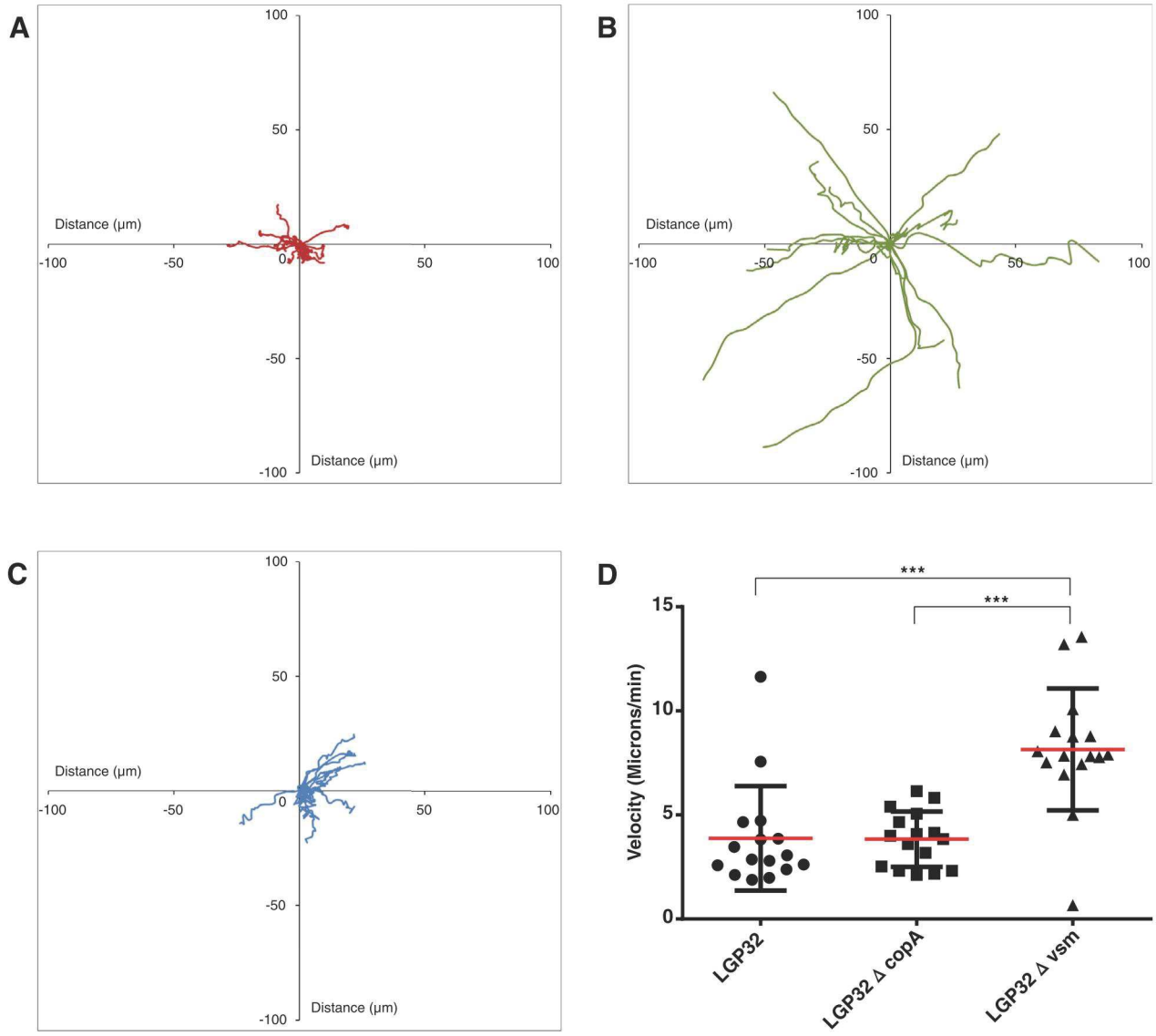


Fig. 6. Extracellular metalloprotease Vsm decreases the velocity of the amoebae *Vannella* sp. AP1411 and alters amoeba grazing efficiency. Amoebae migration on LGP32wt (A), Δ*vsm* (B) or Δ*copA* (C) mutant strains lawns was recorded by time-lapse phase light microscopy during 10 min. Each presented track corresponds to the migration of one amoeba. The results shown are representative of at least two independent experiments. (D) Average velocity of amoebae on LGP32wt, Δ*copA* or Δ*vsm* mutant strains. The results are representative of at least two independent experiments ± SD. Data were analysed by Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, ***$P < 0.001$.

shown by the higher amoeba density than on wild-type LGP32 lawns (Fig. 4B and E). These results show that both the CopA resistance factor and the Vsm virulence factor play a role in the resistance of LGP32 to grazing by *Vannella* sp. AP1411 whereas the other tested virulence factors did not seem to be involved.

The p-ATPase CopA confers resistance to intracellular killing and the extracellular protease Vsm inhibits amoebae motility during grazing

To investigate further the role of LGP32 virulence factors in resistance to amoeba grazing, we analysed different steps of the grazing process, from phagocytosis to intracellular degradation. Flow cytometry analyses showed that the percentage of phagocytosis (Fig. 4C and F) and the phagocytosis index (Fig. S5) were not significantly different between the mutant strains Δ*copA* and Δ*vsm* and the wild-type LGP32, which suggested that the efficiency of the phagocytosis process was not disturbed by CopA or Vsm. Confocal and TEM microscopy confirmed that both mutant strains were readily phagocytosed by the amoeba, and revealed that Δ*copA* LGP32 vibrios were found mostly clustered in vacuoles and the bacteria appeared to have an altered morphology after 3 days of grazing. These observations suggest that Δ*copA* LGP32

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

was more sensitive to intracellular degradation, indicating a role for *copA* in resistance of LGP32 to intracellular degradation. In contrast, Δ*vsm* LGP32 appeared intact inside vacuoles and individual phagosomes in a similar manner than the wild-type strain of LGP32, suggesting that Vsm is not involved in LGP32 resistance to intracellular degradation (Fig. 5A and B).

To investigate further the role of Vsm in LGP32 resistance against grazing by *Vannella* sp. AP1411, amoeba grazing was recorded by time-lapse microscopy. Amoebae grazing behaviour on vibrio lawns was analysed using Δ*vsm* LGP32 and Δ*copA* LGP32 lawns and compared with wild-type strain. Cell tracking was performed to measure amoeba migratory speed on the different lawns of vibrios (Fig. 6) and the most striking difference that could be observed was that amoebae migratory speed was two fold faster ($p < 0.001$) on lawns of Δ*vsm* LGP32 compared with wild-type or Δ*copA* LGP32 lawns (Supplementary Movies 1, 2 and 3), with mean velocities of 8.5, 3.9 and 3.8 μm min^{-1} for Δ*vsm* LGP32, wild-type LGP32 and Δ*copA* LGP32 respectively (Fig. 6D). These results indicate that the metalloprotease Vsm acts extracellularly by inhibiting amoeba motility, which likely disturbs grazing efficiency of amoeba, whereas CopA participate to the intracellular survival capacity of LGP32.

Discussion

In this study, we uncovered that the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 is resistant to grazing and intracellular degradation by free-living marine amoebae of the *Vannella* genus. Here we used *Vannella* sp. AP1411 as a representative amoeba isolate, which belongs to the genus of amoeba that is ubiquitous in the oyster farming environment and that interacts with vibrios in the environment. We also uncovered some of the molecular determinant that are involved in the resistance of LGP32 to *Vannella* sp. AP1411, the copper efflux p-ATPase CopA and the secreted metalloprotease Vsm. These results indicate that at least two different mechanisms contributing to *V. tasmaniensis* LGP32 pathogenicity in oysters are also involved in resistance to amoeba grazing.

Amoebae of the *Vannellidae* family were found to be ubiquitous in the Thau lagoon, a Mediterranean coastal lagoon used for oyster farming (20% of its total surface). Indeed, most of the isolated amoebae branched into the *Vannella* genus, independently of seasons. Together with the present study, the current literature suggests that *Vannellidae* amoebae are frequent in aqueous environments, mostly in saltwater but are also frequently observed in freshwater (Smirnov *et al*., 2007). By performing 16s barcoding sequencing and FISH analysis, we were able to find that some *Vannella* sp. isolated from oyster farms were associated with *vibrionaceae* and that this association can last for weeks *in vitro*; suggesting that these amoebae can interact with vibrios in this environment. Although the ecological dynamics of these *Vannella-Vibrionaceae* associations deserves to be investigated in greater details, our data suggest that the *Vannella* sp. isolated in the present study are an ecologically relevant host to investigate the biotic interactions between *Vibrio* species and marine amoebae.

By studying the interactions between *Vannella* sp. AP1411 and the vibrio LGP32, we found that *V. tasmaniensis* LGP32 is able to resist predation by the marine amoeba. Vibrios belonging to the *tasmaniensis* species have been shown to resist haemocyte phagocytosis and to behave as facultative intracellular pathogen, a behaviour that was shown to be central for its virulence in oysters (Duperthuy *et al*., 2011; Vanhove *et al*., 2016; Rubio *et al*., 2019). The slow growth of amoebae on LGP32 was due, to some extent, to an inefficient intracellular killing of LGP32. Indeed, after phagocytosis most intracellular LGP32 were isolated in individual phagosomes inside the amoebae without any morphological alteration whereas the non-virulent control *V. tasmaniensis* $LMG20012^T$ was progressively clustered in vacuoles and degraded. This strongly suggests that LGP32 interferes with phagosome maturation and intracellular trafficking and this is reminiscent of its capacity to inhibit phagosome acidification in oyster phagocytes (Duperthuy *et al*., 2011).

The copper efflux p-ATPase CopA was found here to play a major role in the capacity of LGP32 to resist intracellular degradation within the amoeba. As CopA is involved in the resistance of LGP32 to high concentration of copper within oyster haemocytes (Vanhove *et al*., 2016), our results indicate that LGP32 resistance to grazing by the amoeba depends on its capacity to tolerate high concentrations of copper inside phagosomes and thus strongly suggest that *Vannella* sp. AP1411 use intraphagosomal heavy metal poisoning in a similar manner than other professional phagocytes. Intraphagosomal copper accumulation appears to be an ancestral highly conserved antimicrobial mechanism from FLA, social amoebae (Hao *et al*., 2016), invertebrates (Vanhove *et al*., 2016) to vertebrate professional phagocytes (Soldati and Neyrolles, 2012). As this antimicrobial mechanism is used by a variety of phagocytes we can hypothesize that, like other bacterial species resisting intracellular killing (Espariz *et al*., 2007; Rowland and Niederweis, 2012), for some vibrios, copper resistance confers them a fitness advantage in diverse host–vibrio interactions (Brooks *et al*., 2014; Vanhove *et al*., 2016).

Another determinant that was found here to be important for LGP32 resistance to grazing by *Vannella* sp. AP1411 was the secreted metalloprotease Vsm, a major secreted protease that plays a role as a virulence factor in oysters (Binesse *et al*., 2008). In the present study, the Vsm deficient LGP32 strain showed an increased sensitivity to grazing by the amoeba, without

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

losing its ability to resist intracellular degradation. This suggested that Vsm acts extracellularly rather than intracellularly, during LGP32 interaction with amoeba, which was confirmed by studying amoeba grazing behaviour by time-lapse microscopy revealing an important increase of grazing migratory speed of amoebae on Δ*vsm* LGP32 bacteria lawns compared with lawns with the wild-type strain. The involvement of Vsm metalloprotease in LGP32 resistance to grazing is reminiscent of the role played by other proteases secreted by vibrios during their interaction with eukaryotic cells. In particular, the involvement of the secreted protease PrtV, that participates in the resistance of *V. cholerae* to the grazing by the bacteriovorous ciliate *Tetrahymena pyriformis* (Vaitkevicius *et al*., 2006), the metalloprotease Vsm can also damage oyster heamocytes (Binesse *et al*., 2008), and its homologue Vam, from *V. aestuarianus*, can inhibit oyster haemocyte phagocytosis (Labreuche *et al*., 2010). Interestingly, recent work studying the interaction between clinical isolates of *V. cholerae* and the model amoebae *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain) reported that minor virulence factors like secreted enzymes, including the HapA metalloprotease and the haemolysin, can be involved in fine tuning the fitness of *V. cholerae* during its interaction with grazers in the aquatic environment (Van der Henst *et al*., 2018). Then the secretion of proteases by vibrios appears to be an important ancestral mechanism that may has been acquired to inhibit predation by grazers in aquatic environments but can also participate to their pathogenicity in animal hosts.

Hence, as copper resistance and secretion of proteases appear to be important virulence mechanisms for different vibrios and involved in interactions with diverse hosts, the presence of these virulence traits in vibrios against diverse hosts may represent evidences for the coincidental selection hypothesis (Adiba *et al*., 2010).

As bacteriovorous protists exert a selective pressure on bacterial communities, different bacteria species are thought to have developed a diversity of survival strategies against predation through either pre-ingestional or post-ingestional adaptations (Matz and Kjelleberg, 2005). Pre-ingestional adaptations including high motility, filamentation, surface masking or toxin release are commonly found for extracellular pathogens; whereas post-ingestional adaptations including digestional resistance through vacuolar trafficking inhibition or vacuolar escaping, and toxin release are commonly found for intracellular pathogens and tend to favour bacterial growth (Matz and Kjelleberg, 2005). By establishing a new ecologically relevant cellular model to study the Vibrio–phagocytes interactions in marine environment, we found that, in the case of the facultative intracellular pathogen LGP32, a combination of pre-ingestional and post-ingestional adaptations could be involved. The involvement of the secreted Vsm represents a pre-ingestional adaptation, whereas the involvement of the CopA p-ATPase represents a post-ingestional adaptation. Thus, the predator–prey interactions between bacterial communities and bacterivorous protists may select for common virulence factors allowing bacteria to resist to a diversity of phagocytic cells from amoeba to immune cells in animals, favouring the emergence of opportunistic pathogens able to colonize a diversity of hosts, like many vibrios do.

However, not all virulence factors studied here were found to participate to LGP32 resistance to grazing by *Vannella* sp. AP1411. For instance, *V. tasmaniensis* T6SS1, Vsp, CusAB and SOD, which were found to play a role in oysters (Vanhove *et al*., 2014, 2016; Rubio *et al*., 2019), do not seem to play a role during interactions with *Vannella* sp. AP1411. These results strengthen the hypothesis that although some virulence factors could be involved in diverse biotic interactions, as observed here for CopA and Vsm, hence favouring opportunism, some other virulence factors could be more specifically involved in more specialized interactions. As for example, the metalloprotease InhA, the orthologue of PrtV in LGP32, does not appear to play a role during LGP32–Oyster interactions or LGP32–*Vannella* sp. AP1411 interaction, although it was shown to participate in the resistance of *V. cholerae* to the grazing by the bacteriovorous ciliate *Tetrahymena pyriformis* (Vaitkevicius *et al*., 2006). In a similar manner, T6SS, which was shown to be involved during interaction of *Vibrio cholerae* with the social amoeba *D. discoideum* (Pukatzki *et al*., 2006), did not appear to be involved in LGP32 resistance to *Vannella* sp. AP1411 although it was shown recently to be a major determinant of LGP32 cytotoxic activity towards oyster haemocytes (Rubio *et al*., 2019). Such host-specialization of some vibrios virulence factors was also suggested recently for *V. cholerae*, as some of the virulence factors involved in the resistance to grazing by *A. castellanii* are considered to have a minor role in pathogenesis in human (Van der Henst *et al*., 2018). These subtleties in the involvement of different virulence factors during different biotic interactions are reminiscent of the subtleties that are being uncovered for the intracellular pathogen *L. pneumophila*. This well studied intracellular pathogen harbours a broad range of virulence factors and can interact with a diversity of hosts, but this does not imply that all virulence factors have a similar importance in each interactions with these diverse hosts (Boamah *et al*., 2017; Ghosh and O'Connor, 2017). Vibrios being mostly opportunistic pathogens, they probably have acquired, on the one hand, some virulence factors that are involved in diverse host interactions and could represent core virulence factors, and on the other hand, some virulence factors that are involved in more restricted host interactions that could represent specialized virulence factors. Studying diverse host–vibrios interactions will help to decipher the diversity of their virulence factors and provide insights about opportunist pathogens co-evolutionary trajectories that are

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

more complex than the host–parasite co-evolutionary arm race observed for host specialized pathogens (Brown *et al*., 2012).

In conclusion, by developing a new ecologically relevant cellular model of interaction, we showed here that the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 can resist phagocytosis by environmental grazers *Vannella* spp., which are ubiquitous in oyster farming area and appear to interact with vibrios in the oyster farming environment. By performing comparative cellular biology, we also demonstrated that some of LGP32 virulence factors can be involved in different types of interactions with multiple hosts from protozoans, such as environmental marine amoeba, to metazoans, for example, oysters. This suggests that some virulence factors such as CopA and Vsm could play a central role in the interaction of *V. tasmaniensis* with diverse hosts whereas some other virulence factors appear to be involved in more specific host–vibrio interactions. Hence, the present study implies that studying diverse host–vibrio interactions will help to gain further insights about the ecology of vibrios and to uncover the relative roles of biotic interactions in pathogen emergence.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli strain SBS363 was grown in Luria–Bertani (LB) or LB-agar (LBA) at 37°C. Marine amoebae *Vannella* sp. AP1411 and isolates 0517-TOEc-2, 0517-TOEc-3, 0517-TOEc-4, 0517-BWEc-1, 0517-BWEc-2, 0517-BWEc-3, 0517-BWEc-4 (isolated in this study) were grown in 70% sterile seawater (SSW) with *E. coli* wild-type strain SBS363 at 18°C, for 3 days prior experiments. Vibrios strains used in this study are *V. tasmaniensis* LMG20012^T, *V. tasmaniensis* LGP32 and previously described LGP32 deletion mutants Δ*copA*, Δ*cusAB*; Δ*sodA*; Δ*vsm*, Δ*vsp*, Δ*inhA* (Binesse *et al*., 2008; Vanhove *et al*., 2014, 2016) and insertion mutants Δ*vipA1*, Δ*vipA2* (Rubio *et al*., 2019). Vibrios strains carrying the pMRB-GFP or pD3-GFP-mut3 plasmids were grown in LB + NaCl 0.5 M supplemented with chloramphenicol (10 μg mL^{-1}) or kanamycin (20 μg mL^{-1}) at 20°C, for 24 h prior experiments.

Isolation of environmental amoebae from the Thau Lagoon and Banyuls-sur-mer

Between 2014 and 2015, seawater, oysters and sediment from the Thau lagoon (South France) were sampled at least two times per season. Seawater was collected next to oyster tables at the Bouzigues station Ifremer-REPHY (GPS: N 43°26.058′ E 03°39′0.878′) and filtered, on the boat, with a 180 μm pore size nylon filter. In the lab, the water was re-filtered using an 8.0 μm pore size MF-Millipore membrane. The 8.0 μm pore size membrane was then cut in four pieces and each quarter was put upside down on a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on SSW-agar. Oyster gills were cut in four pieces of roughly 0.5 cm^2 and each quarter was put upside down on a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on non-nutrient SSW-agar. Sediment was collected under the oyster tables (depth of 9 m) by core sampling. One gram of sediment was then deposited in the centre of a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on SSW-agar, in triplicate. After 1–3 weeks, depending of the sampling season, migrating amoebae were observed at the periphery of the plates. An agar square of 0.5 × 0.5 cm containing a single amoeba was then cut and deposited upside down on a fresh lawn of *E. coli* SBS363 seeded on SSW-agar. This was repeated several times to isolate and replicate amoebae. DNA was extracted using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), according to the manufacturers' protocol. In May 2017, sampling was performed from oyster gills from Thau lagoon at Bouzigues station Ifremer-REPHY (GPS: N 43°26.058′ E 03°39′0.878′) and seawater from Banyuls-sur-mer at SOLA station (GPS: 42°29′300 N – 03°08′700 E). Samples were treated with the same protocol than previously and put on a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on SSW-agar. After 2 weeks, amoebae were flushed by SSW and clonally isolated by dilutions within 96 well plates with statistically less than one amoeba per well. Amoebae clones were amplified by culturing in six well plates, and DNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's protocol.

Identification of isolated marine amoebae from Thau Lagoon and Banyuls-sur-Mer and their associated bacteria

In order to infer the phylogenetic assignment of environmental amoebae, the v7 region of the 18s rDNA gene was sequenced using specific primers. The primers were designed using SILVA database dedicated tool (http://www.arb-silva.de/search/testprime). The selected primers, Amo_AP_1154_F: 5′GAGRAAATTAGAGTGTTYAAAG 3′ and Amo_AP_1470_R: 5′TTATRGTTAAGACTA CGACGG 3′, were used to amplify the hypervariable region V7 of 18S rDNA gene at an annealing temperature of 54°C. PCR amplicons were cloned using the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen), according to the manufacturers' protocol. Nucleotide sequences were determined by Sanger sequencing (GenSeq platform, Labex CEMEB, Montpellier, France). Sequence homologies were searched using BLASTn available at the NCBI website (National Centre for Biotechnology Information) (Wheeler *et al*., 2007) (Table S1). For phylogenetic analyses, sequences were aligned in MOTHUR

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

(Schloss, 2009) and imported into ARB software (Ludwig *et al*., 2004) 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. In order to verify that the Sanger sequencing strategy used here allowed us to identify the entire diversity of amoebae that could be isolated through culturing technics. The total DNA from our different amoebae cultures was analysed by performing barcoding on the v7 region of the 18S rDNA gene using generic primers that allowed amplifying more than 80% of all the eukaryote 18s rDNA sequences available in SILVA database (F-v7-1173: CCT GCG GCT TAA TTT GAC and R-v7-1438: CAT CAC AGA CCT GTT ATT GC). Sequencing was performed by Genome Quebec facility, Montreal, Canada.

Bacteria associated with amoeba clonally isolated in May 2017 sampling were investigated using barcoding sequencing on the V3/V4 region of the 16S rDNA gene with Illumina generic primers according to the manufacturer's protocol (16Sv3v4-ILLAFWD: 5′-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG YRC CTA CGG GNG GCW GCAG and 16Sv3v4-ILLAREV: 5′-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GYR GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC). Sequencing was performed by GenSeq platform, Labex CEMEB, Montpellier, France. OTUs taxonomic affiliation was performed using FROGS tool from galaxy software (Escudié *et al*., 2018). To determine the taxonomic affiliation of clones isolated during the second sampling campaign, the sequence of the V4 hypervariable region of the 18S rDNA gene was analysed using TAReuk454FWD1: 5′-CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGG-TAATTCC-3′ and TAReukREV3: 5′-ACTTTCGTTCTTGAT (C/T)(A/G)A-3′ primers (Stoeck *et al*., 2010). Nucleotide sequences were determined by Sanger sequencing (GenSeq platform, Labex CEMEB, Montpellier, France) and aligned with MUSCLE using MEGA7 software (maximum-likelihood by bootstrap method, 1000 replications).

Grazing assay

To prepare the co-culture of vibrios and amoebae, 1 ml of vibrio overnight culture (3.10^9 bacteria. mL^{-1}) was mixed with 100 μl of 3 days old *Vannella* sp. AP1411 culture (5×10^5 cells mL^{-1}) or with 100 μl of 70% SSW for control condition. A volume of 50 μl per well of the mixed culture was seeded on top of 500 μl of 1% SSW-agar, in 24-well plates with transparent flat bottoms. Amoebae and bacteria lawns were carefully homogenized in the wells and let dry 4 h at room temperature in a laminar flow cabinet and then incubated at 18 °C in a humidified atmosphere. GFP fluorescence intensity was measured every day over 7 days using a TECAN plate reader (λex 480 nm/λem 520 nm). To estimate the effect of the amoebae grazing activity on the abundance of living vibrios expressing GFP, the fluorescence intensity of the wells containing amoebae was compared with the fluorescence of vibrios lawn without amoebae, and expressed as a ratio. Each condition was performed in technical triplicates and the results shown are the average of three independent experiments. Error bars represent the standard error of the mean (±SEM). Statistical analysis was performed using RM-ANOVA over the independent experiments.

Monitoring amoeba growth and association with GFP-vibrios

To estimate the proliferation of *Vannella* sp. AP1411 at days 1, 3 and 6 in grazing assays, amoebae were directly imaged by phase-contrast microscopy and enumerated in triplicate for each condition. Cells were flushed from the SSW-agar surface with 1 ml of 70% SSW and fixed for 30 min with 2% paraformaldehyde at room temperature. Pellets were washed and suspended in 500 μl of PBS for flow cytometry analysis (BD FACS Canto). Data analyses were performed using Flowing Software by gating on amoeba cells using SSC/FSC parameters then quantifying the percentage of GFP fluorescence associated amoebae (as shown in Fig. S2). In order to estimate the phagocytosis index, which corresponds to the average number of phagocytosed bacteria per cell, the mean intensity of GFP fluorescence per amoeba was normalized to the mean GFP fluorescence per bacteria (as shown in Fig. S3). The experiments were performed with three technical replicates per condition in each experiment, and depicted results are representative of at least two independent experiments. Error bars represent the ±SEM. Statistical analysis was performed using two ways ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparisons test.

Fluorescence in situ *hybridization*

In situ hybridization for *Vibrionaceae* was performed on *Vannella* sp. AP141, 0517-TOEc-2, 0517-TOEc-3 and 0517-TOEc-4. After at least 2 weeks of culturing in flask in 70% SSW complemented with *E. coli* SBS363, amoebae were washed twice with 3 ml of 70% SSW and resuspended in 70% SSW using a cell scrapper and fixed with 2% formaldehyde for 25 min at room temperature. After fixation, formaldehyde was removed by centrifugation of the cells by centrifugation 10 min at 6000*g*, pellets were washed and resuspended in 500 μl of PBS. Cell suspensions were cytospun on glass slides for 10 min at 500 g. Glass slides were then labelled with the

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Vibrionaceae specific probe VIB572a at 10 ng mL^{-1} (5′-ACCACCTGCATGCGCTTT-3′) (Huggett *et al*., 2008) using hybridization buffer (900 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, 30% Formamide, 0.01% SDS, dH_2O) for 90 min at 46°C in the dark. The samples were then washed for 25 min in washing buffer (0.112 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl, 0.01% SDS, 5 mM EDTA, dH2O) at 48°C in the dark. Then, cells were counterstained using FITC at 0.5 ng mL^{-1} for 30 min (Sigma). Confocal fluorescence imaging was performed using a 63× oil objective and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope, at 1 airy to ensure the focal plan.

Microscopy

The different amoebae shapes were observed on living amoebae using phase contrast (on an inverted wide-field microscope, Zeiss). The shape of the floating forms was recorded by scraping in the cell suspension followed by immediate observation. The cystic form was observed after amoebae were starved for a week. Intracellular organization of amoebae was observed using transmission electron microscopy. Briefly, amoebae cultured in flasks were washed twice using 70% SSW, and fixed in 2.5% glutaraldehyde for 2 h in the dark at room temperature, followed by overnight at 4°C. After centrifugation, the supernatant was replaced by 3% low melting-point agarose (Sigma) and the pellet was resuspended. Cells entrapped in 3% agar were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (1×, pH 7.4) overnight at 4°C. Then they were rinsed in PHEM buffer and post-fixed in a 0.5% osmic acid for 2 h in the dark at room temperature. After two rinses, samples were dehydrated in a graded series of ethanol solutions (30%–100%). Samples were embedded in EmBed 812 using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy, Leica EM AMW. Ultrathin sections (70 nm; Leica-Reichert Ultracut E) were collected at different levels of each block, then counterstained with uranyl acetate 1.5% in 70% ethanol and lead citrate and observed using a Tecnai F20 transmission electron microscope at 120 kV in the CoMET MRI facilities, INM, Montpellier, France.

Confocal fluorescence microscopy was performed on amoebae suspensions after PFA fixation to observe the localization of intra-amoeba vibrios. Cell suspensions were cytospun on glass slides for 10 min at 800 g. Glass slides were then stained with 0.25 μg mL^{-1} DAPI (Sigma) and 0.1 μg mL^{-1} Blue Evans (Sigma). Confocal fluorescence imaging was performed using a 63× oil objective and images were captured using a Leica TCS SPE confocal scanning laser microscope, at 1 airy to ensure the focal plan.

Time-lapse imaging and cell tracking

Co-cultures of vibrio and amoebae were prepared following the same protocol as for grazing assays. Time-lapse imaging started 24 h after the beginning of the grazing assays. Acquisitions were obtained using an inverted wide-field epifluorescence microscope (Zeiss) and B&W coolsnap camera. Time-lapses were done during 30 min with one frame every 30 s. TrackMate Tools software (ImageJ) was used for manual tracking to determine velocity and migration distance by amoebae on different vibrios lawns (Supplementary Movies 1, 2 and 3). Migration distances were measured for 18 amoebae at the same time (i.e. 20 frames per amoebae trace) for each condition. Each track depicted corresponds to the migration of an amoeba during 10 min. The migration path was determined by the *x* and *y* positions of amoebae tracked at each frame. Depicted results are representative of at least two independent experiments. Velocities were measured for 16 amoebae tracks, only tracks made of at least five frames were considered. Each presented result corresponds to the average velocity of one amoeba per track. Depicted results are representative of at least two independent experiments. Error bars represent the standard deviation (±SD). Statistical analysis was performed using Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons test.

Acknowledgements

We are grateful to Thibaut Goult, Audrey Caro, and Marc Leroy for precious help in sample collection and preparation, to Eric Abadie for field trip coordination and to Michel Cantou from the University of Montpellier for scuba diving allowing sediment collection. We thank Marie Buysse and Olivier Duron for technical advices. This work, through the use of the GENSEQ platform (http://www.labex-cemeb.org/fr/genomique-environnementale-2) from the labEx CeMEB. The authors also thank the Montpellier RIO imaging platform (https://www.mri.cnrs.fr). The present study was supported by the EU funded project VIVALDI (H2020 program, No. 678589), by the Ec2co-CNRS funded Intervibrio and VibrAm projects, by Labex CEMEB Amibadapt project, and by Ifremer, University of Montpellier and University of Perpignan via Domitia.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interests related to this work.

References

Adiba, S., Nizak, C., van Baalen, M., Denamur, E., and Depaulis, F. (2010) From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* **5**: 1–10.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Austin, B. (2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* **140**: 310–317.

Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., *et al*. (2008) Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of Vibrio splendidus. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7108–7117.

Boamah, D.K., Zhou, G., Ensminger, A.W., and O'Connor, T.J. (2017) From many hosts, one accidental pathogen: the diverse protozoan hosts of legionella. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 477.

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., 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 U S A* **111**: 17284–17289.

Brown, S.P., Cornforth, D.M., and Mideo, N. (2012) Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol* **20**: 336–342.

Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivesse, S., Alunno-Bruscia, M., *et al*. (2017) Vibrio crassostreae, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* **11**: 1043–1052.

Constantin de Magny, G., Murtugudde, R., Sapiano, M.R.P., Nizam, A., Brown, C.W., Busalacchi, A.J., *et al*. (2008) Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 17676–17681.

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., *et al*. (2018) Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* **9**: 4215.

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.

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

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., *et al*. (2018) FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–1294.

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

Gay, M., Renault, T., Pons, A., 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.

Ghosh, S., and O'Connor, T.J. (2017) Beyond paralogs: the multiple layers of redundancy in bacterial pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–14.

Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413–433.

Hao, X., Luthje, F., Rønn, R., German, N.A., Li, X., *et al*. (2016) A role for copper in protozoan grazing - two billion years selecting for bacterial copper resistance. *Mol Microbiol* **102**: 628–641.

Huggett, M., Crocetti, G., Kjelleberg, S., and Steinberg, P. (2008) Recruitment of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field. *Aquat Microb Ecol* **53**: 161–171.

Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., *et al*. (2010) Vibrio aestuarianus zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster Crassostrea gigas and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* **29**: 753–758.

Le Roux, F., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., *et al*. (2015) The emergence of Vibrio pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front Microbiol* **6**: 830.

Lemire, A., Goudenège, 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.

Lopez-Joven, C., Rolland, J.L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., *et al*. (2018) Oyster farming, temperature, and plankton influence the dynamics of pathogenic Vibrios in the Thau Lagoon. *Front Microbiol* **9**: 2530.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, *et al*. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.

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.

Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302–307.

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.

Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 537–546.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., *et al*. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528–1533.

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.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soilamoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.

Rowland, J.L., and Niederweis, M. (2012) Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis* **92**: 202–210.

Rubio, T.P., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., *et al*. (2019) Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

successful outcome of Vibrio infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 14238–14247.
Schloss, P.D. (2009) A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS One* **4**: e8230.
Smirnov, A.V., Nassonova, E.S., Chao, E., and Cavalier-Smith, T. (2007) Phylogeny, evolution, and taxonomy of Vannellid amoebae. *Protist* **158**: 295–324.
Soldati, T., and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* **13**: 1042–1052.
Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M.D.M., Breiner, H.W., and Richards, T.A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Mol Ecol* **19**: 21–31.
Takemura, A.F., Chien, D.M., and Polz, M.F. (2014) Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol* **5**: 38.
Vaitkevicius, K., Lindmark, B., Ou, G., Song, T., Toma, C., Iwanaga, M., *et al*. (2006) A Vibrio cholerae protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9280–9285.
Van der Henst, C., Vanhove, A.S., Drebes Dörr, N.C., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Clerc, S., *et al*. (2018) Molecular insights into Vibrio cholerae's intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun* **9**: 3460.
Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charrière, G.M., Le Roux, F., Goudenège, D., Gourbal, B., *et al*. (2014) Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of Vibrio tasmaniensis virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* **17**: 1152–1165.
Vanhove, A.S., Rubio, T.P., Nguyen, A.N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., *et al*. (2016) Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ Microbiol* **18**: 875–888.
Vidal-Dupiol, J., Ladriere, 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.
Wheeler, D.L., Barrett, T., Benson, D.A., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., *et al*. (2007) Database resources of the National Center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res* **36**: D13–D21.

Supporting Information

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

Fig. S1. Phylogeny of the diversity of amoebae OTUs found by barcoding of the v7 region of the 18 s rDNA gene. Phylogenetic 18S rRNA-based trees of the Amoebozoa constructed with ARB software (http://www.arb-home.de (Ludwig *et al*., 2004)) 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. All 18S rDNA gene sequences assigned to amoeba belonged to the *Vannellidae* family (written in red).

Fig. S2. *Vannella* sp. AP1411 isolated from Thau lagoon, France.

(A) Different forms of *Vannella* sp. AP1411 under phase light microscopy. Trophozoite (left), pelagic (centre) and cystic form (right). Scale bar: 10 μm. **(B)** Transmission electron microscopy of trophozoite shape of the amoeba *Vannella* sp. AP1411. Whole cell overview showing nuclei (N) and several digestive vacuoles (DV) with or without *E. coli* SBS363 bacteria inside (B). Scale bar: 2 μm.

Fig. S3. Quantification of *Vannella* sp. AP1411 phagocytosis by cytometry. (A) FSC/SSC Gate corresponding to amoebae **(B)** Determination of fluorescence background on amoebae alone. **(C)** Gate determination for GFP+ vibrios (Bacteria). **(D)** Measurement of the percentage of amoebae carrying GFP fluorescence after 3 days of co-culture with GFP-expressing vibrios.

Fig. S4 CusAB, SodA, Vsp, InhA, VipA1 and VipA2 are not involved in LGP32 resistance to grazing by *Vannella* sp. 1411.

Bacterial resistance to grazing by *Vannella* sp. AP1411 of *ΔcusAB*, *ΔsodA*, *Δvsp*, *ΔinhA*, *ΔvipA1* and *ΔvipA2* mutant strains of LGP32 was assessed by measuring the fluorescence of the GFP-expressing bacteria, after contact with amoebae. Each condition was performed in triplicate and the results shown are the average of three independent experiments. Values are presented ± SEM.

Fig. S5. Vsm or CopA do not affect the phagocytosis rate of LGP32 by the amoeba *Vannella* sp. AP1411. Grazing amoebae on GFP-vibrio LGP32wt, LGP32 Δ*copA* or of LGP32 Δ*vsm* were monitored by flow cytometry to estimate phagocytosis index per amoeba, which correspond to the average number of phagocyted bacteria per cell. The results shown are representative of two independent experiments. Data were analysed by one-way ANOVA with Friedman test.

Table S1. Sanger sequences of sampled marine amoebae

Supplementary Movie 1. Time-lapse microscopy movie of *Vannella* sp. AP1411 and LGP32wt lawn in co-culture.

Supplementary Movie 2. Time-lapse microscopy of *Vannella* sp. AP1411 and LGP32 Δ*copA* lawn in co-culture.

Supplementary Movie 3. Time-lapse microscopy of *Vannella* sp. AP1411 and LGP32 Δ*vsm* lawn in co-culture.

© 2019 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd., *Environmental Microbiology*

Figure S1

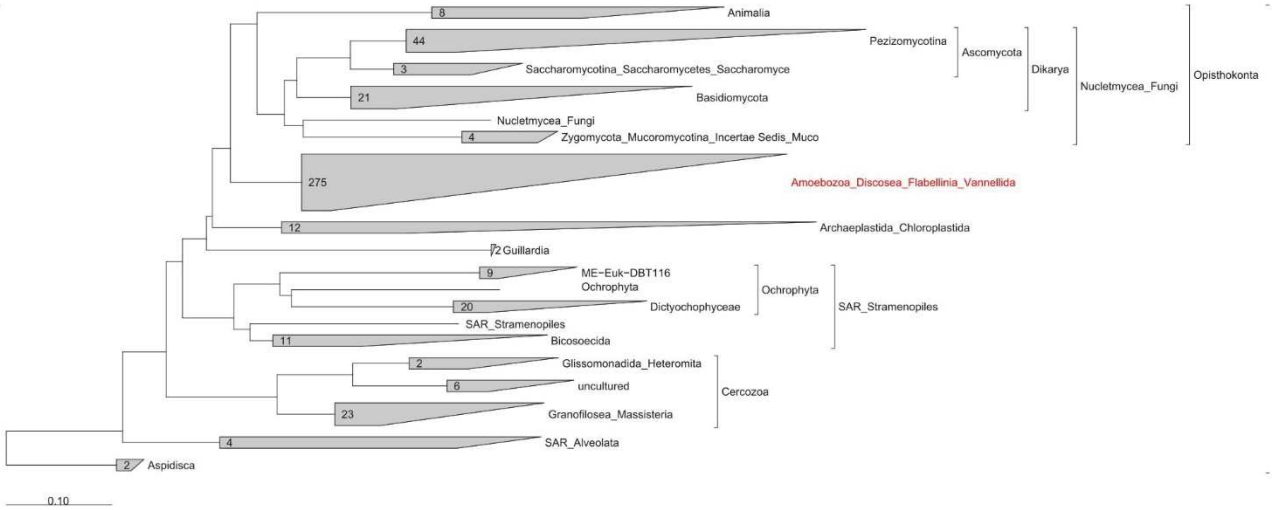

8
Animalia
44
Pezizomycotina
Ascomycota
3
Saccharomycotina_Saccharomycetes_Saccharomyce
Dikarya
21
Basidiomycota
Nucletmycea_Fungi
Nucletmycea_Fungi
4
Zygomycota_Mucoromycotina_Incertae Sedis_Muco
Opisthokonta
275
Amoebozoa_Discosea_Flabellinia_Vannellida
12
Archaeplastida_Chloroplastida
2
Guillardia
9
ME-Euk-DBT116
Ochrophyta
Ochrophyta
20
Dictyochophyceae
SAR_Stramenopiles
SAR_Stramenopiles
11
Bicosoecida
2
Glissomonadida_Heteromita
6
uncultured
Cercozoa
23
Granofilosea_Massisteria
4
SAR_Alveolata
2
Aspidisca
0.10

Figure S2

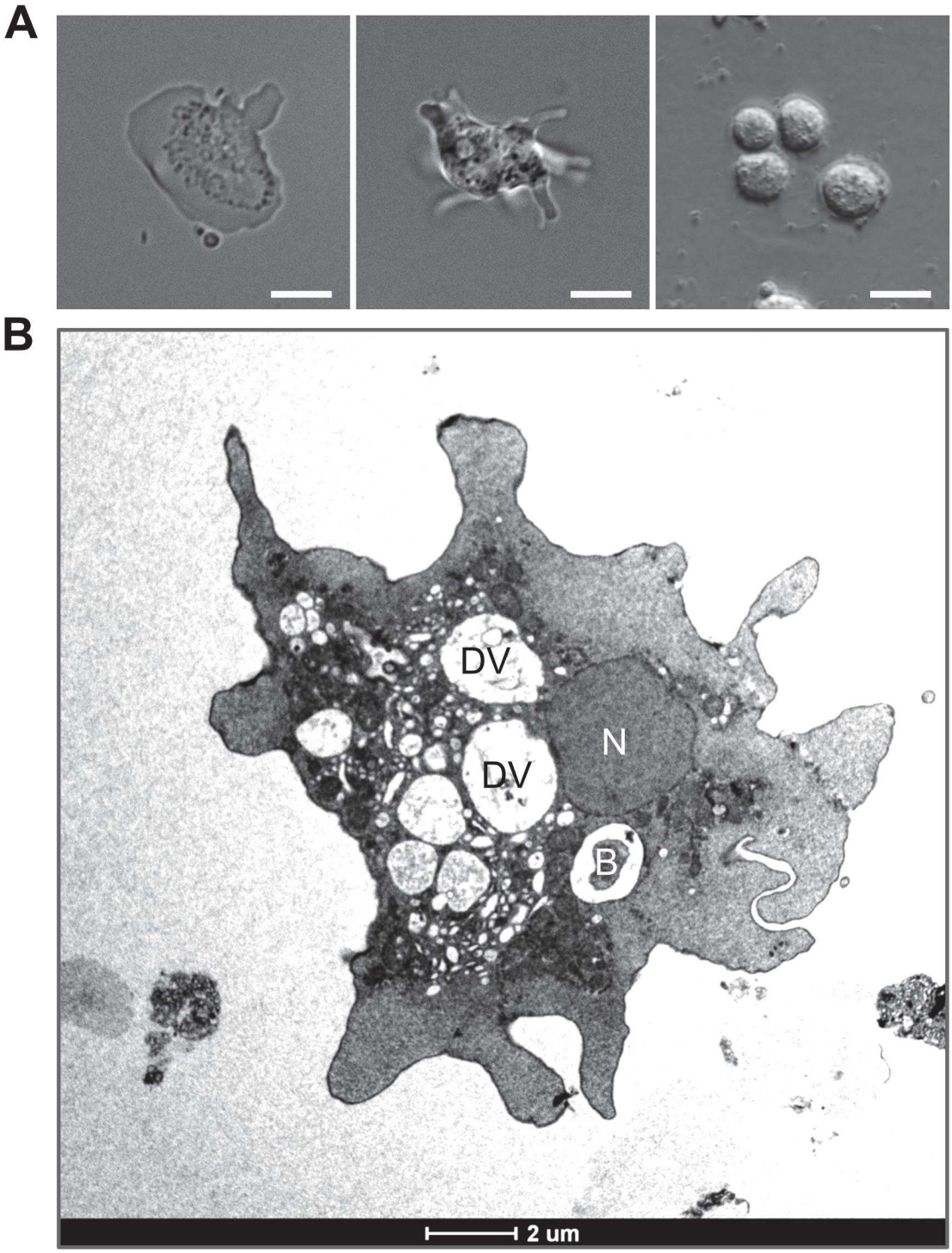


Figure S3

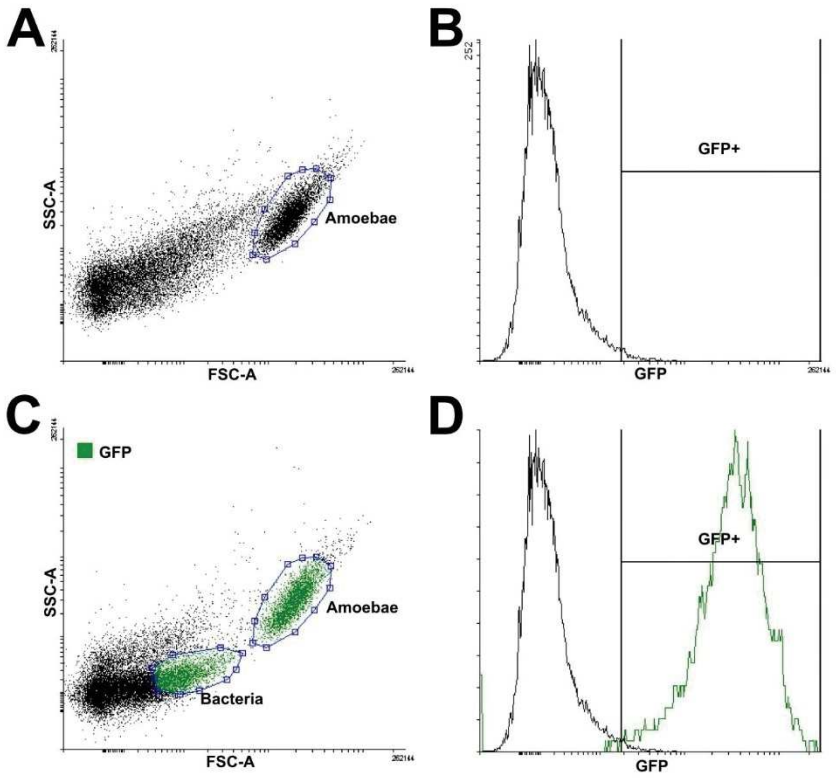

A
SSC-A
FSC-A
Amoebae
B
GFP+
GFP
C
GFP
SSC-A
FSC-A
Amoebae
Bacteria
D
GFP+
GFP

Figure S4

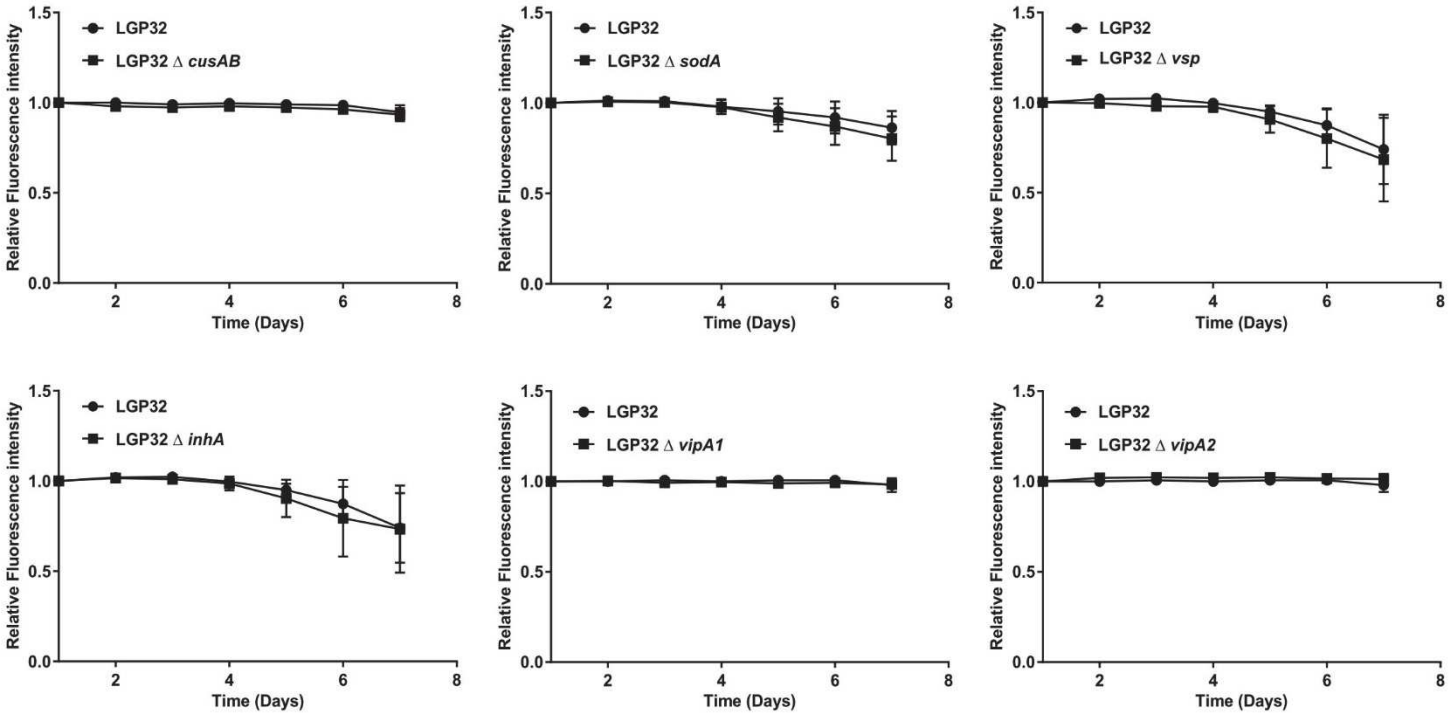

LGP32
LGP32 Δ cusAB
LGP32 Δ sodA
LGP32 Δ vsp
LGP32 Δ inhA
LGP32 Δ vipA1
LGP32 Δ vipA2
Relative Fluorescence intensity
Time (Days)
0.0
0.5
1.0
1.5
2
4
6
8

Figure S5

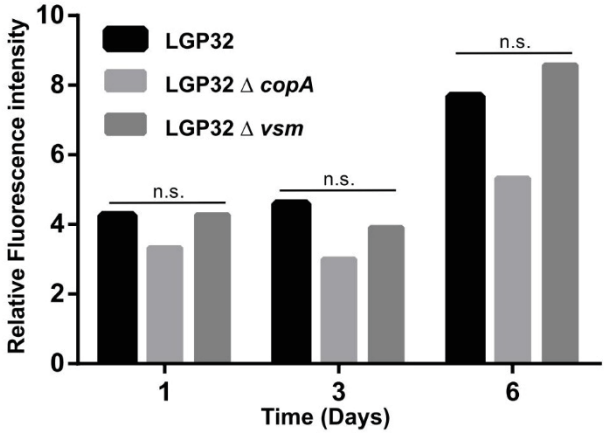

Relative Fluorescence intensity
10
8
6
4
2
0
LGP32
LGP32 Δ copA
LGP32 Δ vsm
n.s.
n.s.
n.s.
1
3
6
Time (Days)

Table S1 Sanger sequences of sampled marine amoebae

OTUs identifications and their sampling conditions	**Number of similar sequences** and their sampling conditions	**Sequences**
Vannella sp. Water-Spring Oyster Gills-Summer Water-Summer	**14** 12 from Water-Summer 1 from Oyster Gills-Summer 1 from Water-Spring	>13.6-1_Vannella sp. CTTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTAA ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >13.6-2_Vannella sp. ATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATT TAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAA ATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAT TAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAC YATAAA >13.6-3_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTAA ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAATCTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYATA AA >13.6-4_Vannella sp. CTTAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTAA ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGGTCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >13.6-5_Vannella sp. ATCTTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTT AAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAA TGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACC ATAAA >13.6-6_Vannella sp. ATACTTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATT TAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAA ATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAT TAATCGAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAC YATAAA >13.6-7_Vannella sp. ATACTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAAT TTAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA CCATAA >13.6-8_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTTA

		ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >13.6-9_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTAA ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AA >13.6-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTTAAA TAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATGC ATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYATA AA >13.6-11_Vannella sp. ATACTTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATT TAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAA ATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAT TAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAAC YATAAA >13.6-12_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATAATTYRA ATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >B14.8-6_Vannella sp. CTGATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAATA ATTTAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTG AAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTC ATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTA ACCATAAA >14.4-15_Vannella sp. CATTATGGGACTGATCTTAGCATGGGATATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTG GTTTGAATAATTTAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGG TTAGCGGTGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAA GGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGT CGTAGTCTTAACCATAAA
Vannella sp. Oyster Gills-Summer Water-Spring Water-Summer Sediment-Winter	**27** 7 from Oyster Gills-Summer 9 from Water-Spring 6 from Water-Summer 5 from Sediment-Winter	>B14.8-1_Vannella sp. CTGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTT AACCATAAA >B14.8-4_Vannella sp. CTCATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT AACCATAAA

		>B14.8-7_Vannella sp. TCATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATG ATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGT GAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTT AACCATAAA >B14.8-8_Vannella sp. ACGATTTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT AACCATAAA >B14.8-10_Vannella sp. ATTAGCATGGGATAATAAATAGGATTCATATCATATATTTGTTGGTTTGAATGATGTA AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAAT GCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATYAGATACCGTCGTAGTCTTAACCA TAAA >B14.8-13_Vannella sp. GATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATG ATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGT GAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT AACYATAAA >B14.8-15_Vannella sp. ATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGAT GTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTTTAA CCATAAA >14.4-2_Vannella sp. GATGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGA ATGATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGC GGTGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATG TTTTCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGT CTTTAACCATAAA >14.4-6_Vannella sp. CATATAGGTCTGATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTG GTTTGAATAATTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGG TTAGCGGTGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAA GGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGT CGTAGTCTTAACCATAAA >14.4-7_Vannella sp. TCTGATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAATTATATATTTGTTGGTTTGAAT AATTTAAATAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGT GAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTT AACCATAAA >14.4-8_Vannella sp. TCATTATTAGCATGGGATATAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGAT GTAAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTG AAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTC

		ATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTTA ACYATAAA >14.4-9_Vannella sp. ATCATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCGAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTT AACYATAAA >14.4-10_Vannella sp. CGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTT AACYATAAA >14.4-11_Vannella sp. ATTATTAGCATGGGATAATAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGAT GTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAARGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTATTCTTAAC CATAAA >14.4-12_Vannella sp. TCATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATG ATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGT GAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT AACCATAAA >14.4-14_Vannella sp. GATTATTAGCATGGGATATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGA TGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTG AAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTC ATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTTA ACYATAAA >14.9-1_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGATGTA AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAAT GCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCCTAAACCA TAAA >14.9-9_Vannella sp. CGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTGAATAATGATTAATAGGGACAGCTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT TAACCATAAA >14.9-10_Vannella sp. ATTATTAGCATGGGATATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGAT GTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCCTTAA CCATAATG

		>14.9-14_Vannella sp. TGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTATAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCAAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTT AACCATAAA >14.9-15_Vannella sp. ATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTCGAATGAT GTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATCCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGCTTTAA CCATAAA >14.9-24_Vannella sp. CGATTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGGAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTT TAACYATAAA >S15_1-1_Vannella sp. ATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGA TTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAA CYATAAA >S15_1-2_Vannella sp. TAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGATTTA AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAAT GCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCA TAAA >S15_1-6_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGATTTA AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAAT GCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCA TAAA >S15_1-7_Vannella sp. GCCCGATCTTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTG AATGATTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGC GGTGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATG TTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGT CTTAACCATAAA >S15_1-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGATTTA AATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAAT GCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCA
Acanthamoeba sp. Oyster Gills-Summer	**1**	>B14.8-9_Acanthamoeba sp. GATACATTAGCATGGGATAATGGAATAGGACCCTGTCCTCCTATTTTCAGTTGGTTTTG GCAGCGCGAGGACTAGGGTAATGATTAATAGAGATAGTTGGGGGCATTAATATTTAA TTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGATTAACTTCTGCGAAAGCATCTGCC AAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACC

		GTCGTAGTCTTTAACCATAAA
Vannella sp. Water-Spring	**1**	>14.4-5_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAATAGGATTYATATCTTTATATTTGTTGGTTTGAATGATCTAAA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGATTTTATTTTGGATGGTTACCGGGAAATGGC TGGGATCCTTTCAGAATAAACTAAGCGAAAACCTTTTCCCAAGATGTTTTTCTTTATCC ARAAACAAAGGTTAAGGATCCAAAATGAATTAATACCCKCCTAATCTTTACCCTTAAA
Vannella sp. Water-Summer	**1**	>14.9-22_Vannella sp. TGATTATTAGCATGGGATAATAAATAGGATCCATATMTTACTATTTTGTTGGTTTGAA TGATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTYATATTGGATGGTTAGCG GTGAAATGCWYGGATCCATTYAAGATRAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGT TTTCATTAATCAAGAACGAARGTTAAGGGATCGAAGAYGATYAGATACCGTCGTAGTC TTTAACCATAAA
Vannella sp. Water-Summer	**1**	>14.9-23_Vannella sp. TGATTATTAGCATGGGATATAAGATAGGATTCATATCATACATTTTGTTGGTTTGTAAT GATGTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTYATATTGGATGGTTAGCGG TGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTT TCATTAATCAAGAACGAARGTTAAGGGATCGAAGATGATYAGATACCGTCGTAGTCTT TAACCATAAA
Vannella sp. Water-Summer Water-Spring Oyster Gills-Winter Water-Autumn Sediment-Spring	**47** 8 from Water-Winter 8 from Water-Summer 10 from Oyster Gills-Winter 10 from Water-Autumn 9 from Sediment-Spring	>14.9-11_Vannella sp. TGTTTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAAT AATTAGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGT GAAATGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTT AACCATAAA >14.9-12_Vannella sp. TTATTAGCATGGGGTATAAAGTAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATT AGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAA TGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAACC ATAAA >14.9-13_Vannella sp. CTGTTTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCCAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAA TAATTAGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGT GAAATGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTT CATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTT AACCATAAA >14.9-16_Vannella sp. TATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATT AGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAA TGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACC ATAA >14.9-17_Vannella sp. TATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATT AGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAA TGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACC ATAAA >14.9-18_Vannella sp.

		TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAACCAT AAA >14.9-19_Vannella sp. TATTAGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTA GATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAAT GCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCA TAAA >14.9-20_Vannella sp. TTATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAAT TAGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAA ATGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCAT TAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAAC YATAAA >14.1-1_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >14_1-2_Vannella sp. TATTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATT AGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAA TGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATT AATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACY ATAAA >14_1-3_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAGATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGTTGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AA >14.1-4_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >14_1-5_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >14_1-6_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT

		AAA >14_1-9_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTTAACCA TAAA >14_1-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AA >B14_1-1_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA A >B14_1-2_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AA >B14_1-3_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >B14_1-4_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >B14_1-5_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AA >B14_1-6_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >B14_1-7_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCCAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG

		CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AA >B14_1-8_Vannella sp. AGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGATA ATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCTC GGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCA AGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAA AT >B14_1-9_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTATTTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAACYAT AAA >B14_1-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGCTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AA >14_10-1_Vannella sp. TTAGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYATA A >14_10-2_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >14_10-3_Vannella sp. TTAGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTTAACYATA AA >14_10-4_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTARTCTTAACCAT AAAA >14_10-5_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >14_10-6_Vannella sp.

		TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA >14_10-7_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >14_10-8_Vannella sp. TGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGATAATG ATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCTCGGA TCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGA ACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAA >14_10-9_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA _>14_10-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S14_5-1_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAAW GCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTA ATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTWAACYA TAAA >S14_5-2_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S14_5-3_Vannella sp. TAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYATA AA >S14_5-4_Vannella sp. TTAGCATGGGGTAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AA

		>S14_5-5_Vannella sp. GCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGATA ATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCTC GGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCA AGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAA >S14_5-7_Vannella sp. AGCATGGGGTAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGAT AATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCT CGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATC AAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYATAA A >S14_5-8_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S14_5-9_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S14_5-10_Vannella sp. TTAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAG ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATG CTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACYAT AAA
Vannella sp. Water-Summer	**5**	>14.9-2_Vannella sp. TTAAGCTGGGAAATAAATAGGGACTAATTATTCTATTTATTGGTTTTAAATAATTAGAT AAAGATAATAGGGAAGTTCAGGGGATTCATATTAGACGTTAGCGGGAAACCTCGGAT CCATTTAAGATAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGAGTTTTCATTAATCAAGAACG AAAGTTAAGRGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGAGCTTACCATATG >14.9-3_Vannella sp. ATTATTAGCATGTGATAATAAAATAGGATTCATATCATAAATTTGTTGGTTTGAATGAT GTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAGGTTAAGGGATCGAAGATGATTAGATACCGTCGTAGTCTTAA CCATAAA >14.9-4_Vannella sp. GGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGATAATG ATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCTCGGA TCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGA ACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTATCTTTAACYATAATG >14.9-5_Vannella sp. GACTGTTTATTAGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAA ATAATTAGATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCG GTGAAATGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTT TTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTT TAACCATAAA >14.9-7_Vannella sp.

		TTGTTTATTAGCAWGGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGGTTTTA AATAATTAGATAAWGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGAWGGTTAG CGGTGAAAWGCTCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGA WGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGT AKCTTTAACYATAAA
Vannella sp. Water-Winter	**1**	>14.1-7_Vannella sp. TTAGCATGGGATATAAAATAGGATCTAATTATYCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TTATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGST CGGATCCMTTTAAGATGAWCTAAAGCGAAAGCATTTACCWWGGATGTTTTCRTTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACRATCARATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AACTTA
Vannella sp. Water-Winter	**1**	>14_1-8_Vannella sp. TTAGCTGGGATATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGAT AATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCTTATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGCT CGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCMTTAATC AAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAA AA
Vannella sp. Sediment-Spring	**1**	>S14_5-6_Vannella sp. TAGCATGGGATAATAAAATAGGATCTAATTATTCTATTTGTTGGTTTTAAATAATTAGA TAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATTAGATGGTTAGCGGTGAAATGC TCGGATCCATTTAAGATGAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCMTTAAT CAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATA AAA
Vannella sp. Sediment-Winter	**5**	>S15.1-3_Vannella sp. GCTGGGGCTGATCTTAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGG TTTGAATGATTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGT TAGCGGTGGAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAG GATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTC GTAGTCTTAACCATAAA >S15_1-4_Vannella sp TAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGATTTAA ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S15_1-5_Vannella sp***.*** TTAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGATTTAA ATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGAAATG CATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAA TCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCAT AAA >S15_1-8_Vannella sp GATCTTAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTGGTTTGAATGA TTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGGTTAGCGGTGA AATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCA TTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAA CCATAA >S15_1-9_Vannella sp GTTGGGGCCTGATCTTAGCATGGGATAATAAATAGGATTTAAAACAATATATTTGTTG GTTTGAATGATTTAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTTATATTGGATGG

		TTAGCGGTGAAATGCATGGATCCATTCAAGATAAACTAAAGCGAAAGCATTTACCAA GGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAAGGGATCGAAGATGATCAGATACCGT CGTAGTCTTAACCATAAA

Contributions des auteurs :

-ER : Expérimentations de co-cultures, microscopies, cytométrie en flux, traitement des données, écriture.
-ACP : Echantillonnage, séquençage Sanger et barcoding 18S, écriture.
-HA : Hybridation in situ en fluorescence.
-SLB: Extraction ADN, barcoding 16S.
-AP : Extraction ADN, séquençage sanger 18S, traitement des données.
-CLJ : Echantillonnage.
-JCA : Traitement des données de barcoding 18S et séquençage sanger 18S, génération des arbres phylogénétiques.
-TPR : Echantillonnage.
-CC : Microscopie électronique à transmission.
-JLR : Echantillonnage.
-YH : Expertise et conseils en culture amibienne.
-DDG : Porteuse du projet, écriture.
-GMC : Porteur du projet, écriture.

Synthèse des résultats

Afin de déterminer si la capacité de résistance à la phagocytose de LGP32 par les hémocytes d'huîtres est conservée chez les protistes phagotrophes de l'environnement et si elle implique les mêmes facteurs de virulence et de résistance, nous avons développé une étude intégrative alliant des approches de microbiologie environnementale et de biologie cellulaire comparée.

(i) Quelles amibes retrouve-t-on majoritairement en zone ostréicole ?

La diversité amibienne n'ayant jamais été décrite en zone ostréicole, un échantillonnage de sédiment, d'eau et de branchies d'huîtres a été réalisé dans la lagune de Thau au niveau des tables ostréicoles de Bouzigues, sous lesquelles diverses espèces de vibrios appartenant au clade Splendidus et pathogènes d'huître ont été mises en évidence dans le sédiment et la colonne d'eau (Lopez-Joven et *al.*, 2018). Un isolement clonal des amibes a ainsi été effectué par passages successifs à partir de ces mêmes échantillons et à partir de tissus d'huitres. La diversité amibienne ainsi révélée est relativement faible avec majoritairement des amibes appartenant à la famille des *Vannellideae* et au genre *Vannella* (Amoebozoa). Une souche amibienne représentative du milieu ostréicole identifiée à toutes les saisons et dans toutes les fractions, *Vannella* sp. AP1411, a été utilisée pour la suite de nos études, étant donné qu'elle présente une probabilité de rencontre élevée avec les vibrios présents dans cet environnement. Des observations microscopiques ont confirmé les caractéristiques morphologiques de ce genre amibien abondant en milieu marin et bien décrit.

(ii) L'interaction entre vibrios et amibes existe-t-elle en zone ostréicole ?

Pour répondre à cette question, un nouvel échantillonnage ponctuel de branchies d'huîtres à Bouzigues et d'eau de mer à Banyuls-sur-Mer a été réalisé. Un isolement clonal d'amibes de plus d'un mois, un barcoding 16S et des expériences d'hybridation in situ en fluorescence ont confirmés l'association entre 2 amibes du genre *Vannella* isolées de branchies d'huîtres et des bactéries de la famille des *Vibrionaceae*.

(iii) Le pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 est-il également résistant à la prédation par les amibes ?

Par des expériences de co-cultures, nous avons mis en évidence que LGP32 est capable de résister à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 et défavorise sa croissance tandis que LMG20012^T qui est un vibrio non virulent et proche phylogénétiquement est dégradé et permet une meilleure croissance de l'amibe en servant de source nutritive. Des observations par microscopie confocale et microscopie électronique à transmission montrent que LGP32 et LMG20012^T sont bien internalisés

par *Vannella* sp. AP1411. Cependant, le devenir des deux bactéries au sein des amibes est différent. En effet, dès le 3ème jour de co-culture LMG20012^T est localisée en nombre important au sein de vacuoles et montre une morphologie altérée tandis que LGP32 est retrouvé isolée ou par deux dans des vacuoles avec une morphologie normale. Au 6ème jour de co-culture, le même profil est observé avec LGP32 tandis qu'avec LMG20012^T la majorité des amibes ne contiennent plus de bactéries internalisées. L'ensemble de ces résultats montrent que LGP32 est internalisée par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 et résiste à l'activité microbicide de la phagocytose en perturbant potentiellement le trafic intracellulaire tandis que LMG20012^T est internalisée et dégradée. Ainsi LGP32 est capable de résister à la phagocytose par les hémocytes d'huître et à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411.

(iv) Est-ce que les facteurs de virulence de LGP32 précédemment identifiés pour leur rôle dans l'interaction avec les hémocytes d'huître sont également impliqués dans la résistance à la prédation par les amibes ?

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des souches de LGP32 mutées pour des gènes de virulences impliqués dans l'interaction avec les hémocytes d'huître. Parmi eux, nous avons identifié deux facteurs impliqués dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Le premier est CopA, une pompe ATPase de type P qui permet l'efflux du cuivre, suggérant une forte concentration dans les phagosomes amibiens. Le deuxième est Vsm, une metalloprotéase extracellulaire sécrétée, identifié comme un effecteur majeur de la cytotoxicité chez les hémocytes. De plus, La souche mutée Δ*copA* possède un phénotype similaire à LMG20012^T avec plus de deux bactéries par vacuole amibienne et une morphologie altérée, suggérant que CopA est impliqué dans le maintient de la virulence intracellulaire de LGP32. Afin de mieux caractériser le mécanisme d'action de Vsm, des co-cultures suivies par vidéo-microscopie ont été réalisées. Ceci a mis en évidence que Vsm diminue fortement la vitesse de déplacement des amibes défavorisant leurs activités de prédation. LGP32 possède donc des mécanismes de défenses intracellulaire et extracellulaire pour résister à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. En revanche, d'autres facteurs de virulence identifiés chez l'huîtres et/ou en interaction avec les hémocytes, ne semblent pas impliqués dans l'interaction avec l'amibe. Ainsi, le transporteur du cuivre CusAB permettant l'efflux du cuivre, La superoxyde dismutase SodA permettant de faire face au stress oxydatif, les protéases Vsp et InhA impliqué dans la cytotoxicité et les systèmes de sécrétion de type 6 (T6SS1 et T6SS2) ne semblent pas mis en jeux dans cette interaction.

En conclusion, cette étude a mis en évidence que les amibes majoritaires de l'environnement ostréicole appartiennent au genre *Vannella* et que certaines de ces amibes sont effectivement en

interaction avec des vibrios dans cet environnement. Nous avons montré que le pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 est également capable de résister à la prédation par les amibes grâce notamment à la métalloprotéase sécrétée Vsm et le transporteur de cuivre CopA précédemment identifié comme facteurs de virulence chez l'huître. Ainsi, LGP32 met en jeux des mécanismes intracellulaire et extracellulaire pour résister à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Il a été montré que la résistance au cuivre et la sécrétion de protéases sont des mécanismes retrouvés chez différents vibrios et impliqués chez divers hôtes, des protistes aux métazoaires. Ceci soutient l'hypothèse de sélection concomitante et suggère que les amibes de l'environnement ostréicole pourraient favoriser la sélection de certains facteurs de virulence et promouvoir ainsi l'émergence de vibrios pathogènes.

Cependant l'ensemble des facteurs de virulence identifiés chez l'huître ne semblent pas impliqués dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle certains facteurs de résistance sont impliqués dans des interactions généralistes impliquant un spectre d'hôtes large tandis que d'autres sont impliqués dans des interactions plus spécifiques. Ainsi, les facteurs de virulence d'une bactérie n'ont pas la même importance en fonction de l'hôte rencontré. Les facteurs de virulence de LGP32 qui ne sont pas impliqués dans l'interaction avec *Vannella sp*. AP1411 pourraient donc avoir été acquis et être nécessaires lors de l'interaction avec d'autres hôtes dans l'environnement. *V. tasmaniensis* LGP32 étant un pathogène opportuniste d'huîtres, il possède probablement des facteurs de résistance comme copA et Vsm impliqués chez de nombreux hôtes et d'autres comme CusAB, Vsp, InhA, SodA et les T6SS impliqué dans des interactions spécifiques, au moins chez l'huître *C. gigas*.

Données complémentaires

La résistance à la prédation au sein du clade Splendidus, au-delà de LGP32

V. tasmaniensis et *V. splendidus* sont des espèces phylogénétiquement proches dans le clade Splendidus (Sawabe et *al.*, 2013). Toutes deux, ont été associées à des mortalités d'huitres. Une étude récente menée par l'équipe de Frédérique Le Roux a permis d'identifier des populations de vibrios associées aux huîtres lors d'un épisode de mortalités d'huîtres *C. gigas* et hors période de mortalités (Bruto et *al.*, 2017). Deux populations (#23 et #24) se sont révélées associées positivement aux huîtres (Bruto et *al.*, 2017). La population 23 a été isolée en dehors d'un épisode de mortalité alors que la population 24 a été isolée pendant un épisode de mortalité. Les vibrios associés à ces deux populations ont initialement été assignés à l'espèce *V. tasmaniensis* avant d'être assignés à l'espèce *V. splendidus*. Le Roux et collaborateurs ont montré que les souches de la population 24 possèdent le plasmide de virulence pGV1512 alors que les souches de la population 23 ne le possèdent pas. Ce plasmide, qui a été précédemment identifié chez l'espèce *V. crassostreae*, est impliqué dans la virulence des souches le possédant mais pas dans la colonisation de l'huître (Bruto et *al.*, 2017).
Ces deux populations phylogénétiquement proches mais d'écologie contrastée constituent un modèle d'étude particulièrement intéressant. Par une collaboration avec Frédérique le Roux, nous avons eu la chance d'avoir accès à ces souches et d'étudier leurs interactions avec les grazers environnementaux.

Afin de déterminer la relation trophique entre l'amibe *Vannella* sp. AP1411 et les souches de vibrios des deux populations, nous avons mesuré la survie des vibrios à la prédation amibienne. Pour cela nous avons utilisé les souches 4D1_8, 4G1_8, 4D4_11 et 4G4_4 appartenant à la population 23 et les souches 7G7_3, 7G7_6, 7H1_4, 7H7_9 et 7H7_2 appartenant à la population 24. Les souches LGP32 et LMG20012^T ont été utilisées comme contrôles. L'ensemble des vibrios utilisés exprimaient la GFP et la mesure de l'intensité de fluorescence relative a permis de suivre la survie bactérienne au cours du temps (Figure 30). Les résultats montrent que les deux populations présentent une sensibilité différente à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. En effet, les souches de la population 23 sont résistantes à la prédation amibienne alors que les souches de la population 24 sont sensibles (Figure 30). Les souches 4D1_8 (#23) et 7G7_6 (#24) présentent un phénotype intermédiaire.

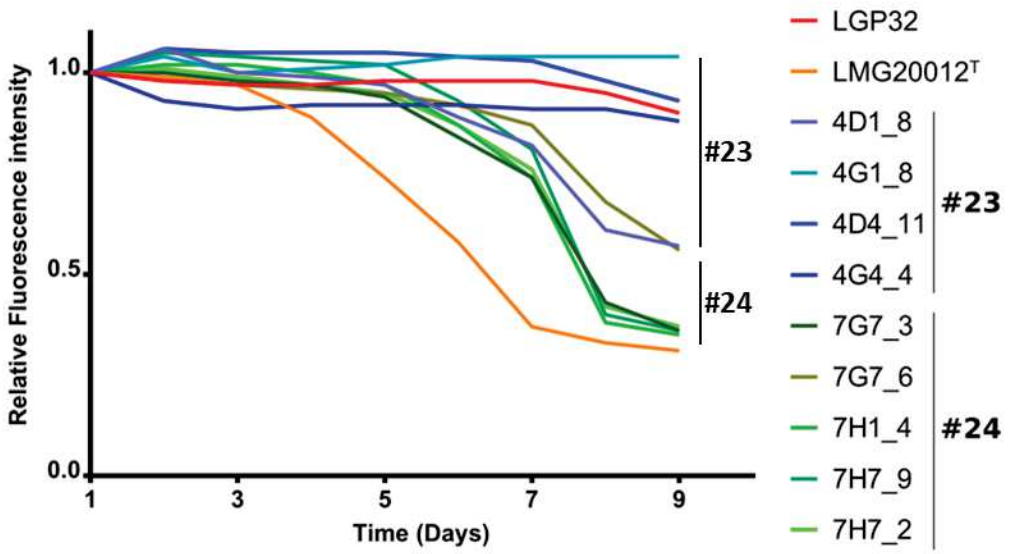


Figure 30. Suivie de la survie bactérienne à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. La survie des souches LGP32, LMG20012^T, 4D1_8, 4G1_8, 4D4_11, 4G4_4, 7G7_3, 7G7_6, 7H1_4, 7H7_9 et 7H7_2 exprimant la GFP a la prédation amibienne a été réalisée par mesure de l'intensité de fluorescence relative. #23 représente la population 23 (bleu) et #24 représente la population 24 (vert). Les souches de la population 23 ont été isolées d'huîtres hors période de mortalité de *C. gigas* et ne possèdent pas le plasmide de virulence pGV1512. Les souches de la population 24 ont été isolées d'huîtres en période de mortalité et possèdent le plasmide de virulence pGV1512. Chaque condition a été réalisée en triplicat et le résultat montré est représentatif de deux expériences indépendantes.

De manière intrigante, les souches de la population 24 isolées lors d'un épisode de mortalité *de C. gigas* et qui possèdent le plasmide de virulence pGV1512 sont sensibles à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. D'un autre côté, les souches de la population 23 isolées hors période de mortalité ne possédant pas le plasmide de virulence pGV1512 sont résistantes à la prédation amibienne. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le plasmide pGV1512 n'est pas impliqué dans l'interaction avec l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Pour tester cette hypothèse, l'équipe de Frédérique le Roux nous a donc donné accès à une souche de la population 24 curée du plasmide de virulence pGV1512, la souche 7H7_9. Nous avons réalisé la même expérimentation que ci-dessus et nous avons observé que la souche 7H7_9 curée du plasmide devient résistante à la prédation amibienne (Figure 31). Ce résultat pourrait indiquer que le plasmide pGV1512, qui n'est pas impliqué dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411, a un coût suffisamment important à lui seul chez la bactérie de la population 24 pour provoquer sa susceptibilité à la prédation amibienne. Il pourrait également y avoir un trade-off entre la virulence vis-à-vis de l'huître et la sensibilité vis-à-vis des prédateurs de l'environnement.

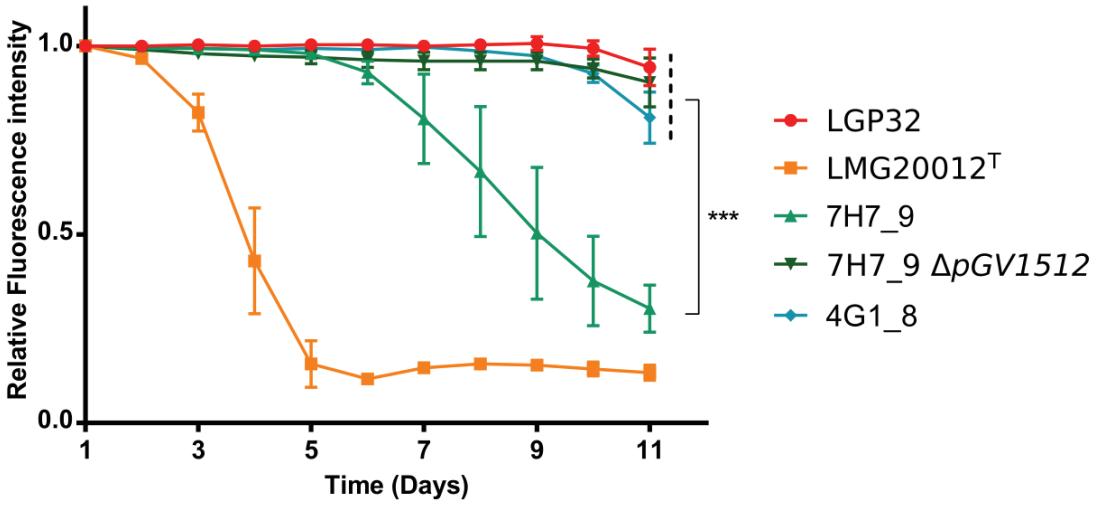


Figure 31. Suivie de la survie bactérienne à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. La survie des souches LGP32, LMG20012^T, 4G1_8, 7H7_9 et 7H7_9Δ*pGV1512* exprimant la GFP a la prédation amibienne a été réalisée par mesure de l'intensité de fluorescence relative. Chaque condition a été réalisée en triplicat et le résultat présenté est la moyenne de trois expériences indépendantes (± SEM, RM-ANOVA).

Notre hypothèse est que le plasmide de virulence pGV1512 acquis au sein du clade Splendidus et présent dans plusieurs espèces virulentes associées à l'huître (Bruto et *al.*, 2017), est spécifique des interactions pathogènes avec l'huître alors qu'il est désavantageux dans d'autres interactions biotiques.

En conclusion, la résistance à la prédation amibienne semble être un trait partagé par les espèces *V. tasmaniensis* et *V. splendidus*. Cependant, l'acquisition du plasmide de virulence pGV1512 par les souches pathogènes d'huître appartenant à l'espèce *V. splendidus* pourrait indiquer une spécialisation d'interaction, en favorisant celle avec l'hôte huître au détriment des autres interactions environnementales.

Résultats Section B : La diversité des amibes est plus faible dans l'étang de Thau et différents clades d'amibes possèdent des sensibilités différentes aux vibrios pathogènes d'huîtres.

Les protistes hétérotrophes comme les amibes se nourrissent des différents micro-organismes présents dans les mêmes environnements qu'eux. Ainsi, leur activité de prédation façonne les communautés microbiennes (Pernthaler, 2005). D'un autre côté, la structuration des communautés de protistes hétérotrophes ainsi que leurs dynamiques est influencé par divers facteurs abiotiques et biotiques comme la salinité, la teneur en oxygènes, la zone géographique ou encore la saisonnalité (Smirnov and Thar, 2004; Smirnov, 2007; Kim *et al.*, 2014), ou encore les type de proies (Amaro *et al.*, 2015). En effet, due à une longue histoire co-évolutive entre bactéries et protistes hétérotrophes, certaines bactéries ont acquis la capacité de résister à la prédation par les protistes par divers mécanismes de défenses extracellulaire et intracellulaire (Matz et Kjelleberg, 2005). L'exemple le plus connu et le mieux décrit est celui de la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980). Lors de l'échantillonnage réalisé entre 2014 et 2015, nous avons observé une faible diversité amibienne dans la lagune de Thau au niveau des tables ostréicoles de Bouzigues avec principalement des amibes appartenant au genre *Vannella* (Robino et *al.*, 2019). De plus, lors de cette étude nous avons mis en évidence que la bactérie pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 qui est capable de résister à la phagocytose par les hémocytes est également capable de résister à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 (Rubio et *al.*, 2019 ; Robino et *al.*, 2019). D'autres espèces de vibrios ont également été associées aux épisodes de mortalité d'huîtres juvéniles *C. gigas* comme les espèces *V. crassostreae* et *V. harveyi* (Lemire et *al.*, 2015 ; Lagorce et *al.*, in prep). Les modalités de virulence des différentes espèces de vibrios associées aux épisodes de mortalité d'huîtres sont différentes. En effet, la virulence de l'espèce *V. tasmaniensis* incluant la souche LGP32 est dépendante de l'internalisation par les hémocytes d'huîtres tandis que la pathogénicité de l'espèce *V. crassostreae* incluant la souche J2-9 est extracellulaire et dépendante du contact avec les hémocytes (Rubio et *al.*, 2019). Les mécanismes de virulence de *V. harveyi* impliqués chez l'huître restent à ce jour encore inconnus.

Sachant que le mécanisme de phagocytose est conservé entre des espèces distantes, sur la base des différentes informations présentées ci-dessus, nous nous sommes posé les questions suivantes : (i) Est-ce que la faible diversité amibienne observée en zone ostréicole dans la lagune de Thau est propre à cet environnement fortement anthropisé ? (ii) Existe-t-il des différences entre les protistes hétérotrophes dans leur capacité à utiliser différents vibrios pathogènes comme source nutritive ?

L'ensemble des résultats répondant à ces questions sont présentés dans l'article 2.

Article 2

Site-specific diversity of Marine free-living amoebae and different susceptibilities to pathogenic vibrios in Mediterranean costal environments.

Etienne Robino[a], Angélique Perret[a], Laurent Intertaglia[b,c], Yannick Gueguen[a], Jean-Christophe Auguet[d], Marion Richard[e], Philippe Lebaron[b,c], Delphine Destoumieux-Garzón[a], Guillaume M. Charrière[a]#

[a]IHPE UMR 5244, CNRS, Ifremer, University of Montpellier, University of Perpignan Via Domitia, Montpellier, France.

[b]Sorbonne Universites, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Observatoire Océanologique de Banyuls (OOB), Banyuls/Mer, France.

[c]Sorbonne Universites, UPMC Univ Paris 06, CNRS, Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM), Observatoire Océanologique, Banyuls/Mer, France.

[d]MARBEC, University of Montpellier, CNRS, Ifremer, IRD, Montpellier, France.

[e]MARBEC Ifremer, IRD, Univ. Montpellier, CNRS, 34200 Sète, France

Corresponding author: Guillaume M. Charrière, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier Cedex 5, Montpellier, France

Tel. +33(0)4-67-14-46-25

Email: guillaume.charriere@umontpellier.fr.

Running Head: Oyster pathogenic vibrios shape protists communities

Summary

Heterotrophic protists, and bacterivorous grazers in particular, are ubiquitous in marine environments, and they represent an important class of bacterial predators that participate to the shaping of bacterial communities. Many bacteria have evolved to escape protist predation by means of various extracellular and intracellular strategies and thus could modify grazers communities in return. However, grazer communities can also be shaped by

abiotic factors such as temperature, oxygen availibility and salinity. Vibrios are heteroptrophic γ-proteobacteria commonly found in marine environments that can be involved in a diversity of biotic interactions, including grazers. Among Vibrios, we recently showed that the oyster pathogen *V. tasmaniensis* LGP32 use different virulence factors to resist to grazing by free-living marine amoeba belonging to the *Vannella* genus. In this study, we obsevred a low diversity of amoebae in oyster farming area in mediterranean Thau lagoon with mostly Vannellid amoebae. Herein, we wondered whether this low diversity is particular to this oyster farming environment and whether the presence of pathogenic vibrios potentially resistant to grazing can modify grazers communities. To address these questions, we sampled grazers monthly over an entire year, from sediment and water column in 3 contrasted environment using various nutritive sources to follow grazers dynamics. Our study reveals that grazers communities are more diverse in sediment fractions than in water column fractions and that grazers communities in sediments are specific to geographical sites and remain stable over the year. Grazer diversity in the oyster farming area was lower than the 2 other sites and no seasonality was observed. Finally, we found that different clades of Amoebozoa harbor different predation capacities for pathogenic vibrios which may play a role in pathogen dynamics.

Introduction

Grazing protists, such as free-living amoebae (FLA), are ubiquitous and found in many environments both natural and modified by humans. Thus, FLA are mainly found in freshwater and marine environments but also in soil, air and associated with different hosts (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Samba-Louaka *et al.*, 2019). FLA diversity has been highly studied in freshwater environment compared to marine environments especially because Human pathogenic amoebae are mostly found in freshwater (Visvesvara *et al.*, 2007). Amoebae are a polyphyletic group branching along the eukaryotic tree and belonging to 4 supergroups such as Amoebozoa, which is the only one to gather amoebae only, Opisthokonta, Excavata and SAR (Lahr *et al.*, 2011). FLA feed on various microorganisms present in their environment and digest them by phagocytosis. They can feed on bacteria, yeasts, fungi, algae or other protists (Salt, 1968; De Moraes and Alfieri, 2008; Smirnov *et al.*, 2011; Radosa *et al.*, 2019). Heterotrophic protists are pivotal members of the food web in marine

environment. Indeed, their predation activity over bacteria is a major driver that shapes microbial communities (Pernthaler, 2005). Furthermore, heterotrophic protists participate to nutrient production by excretion and are a nutritive sources for zooplankton (Sherr and Sherr, 2002; Sherr *et al.*, 2007). Protist dynamics (e.g. abundance and diversity) is influenced by many environmental factors like type of preys (Guillou *et al.*, 2001; Amaro *et al.*, 2015) and abiotic factors such as salinity, temperature and oxygen availability (Smirnov, 2007; Orsi *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014).

We recently showed that the amoebae diversity in Mediterranean Thau lagoon close to oyster farming area is relatively low with mainly amoebae belonging to the *Vannella* genus, and some of these *Vannella* could establish stable interactions with *Vibrionaceae* (Robino *et al.*, 2019). Vibrios are γ-proteobacteria living in aquatic environment both freshwater and marine. They are ubiquitous and found associated with many hosts from protozoans to metazoans (Takemura *et al.*, 2014), and these associations range from symbiosis to pathogenesis (Mandel and Dunn, 2016). Among them, the best known and describe example is the Human pathogen *Vibrio cholerae* (Clemens *et al.*, 2017). Vibrios are also involved in vibrioses in aquaculture including oyster-farming (Dubert *et al.*, 2017). As for example, they can be involved in the pathogenesis of mortality syndrome of juvenile oysters *C. gigas* (de Lorgeril *et al.*, 2018). Immunosuppressed oysters upon OsHV-1 infection are colonized by opportunistic vibrios causing septicemia leading animals death. These opportunistic vibrios implied in mortality syndrome belong to *V. crassostrea*, *V. tasmaniensis* and *V. harveyi* species (Gay *et al.*, 2004; Lemire *et al.*, 2015; Lagorce et al., in prep). Cytotoxicity against hemocytes by *V. tasmaniensis* LGP32 and *V. crassostreae* J2-9 has been shown to be a major driver of their virulence but relies on species-specific mechanims (Rubio *et al.*, 2019). LGP32 cytotoxicity is phagocytosis-dependent mediated by many intracellular and extracellular factors, whereas J2-9 cytotoxicity is contact-dependent but independent of engulfment by hemocytes. Then *V. harveyi* virulence mechanisms in *C. gigas* remain to be caracterized.

Due to the long co-evolution history between bacteria and FLA, some bacteria have evolved resistance against amoeba predation through extracellular and intracellular defense mechanisms (Matz and Kjelleberg, 2005; Pernthaler, 2005). The best-known and described exemple is the facultative intracellular pathogen *Legionella pneumophila* (Rowbotham, 1980). Cellular and molecular processes of phagocytosis are conserved between protists and metazoan immune cells (Boulais *et al.*, 2010). Hence, amoebae are considered as

evolutionnary precursors of interactions and act as training ground for intracellular pathogenic bacteria, by favoring selection of virulence factors through coincidental evolution (Molmeret *et al.*, 2005; Diard and Hardt, 2017). Thus, mechanisms of resistance against predation by amoebae could be involved as virulence factors in interactions with superior eukaryotes by opportunistic pathogens, leading accidentally to pathologies (Adiba *et al.*, 2010; Taylor-Mulneix *et al.*, 2017). By comparative cellular biology, we showed that the oyster pathogen LGP32 is able to resist phagocytosis by environmental marine amoeba *Vannella* sp. AP1411 using some virulence factors also involved in pathogenesis in oysters (Robino *et al.*, 2019).

To investigate further the interactions between FLA populations and *Vibrionaceae* in mediteranean coastal waters, in the present report, we conducted a monthly sampling of 1 year in 3 contrasted environments. We chose to compare a highly anthropogenized environment and impacted by oyster-farming activity (Bouzigues station Ifremer close to oyster-farm), a moderately anthropogenized environment at open sea (close to Sète harbor) and a last one more protected from anthropogenic pressures (near the marine protected area of Banyuls-sur-Mer at SOLA station). We sampled water, sediment and oyster gills and selected grazer populations on different bacterial lawn. By 18S barcoding we found that amoeba diversity was higher in the sediment than in the water column for the three sampling sites and that the diversity was lower in the oyster-farming area than the two others sites. By analyzing OTUs phylogeny we observed various amoebae population inside *Paramoeba*, *Vermamoeba* and *Vannella* genera with different susceptibilities to the different pathogenic vibrios. In particular, we found that different *Vannella* show different susceptibility to LGP32 but could grow in the presence of J2-9 and the different susceptibilities of *Vannella* to different pathogenic vibrios were confirmed further by functional interactions analyses.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

E.coli strain SBS363 was grown in Luria-Bertani (LB) or LB-agar (LBA) at 37°C. *Vibrio tasmaniensis* LGP32, *Vibrio crassostreae* J2-9 and *Vibrio harveyi* A01 were grown in LB + NaCl 0.5M or LBA + NaCl 0.5M at 20°C, for 24 hours prior experiments. Marine amoebae *Vannella*

sp. AP1411 and isolates 1017-TWEc-4 and 0317-TSEc-4 (isolated in this study) were grown in 70% sterile seawater (SSW) with *E. coli* wild-type strain SBS363 at 18°C, for 3 days prior experiments.

Sampling and isolation of environmental amoebae

Sampling was performed monthly during one year between 2017 and 2018 at three contrasted environments in south of France. Water and sediment were collected at Thau lagoon next to oyster tables at the Bouzigues station Ifremer-REPHY (GPS: N 43°26’.058' - E 03°39’.878’), at open sea close to Sète harbor (GPS : N 43°23’.539' - E 03°41’.933’) and near the marine protected area of Banyuls-sur-Mer at SOLA station (GPS: N 42°29'300’ - E 03°08'700’). New juvenile oysters were placed each month and sampled only at oyster tables at the Bouzigues station Ifremer-REPHY. Surface water (1 meter depth) was collected at the three sites and first centimeters of sediments at 9, 10 and 30 meters depth respectively at Thau lagoon, Sète and Banyuls-sur-Mer. Water were filtered on the boat with a 63 µm pore size nylon filter then re-filtered at the lab using a 5 µm pore size MF-Millipore membrane. The 5 µm pore size membrane was then cut in four pieces and three quarter was put upside down on a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on 70% sterile seawater-agar (70% SSW) while one other entire filter was cryopreserved at minus 80°C. One gram of sediment and one piece of oyster gill of roughly 0.5 cm^2 were deposited in the center of a lawn of *E. coli* SBS363 seeded on 70% SSW-agar in triplicate while same type of samples were cryopreserved at minus 80°C. Briefly, after 2 weeks, amoebae were flushed by 70% SSW and clonally isolated by dilutions within 96 well plates with statistically less than one amoeba per well. One milliliter of flushed solution was cryopreserved at minus 80°C for each condition. Amoebae clones were amplified by culturing in 6 well plates for 5 days, then 2 wells were cryopreserved at minus 80°C in 10% DMSO and one other well were centrifuged at 4°C at 5,000 g during 10 minutes and pellet was cryopreserved at minus 80°C in 70% SSW. Same steps were performed with *V. tasmaniensis* LGP32, *V. cassostreae* J2-9 and *V. harveyi* A01 in May and October 2017 during mortality events of oysters and January and February without mortality events. Heat killed vibrios were used to grow amoebae in liquid culture steps. During the sampling 205 amoebae clones from *E. coli* lawn and 96 clones from vibrios lawns were isolated. A total of 125 samples from *E.coli* lawn and 84 samples from vibrios lawns were recovered for diversity analyses by 18S barcoding .

Amoebae clones analysis

DNA of amoebae clones was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's protocol. V4 region of the 18s rDNA gene was amplified using universal primers TAReukFWD1: 5'-CCAGCASCYGCGGTAATTCC-3' and TAReukREV3: 5'-ACTTTCGTTCTTGATYRA-3' (Stoeck *et al.*, 2010) at an annealing temperature of 50°C. Nucleotide sequences were determined by Sanger sequencing (Eurofins). Sequences were clean up using Chromas and MEGA7 software. One representative sequence was kept when several amoebae clones sequences isolated during same date in the same fraction showed more than 97% of similarity using Clustal Omega software. Nuceotide sequences were aligned with ClustalW using MEGA7 software. Alignment was trimmed at each extremity and Neighbo-Joining (NJ) tree comprising 90 amoebae clones sequences and 35 reference sequences was computed using MEGA7 by bootstrap method with 1000 replications. Phylogenetic tree was annotated using iTOL software (Letunic and Bork, 2019).

18S barcoding data processing

Total DNA from flushed grazing plates were analyzed by performing barcoding on the v4 loop of the 18S rDNA gene using the same universal primers that previously at an annealing temperature of 53°C (TAReuk454FWD-illumina: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG YRC CAG CAS CYG CGG TAA TTCC-3' and TAReukRev3-illumina : 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GYR ACT TTC GTT CTT GAT YRA-3') (Stoeck *et al.*, 2010). Paired-end sequencing (300 bp read length) was performed by GenSeq platform (Labex CEMEB, Montpellier, France) on the MiSeq system (Illumina).

The FROGS pipeline (Find Rapidly OUT with Galaxy Solution) into galaxy software was used to determined operational taxonomic unit (OTU) and taxonomic affiliations (Escudié *et al.*, 2018). Briefly, paired reads were merged using FLASH (Magoč and Salzberg, 2011) then primers were removed with cutadapt (Martin, 2011). After denoising, clustering was done using SWARM with aggregation distance equal to 3 (Mahé *et al.*, 2014). Chimera were removed using VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). We filtered the dataset to kept OTUs which represent at least 0.005% of all sequences and performed taxonomic affiliation using Blastn+ against PR2 database (4.11.0) (Bokulich *et al.*, 2013). OTUs affiliated to oyster and fungi was manually removed and tree was done using MAFFT to compute sequence alignment and

FastTree to create tree with the approximately maximum likelihood method (Katoh, 2002; Price *et al.*, 2010). OTU table and tree produce using FROGS pipeline were used for subsequent analysis. All statistical analyses were done using the phyloseq V1.26.1 (McMurdie and Holmes, 2013) and ggplot2 (Wickham, 2009) R packages on the R software 3.5.3 (R core team).

Global diversity on permissive *E. coli* nutritive source

Samples obtained from *E. coli* lawn with sediment and water were subset and those with less than 1967 sequences have been removed. Samples were rarifying using the rarefy-even-depth function and rarefaction curves of protist species richness were done using the ggrare function. We used ggplot package for study observed communities compositions by fractions, sites and seasons. Using phyloseq R package, observed alpha diversity at the OTU level as well as beta diversity were done by fractions, sites and season. Community similarity was assessed by principal coordinate analysis (PCoA) using the Unifrac dissimilarity index.

Global diversity on various nutritive sources

Samples obtained from vibrios an *E. coli* lawn with sediment and water during May, October, January and February were subset and those with less than 2269 sequences have been removed. Samples were rarifying using the rarefy-even-depth function and rarefaction curves of protist species richness were done using the ggrare function. We used phyloseq R package to compare effect of different nutritive sources on community composition, alpha and beta diversity. Community similarity was assessed by principal coordinate analysis (PCoA) using Unifrac dissimilarity index. OTUs phylogeny was also computed using FROGS pipeline and annotated using iTOL software (Letunic and Bork, 2019).

***Vannella* clones and OTUs phylogeny**

We focused on *Vannella* genus and done phylogenetic tree using OTUs of total cultivable diversity and amoebae clones sequences belonging to *Vannella* genus. For that, we used 24 sequences from total cultivable diversity, 14 sequences of amoeba clones and 14 reference sequences. Nucleotides sequences were aligned with ClustalW using MEGA7 software. Alignment was trimmed at each extremity and Neighbor-joining (NJ) tree was performed

using MEGA7 by bootstrap method with 1000 replications. Phylogenetic tree was annotated using iTOL software.

Statistical analyses

We performed non-parametric Kruskal-Wallis tests when normality of residuals and homogeneity of variances were rejected (Shapiro and Bartlett test respectively) to compare alpha diversity. When Kruskal-Wallis tests were significant, we done pairwise comparison (post hoc) analyses with Bonferroni corrections for multiple testing using Wilcoxon test. When Shapiro and Bartlett tests were significant, we did one-way test followed by post hoc analyses (Tuckey test) if one-way were significant. Significant variables of PCoA were identified using multivariate anova test with adonis function implemented in vegan R package V2.5-4 (999 permutations) (Oksanen *et al.*, 2019). The threshold significance level was set at 0.05.

Functional interactions assays

To confirm different susceptibility to vibrios of amoebae clones previously identified belonging to the genus *Vannella*, we performed grazing assays using contrasted *Vannella* clones on various bacterial lawns such as *V. tasmaniensis LGP32* and *V. crassostrea J2-9* that possess 2 different virulence ways in oyster hemocytes. Briefly, we putted 800µL of vibrios at DO 2.5 on non-nutrient medium (sterile seawater with 1,5% agar), then we incubated overnight at 20 °C. We deposited cellulose discs (diameter 6mm) in the center of Petri dishes, then 10µL of various amoebae at 5.10^5 amoebae per mL and we incubated at 20°C. Grazing halo sizes were followed at days 3 and 6. We performed control plates with amoebae and without bacteria or with bacteria and without amoebae. Each condition was done in technical replicate. We chose *Vannella* clones 1017-TWEc-4, 0317-TSEc-4 and *Vannella* sp. AP1411. Each condition was performed in technical triplicates and the results shown the result of one experiment. Error bars represent the standard error of the mean (± SEM). Statistical analysis was performed using Two way-Anova.

Results

Impact of fractions, sites and seasonality on grazers diversity in Mediterranean marines environments

Grazers dynamics remains poorly describe in Mediterranean environment and less in lagoons close to oyster farms. Therefore, we first attempt to describe grazers diversity and distribution in Mediterranean environment in 3 contrasted environments. Thus, we performed a monthly sampling during one year in anthropogenized environment close to oyster farm in Thau lagoon (Bouzigues), in a moderate anthropogenized environment in open sea near to Sète harbor and a last one in more protected environment in Banyuls-sur-Mer close to marine protected area (Figure S1). We sampled sediment, water at the 3 sites and oyster gills only at Bouzigues. Samples have been putted on non-nutrient plates with *E. coli* as permissive nutritive food to isolate the maximum diversity and with various pathogenic oyster vibrios during 4 months to determine nutritive source effect on diversity. Briefly, after 15 days incubation, we determined total cultivable diversity by paired end barcoding of the V4 hypervariable region of 18S rDNA gene. It yielded a total of 7 635 124 sequences. After filtering to keep OTUs which represent a least 0.005% of all sequences, we obtain 631 OTUs (for a total of 4 498 944 sequences) that could be annotated using the PR2 18S database. After filtering for fungi, oyster and bacterial sequences, we obtained 491 OTUs for a total of 3 630 240 sequences. Rarefaction curves tended to level, suggesting that most diversity was sequenced in each sample (Figure S2). First, by studying the diversity by fractions we found a majority of heterotrophic protists (Cercozoa and Loboza phylum), confirming that the sampling method favor grazers (Figure 1A). In addition, OTUs diversity was higher in sediments than water column, with 450 and 276 OTUs in sediment and water respectively. OTU richness assessed by observed index confirmed significant difference between fractions (Kruskal-Wallis test, $\chi 2 = 29.658$, df = 1, $p < 0.001$) (Figure 1B). Finally, principal coordinate analysis based on Unifrac dissimilarity index showed that sediment and water column form 2 separate groups along the first axis which explained 10,7% of the total variation confirmed by using multivariate anova test with adonis function ($p < 0.001$) (Figure 1C). The two separate groups indicated different species composition between the 2 fractions. Secondly, we studied diversity by sites in each fraction due to fractions effect was too important and hidden the site effect. Observed OTU number showed a lower diversity in Thau lagoon both water column and sediment samples whereas higher diversity was observed in open sea at Sète (Figure 2A). However, OTU richness assessed by observed index showed no differences within water column samples between the 3 sites (Figure 2B). On the contrary, within sediment, Thau samples had lower OTU richness and showed significant

difference with Sète and Banyuls sites (Tuckey multiple comparison test, Thau/Banyuls-sur-Mer: p = 0.028; Thau/Sète : p = 0.0004). However, no significant difference was observed between Sète and Banyuls-sur-Mer (Figure 2B). Principal coordinate analysis based on Unifrac dissimilarity index shown that sites within samples sediment form 3 separate groups along the first axis which explained 10,7% of the total variation confirmed by using multivariate anova test with adonis function ($p < 0.001$) but no distinct groups was observed within water column samples (Figure 2C). The absence of groups in the water samples indicates a protist community that is unstable and not specific in comparison to the sediment samples between the 3 sites that have distinct species communities. Finally, no seasonal effect was observed on protist diversity (Figure S3). All of these results indicate that the major driver was identify here on grazers diversity was the sampling site and the sediment fraction in particular host the highest and most specific diversity.

Different pathogenic vibrios as prey affect differently grazer diversity

Previous studies have shown that grazers such as amoebae shapes bacterial communities under predation activities. By mirror effect, some bacteria can modulate the composition of grazers as some bacteria have various strategies of defenses against predation. Thus, we wondered whether different pathogenic vibrios that harbor different virulence strategies, could modifiy the diversity of isolated grazers. Therefore, 4 different months of our sampling, *V. tasmaniensis* LGP32, *V. cassostreae* J2-9 and *V. harveyi* A01 were used as nutritive sources in addition to *E. coli* (Figure S1). We chose 2 months during mortality events of oyster (May and October) and 2 months without infectious events (January and February) as pathogenic vibrios in the different fraction is likely impacted by oyster mortalities (Lopez-Joven *et al.*, 2018). So, all samples with at least 2269 reads were kept then rarefied. Rarefaction curves suggested that most diversity was sequenced in each sample (Figure S4). Global analyses of the relative proportions of grazers, the OTU richness (using Simpson index) and the principal coordinate analysis based on Weighted Unifrac dissimilarity index showed no difference or specific diversity between the various bacterial lawns suggesting no major effect of the different preys on grazer diversity (Figure S5). To investigate more accurately potential differences we compared OTUs phylogeny in the different conditions (Figure 3). In contrast to the global approach, we could observe different patterns of sensitivity to various food sources depending on amoeboid groups.

Overall, Cercozoa and *Acanthamoeba* were able to grow on the 4 bacterial lawns suggesting that these organisms seem to be rather generalists regarding tested bacteria in our study. On the contrary some amoeba genus presented different clade with various sensitivity to the different prey such as *Paramoeba*, *Vermamoeba* and *Vannella* genus. Indeed, *Paramoeba* genus showed 3 amoebae clade with one able to grow on all bacterial lawns, another one able to grow on *V. harveyi* lawn more efficiently and the last one able to grow on vibrios lawns with each OTUs found on *V. harveyi* lawn. Among *Vermamoeba* genus, 2 different clades were observed with no clear pattern for the others OTUs. The first one showed OTUs corresponding to amoebae that grew only on *E. coli* lawn whereas the second one showed OTUs from amoebae that grew mostly on *V. harveyi* lawn with one OTU found both *V. harveyi* and *V. crassostreae* lawns. Finally, *Vannella* genus appeared more sensitive to *V. tasmaniensis* LGP32 lawn than to the others lawns of bacteria, only few OTUs were identified from samples grown on LGP32 lawn. These results are reminiscent of our recent study showing that LGP32 is resistant to predation by the amoeba *Vannella* sp. AP1411 (Robino *et al.*, 2019). Hence, the interaction between LGP32 and amoebae of the *Vannella* genus seems to be deleterious to most amoebae belonging to this genus and the virulence mechanisms of LGP32 appear to be particularly effective when interacting with amoebae belonging to the *Vannella* genus.

V. tasmaniensis LGP32 resists better to predation than _V. crassostreae_ J2-9 by amoebae belonging to the _Vannella_ genus

To confirm results of diversity analyses by 18S barcoding, we performed functional assays using various *Vannella* isolated during the sampling campaign and previous sampling. Neighbor-Joining tree comprising 90 amoebae clones sequences and 35 reference sequences revealed that we mainly clonally isolated amoeba belonging *Paramoeba*, *Acanthamoeba* and *Vannella* genus with more *Paramoeba* than the two others as observed using 18S Barcoding. (Figure 4). We also managed to isolate amoebae belonging to the *Vexillifera* genus to a lesser extent. Only one amoeba belonging to *Vermamoeba* and one belonging to *Nolandella* genera were isolated as well as 2 cercozoan clones (0218-SWJ2-9-3 and 0218-TSEc-2) possessing 95% sequence identity with *Filoreta japonica*. Then, in order to functionally verify that some amoebae belonging to *Vannella* tend to be less efficient to predate on LGP32 than J2-9 we choose *Vannella* clones that correspond to phylogenetic neighbors of the different

clades of *Vannella* identified by 18s barcoding (Figure 5). Thus 3 *Vannella* clones were used to conduct functional assays comprising 1017-TWEc-4, 0317-TSEc-4 clones and *Vannella* sp. AP1411 isolated in previous sampling. Grazing assays confirmed that the 3 *Vannella* strains possess different grazing capacities when facing the different vibrios. Indeed, the clone 1017-TWEc-4 did not grow on any vibrio lawn whereas the amoeba *Vannella* sp. AP1411 harbor a similar grazing efficiency with both strain LGP32 and J2-9 on days 3 and 6 of co-culture. Finally, on day 6 of co-culture, the clone 0317-TSEc-4 showed a better efficiency of grazing on J2-9 than on LGP32.

Discussion

In a previous study, we found a low amoebic diversity in mediteranean environment close to oyster farming area of Bouzigues in the Thau lagoon, with mainly amoebae belonging to *Vannella* genus. However, amoebae belonging to *Paramoeba* genus and in some cases to *Acanthamoeba* have been frequently reported in marine environments (Page, 1973; Bhattacharya *et al.*, 1987; Samba-Louaka *et al.*, 2019). Thus, we wondered whether this low amoebic diversity observed previously was due to the anthropic pressure caused by oyster farms. Although abiotic factors such as salinity or oxygen availability can modulate the diversity of protist communities (Smirnov and Thar, 2004; Kim *et al.*, 2014), water quality including eutrophication/pollution can also influence the composition of protist communities. With increasing eutrophication, Xu and collaborators have highlighted compositional shift of ciliates assemblages in coastal water of the Yellow sea (Xu *et al.*, 2011). It has been shown that increasing heavy metal pollution is correlated with the decrease of diversity and abundance of testate communities amoebae living in *Sphagnum fallax* (Nguyen-Viet *et al.*, 2008). In addition, water quality also influences the composition of bacterial communities, which are a major nutritive source of heterotrophic protists (Wu *et al.*, 2019). Thus, these modifications of bacterial communities can potentially influence assemblages of protist communities. As the dynamics of free-living amoebae has being poorly described in the Mediterranean environment and even more in lagoons, we conducted a monthly sampling for one year in three contrasted sites. We sampled again near Bouzigues oyster farm in the Thau lagoon, but also in moderate anthropogenized environment at open sea close to Sète harbor as well as in weakly anthropogenized

environment in Banyuls-sur-Mer close to a marine protected area. We sampled water column and sediment at the 3 sites and oyster gill only at Bouzigues. The most important factor on grazers diversity was found to be the sampled fraction, i.e. sediment versus water column (Figure 1A and 1B). This result is consistent with lifestyle of benthic grazers who feed by internalization of various microorganisms present at the surface of different substrates and that were favored by our sampling and enrichment protocol (De Moraes and Alfieri, 2008; Smirnov *et al.*, 2011; Radosa *et al.*, 2019). However, we also found that grazer communities between the two fractions were different (Figure 1C). This is similar result to other studies that showed community differences depending on the fraction sampled or even the location of samples within a single fraction. A major study showed that protist communities are different between surface and deep waters with only few OTUs shared between the two communities (Orsi *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2016). These studies and our results confirm an adaptation of specific protists communities to different environments with different physical and chemical characteristics and therefore requiring different living conditions. As for example *Vannella* appear to be more frequent in the water column than in the sediment and *Paramoeba* appear to be more frequent in the sediment than in the water column. This may relate to different liftestyle and morphological adaptations as *Vannella* are well known for forming characteristic elongated filopodia in their planktonic shape (Smirnov, 2007), which may represent an advantage to float and move using water currents.

In addition to the fraction effect observed on grazers diversity, we also observed a lower diversity in the sediment of the thau lagoon than the 2 others sites, whereas there was no significant difference between Sète and Banyuls, suggesting that the high anthropization of this environment is potentially responsible for the lower diversity of protists (Figure 2A and 2B). On the other hand, we did not observe any difference between the 3 sites in water column (Figure 2A and 2B). In addition, we showed that protist communities are differently structured in sediment between the 3 sites but appear less stable in water column, showing no specificity according to the sampled sites (Figure 2C). These results suggest that the sediment seems to better represent a given environment and appears to be the preferred fraction to compare different environments. The water column might be more subject to currents mixing effects with a higher connectivity between sites whereas the sediment fractions are likely to be more stable hence more specific to a given site. Sediment physicochemical properties (mud and sand compositions) for each site could also participate

to shape grazers diversity differently. Finally, we did not observe any seasonal effect regardless of the fraction or site sampled, unlike other studies that showed seasonal variations in surface waters (Kim *et al.*, 2014; Berdjeb *et al.*, 2018) (Figure S2).

In addition to abiotic factors, biotic factors such as prey of protists can also influence assemblages of protist communities. indeed, because of the long co-evolutionary history between protists and their prey, some of them have acquired the ability to resist predation by protists using various extracellular and intracellular mechanisms and even sometimes to kill them (Matz and Kjelleberg, 2005a; Pernthaler, 2005). Indeed, Amaro and collaborators showed that *Legionella pneumophila Philadelphia*-1 shapes protist communities in co-cultures, having significant effects on the abundances of Cercozoa, Amoebozoa and Heterolobosea phyla (Amaro *et al.*, 2015). We showed that oyster pathogenic vibrio *V. tasmaniensis* LGP32 is able to withstand predation by the amoeba *Vannella* sp. AP1411 using similar virulence factors that with oyster hemocytes such as copper efflux pump CopA and secreted extracellular metalloprotease Vsm (Robino *et al.*, 2019). Other vibrios have also been associated with oyster mortality events including *V. crassostreae* J2-9 and *V. harveyi* A01 (Gay *et al.*, 2004; Lemire *et al.*, 2015; Lagorce et al., in prep). Although virulence modalities in oyster hemocytes are still unknown for *V. harveyi* A01, virulence of *V. tasmaniensis* LGP32 has been shown to be dependent on internalization by hemocytes while dependent on hemocytes contact with *V. crassostreae* J2-9 (Rubio *et al.*, 2019). Thus, we wondered whether these 3 strains of vibrios with different virulence modalities could influence diversity of protist communities in co-culture compared to the non-virulent strain *E. coli* SBS363 used as a permissive nutritive source. Although by global approaches to compare alpha diversity between the different conditions using Simpson index we could'nt observed differences according to various nutritive source (Figure S3), a phylogenetic analysis of all OTUs generated by 18S barcoding we could observe differences in the sensitivity of the protist clades according to the nutritive source (Figure 3). The Cercozoa and *Vermistella* were able to grow on all the bacterial lawns suggesting a strong efficiency of grazing of this protist groups, whereas in other Amoebae genera, we observed different clades within genus with different sensitivities to the different preys. In the *Paramoeba* genus, we observed 3 different clades. The first one was able to grow in the presence of the 4 bacteria, like Cercozoa and *Vermistella*; the second one, was able to grow in the presence of *V harveyi* A01 and *E. coli* SBS 363 strains; and the the last one was able to grow in

presence of vibrios only, with all OTUs of this clade found in the presence of *V. harveyi* A01. In the *Vermamoeba* genus, the structuration is less clear but we nevertheless observe 2 clades. The first one shows a strong growth inhibition in the presence of any vibrios and was found only in the presence of *E. coli* SBS363 whereas the second clade was identified only in the presence of *E. coli* SBS363 and *V. harveyi* A01 with a single OTU also found with J2-9. The *Vannella* genus shows a strong growth inhibition in the presence of the LGP32 strain because the majority of OTUs were found in the presence of A01, J2-9 and *E. coli*. All of these results suggest that there some clade of grazers behave as generalist such as Cercozoa or *Vermistella* genus able to develop on all bacteria wherease other amoebic genera show more specific interactions depending of the nutritive source with the presence of sub-population within the same genus. This is reminiscent of the findings by Amaro et al. with the pathogen *Legionella pneumophila* that showed different types of interactions depending on the amoebic host encountered (Amaro *et al.*, 2015). Our results also support the hypothesis that certain bacterial virulence factors could be involved in various biotic interactions explaining the presence of various susceptibilities between different groups of protists and even the presence of sub-populations within the same amoeba genus. An increasing number of studies have shown that the large panel of virulence factors in one pathogenic bacteria are not involved in the same way in different hosts (Boamah *et al.*, 2017). This has also been demonstrated for the pathogen *Vibrio cholerae* possessing essential virulence genes when interacting with *A. castellanii* amoebae which play a minor role during the interaction with human immune cells (Van der Henst *et al.*, 2018). Recently, we showed that the oyster pathogen LGP32 has virulence genes involved in both oyster hemocytes and the amoeba *Vannella* sp. AP1411 but that other virulence genes involved in hemocytes have no role in the resistance to predation by this amoeba (Robino *et al.*, 2019). Due to observed results by barcoding and knowing that the virulence mechanism of J2-9 are different from those of LGP32 we have studied in more details the amoebae belonging to the *Vannella* genus. Indeed, amoebae of *Vannella* genus show sensitivity to LGP32 bacteria but not to the pathogenic oyster J2-9 bacteria. So, we performed functional assays with different amoebae belonging to the *Vannella* genus. We observed various sensibilities to vibrios strains of *Vannella* strains in grazing assays (Figure 5). *Vannella* sp. AP1411 strain showed the same growth capacity on both LGP32 and J2-9 strain at day 3 and 6 of co-culture whereas 1017-TWEc-4 strain did not grow on both bacterial strains. Only 0317-TSEc-4 strain

showed a significant difference of growth with J2-9 bacterium at day 6 of co-culture. These results further reinforce the hypothesis that virulence factors are not involved in same manner with different hosts. In these functional tests we had 3 different phenotypes that suggest several modalities of interactions. Although LGP32 and J2-9 have different virulence factors involved in oyster hemocytes, *Vannella* sp. AP1411 showed no differences of growth with the two bacterial strains suggesting that this amoeba is able somehow to cope with the different virulence factors of the two strains, in our culture conditions. On the opposite, the 1017-TWEc-4 strain was unable to grow in the presence of LGP32 and J2-9, suggesting that this amoeba strain is unable to however come LGP32 and J2-9 virulence modalities. In the third case, 0317-TSEc-4 strain is able to grow on both strains with a better growth with J2-9 strain, suggesting that virulence mechanisms involved are different between the two bacterial strains and that virulence strategy of LGP32 is more efficient in resisting predation by this amoeba. Interestingly, 0317-TSEc-4 strain was sampled in march from a sediment sample of the Thau lagoon where V. *tasmaniensis* and *V. crassostreae* were found to be abundant, in winter season in particular (Lopez-Joven *et al.*, 2018). Hence this specie of *Vannella* is likely to experience more frequent interactions with those vibrios and may have differentially adapted to each species.

In conclusion, using environmental microbiology and molecular biology as well as functional assays, our study contribute to provide better understanding of heterotrophic protist communities in mediterranean coastal environment. We show stable and more diverse protists communities in sediment than water column with distinct assemblages between 3 contrasted sites within the sediments and we uncover a low diversity of protists in Thau lagoon which is highly exploited for oyster farming. By using various strains of pathogenic vibrios as nutritive sources we bring new evidences that bacteria may evolve virulence factors imply in many hosts and other virulence factors imply in specific interactions.

Acknoledgements

We are grateful to Eve Toulza and Jérémie Vidal Dupiol for precious help in sequencing analysis. We thank Philippe Haffner and Marc Leroy for technical assistance. This work; through the use of the GENSEQ platform (http://www.labex-cemeb.org/fr/genomique-environnementale-2) from the labEx CeMEB. The present study was supported by the Ec2co-

CNRS funded VibrAm projects, by the UE funded project VIVALDI (H2020 program, No. 678589), by the EU funded EMBRC and by Ifremer, University of Montpellier and University of Perpignan via Domitia.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflict of interests related to this work.

References

Adiba, S., Nizak, C., van Baalen, M., Denamur, E., and Depaulis, F. (2010) From grazing resistance to pathogenesis: The coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* **5**: 1–10.

Amaro, F., Wang, W., Gilbert, J.A., Roger Anderson, O., and Shuman, H.A. (2015) Diverse protist grazers select for virulence-related traits in Legionella. *ISME J* **9**: 1607–1618.

Berdjeb, L., Parada, A., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2018) Short-term dynamics and interactions of marine protist communities during the spring-summer transition. *ISME J* **12**: 1907–1917.

Bhattacharya, A., Ghosh, M., and Choudhury, A. (1987) Seasonal Abundance of *Acanthamoeba rhysodes* (Singh, 1952) (Protozoa: Gymnamoebia) in a Mangrove Litter-Soil Ecosystem of Gangetic-Estuary, India1,2. *J Protozool* **34**: 403–405.

Boamah, D.K., Zhou, G., Ensminger, A.W., and O'Connor, T.J. (2017) From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of Legionella. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., et al. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* **10**: 57–59.

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.

Clemens, J.D., Nair, G.B., Ahmed, T., Qadri, F., and Holmgren, J. (2017) Cholera. *Lancet* **390**: 1539–1549.

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., et al. (2018) Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* **9**:.

De Moraes, J. and Alfieri, S.C. (2008) Growth, encystment and survival of Acanthamoeba castellanii grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 221–229.

Diard, M. and Hardt, W.D. (2017) Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 679–697.

Dubert, J., Barja, J.L., and Romalde, J.L. (2017) New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. *Front Microbiol* **8**: 1–16.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–1294.

Gay, M., Berthe, F.C.J., and Le Roux, F. (2004) Screening of Vibrio isolates to develop an

experimental infection model in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Dis Aquat Organ* **59**: 49–56.
Guillou, L., Jacquet, S., Chrétiennot-Dinet, M.J., and Vaulot, D. (2001) Grazing impact of two small heterotrophic flagellates on Prochlorococcus and Synechococcus. *Aquat Microb Ecol* **26**: 201–207.
Katoh, K. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059–3066.
Kim, D.Y., Countway, P.D., Jones, A.C., Schnetzer, A., Yamashita, W., Tung, C., and Caron, D.A. (2014) Monthly to interannual variability of microbial eukaryote assemblages at four depths in the eastern North Pacific. *ISME J* **8**: 515–530.
Lahr, D.J.G., Parfrey, L.W., Mitchell, E.A.D., Katz, L.A., and Lara, E. (2011) The chastity of amoebae: Re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proc R Soc B Biol Sci* **278**: 2081–2090.
Lemire, A., Goudenège, 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* **December 9**: 1–9.
Letunic, I. and Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **47**: W256–W259.
Lopez-Joven, C., Rolland, J.L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., et al. (2018) Oyster Farming, Temperature, and Plankton Influence the Dynamics of Pathogenic Vibrios in the Thau Lagoon. *Front Microbiol* **9**: 2530.
Magoč, T. and Salzberg, S.L. (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957–2963.
Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2014) Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* **2014**: 1–13.
Mandel, M.J. and Dunn, A.K. (2016) Impact and influence of the natural vibrio-squid symbiosis in understanding bacterial-animal interactions. *Front Microbiol* **7**: 1–10.
Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10.
Matz, C. and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook - How bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302–307.
McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**:.
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.
Nguyen-Viet, H., Bernard, N., Mitchell, E.A.D., Badot, P.M., and Gilbert, D. (2008) Effect of lead pollution on testate amoebae communities living in Sphagnum fallax: An experimental study. *Ecotoxicol Environ Saf* **69**: 130–138.
Orsi, W., Edgcomb, V., Jeon, S., Leslin, C., Bunge, J., Taylor, G.T., et al. (2011) Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. II. Habitat specialization. *ISME J* **5**: 1357–1373.
Page, F.C. (1973) Paramoeba: A Common Marine Genus. *Hydrobiologia* **41**: 183–188.
Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 537–546.
Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**:.

Radosa, S., Ferling, I., Sprague, J.L., Westermann, M., and Hillmann, F. (2019) The different morphologies of yeast and filamentous fungi trigger distinct killing and feeding mechanisms in a fungivorous amoeba. *Environ Microbiol* **21**: 1809–1820.

Robino, E., Poirier, A.C., Amraoui, H., Le Bissonnais, S., Perret, A., Lopez-Joven, C., et al. (2019) Resistance of the oyster pathogen Vibrio tasmaniensis LGP32 against grazing by Vannella sp . marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors . *Environ Microbiol* **00**:.

Rodríguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**: 225–241.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**: 1–22.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.

Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., et al. (2019) Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proc Natl Acad Sci* 201905747.

Salt, G.W. (1968) The Feeding of Amoeba proteus on Paramecium aurelia *. *J Protozool* **15**: 275–280.

Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M.-H., Cateau, E., and Héchard, Y. (2019) Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol Rev* **43**: 415–434.

Sherr, B., Sherr, E., Caron, D., Vaulot, D., and Worden, A. (2007) Oceanic Protists. *Oceanography* **20**: 130–134.

Sherr, E.B. and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **81**: 293–308.

Smirnov, A. and Thar, R. (2004) Vertical distribution of gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in the top layer of brackish-water sediments. *Protist* **155**: 437–446.

Smirnov, A. V. (2007) Cryptic freshwater amoeba species in the bottom sediments of Nivå Bay (Øresund, Baltic Sea). *Eur J Protistol* **43**: 87–94.

Smirnov, A. V., Bedjagina, O.M., and Goodkov, A. V. (2011) Dermamoeba algensis n. sp. (Amoebozoa, Dermamoebidae) - An algivorous lobose amoeba with complex cell coat and unusual feeding mode. *Eur J Protistol* **47**: 67–78.

Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M.D.M., Breiner, H.W., and Richards, T.A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Mol Ecol* **19**: 21–31.

Takemura, A.F., Chien, D.M., and Polz, M.F. (2014) Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol* **5**: 38.

Taylor-Mulneix, D.L., Soumana, I.H., Linz, B., and Harvill, E.T. (2017) Evolution of bordetellae from environmental microbes to human respiratory pathogens: Amoebae as a missing link. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–7.

Van der Henst, C., Vanhove, A.S., Drebes Dörr, N.C., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Clerc, S., et al. (2018) Molecular insights into Vibrio cholerae's intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun* **9**: 3460.

Visvesvara, G.S., Moura, H., and Schuster, F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 1–26.

Walsh, E.A., Kirkpatrick, J.B., Rutherford, S.D., Smith, D.C., Sogin, M., and D'Hondt, S. (2016) Bacterial diversity and community composition from seasurface to subseafloor. *ISME J* **10**: 979–989.

Wickham, H. (2009) ggplot2.

Wu, H., Li, Y., Zhang, W., Wang, C., Wang, P., Niu, L., et al. (2019) Bacterial community composition and function shift with the aggravation of water quality in a heavily polluted river. *J Environ Manage* **237**: 433–441.

Xu, K., Choi, J.K., Lei, Y., and Yang, E.J. (2011) Marine ciliate community in relation to eutrophication of coastal waters in the Yellow Sea. *Chinese J Oceanol Limnol* **29**: 118–127.

Figures

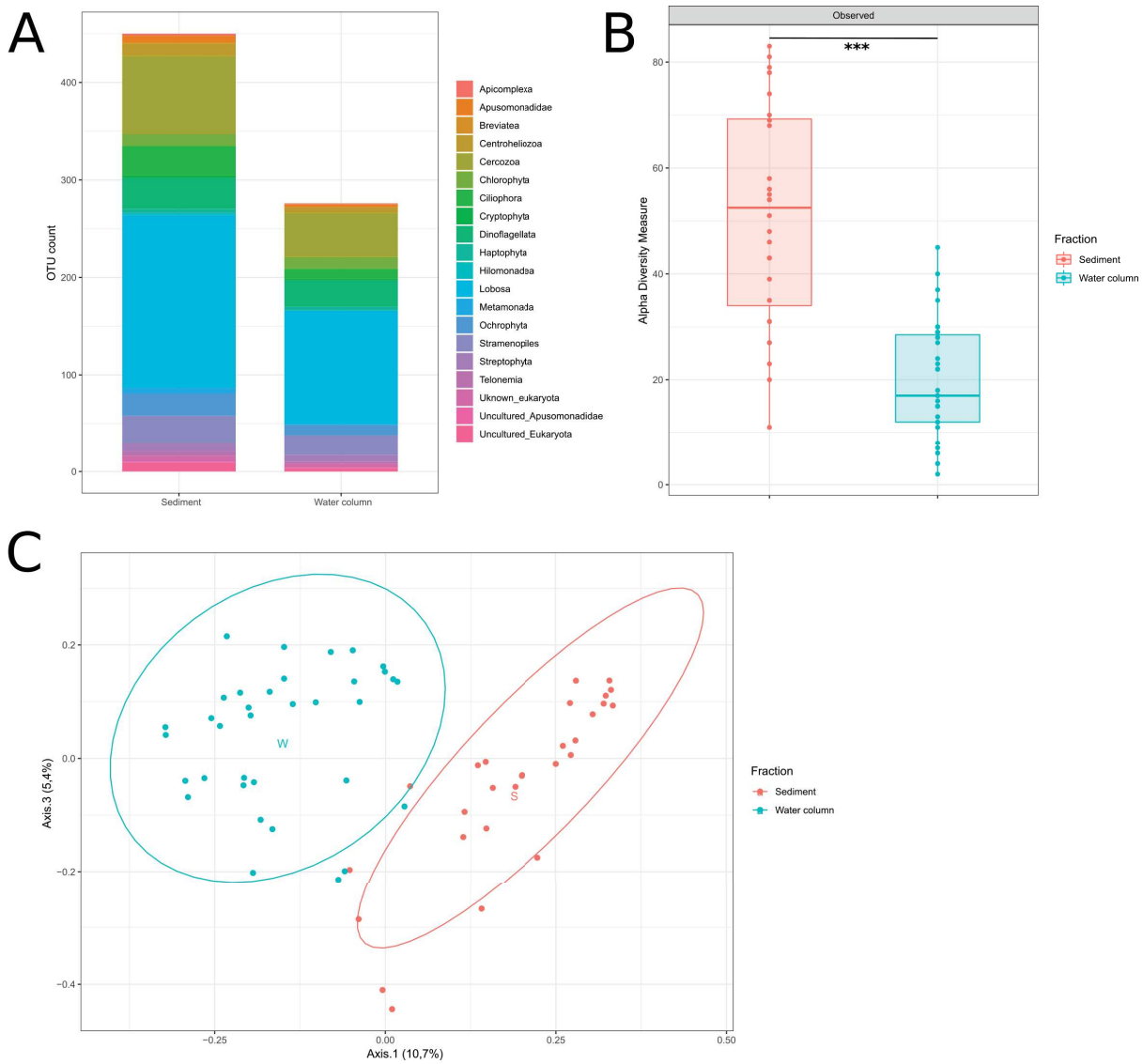


Figure 1. Sediment protist diversity is higher and different than protist diversity of the water column. (A) Phylum level composition per fraction (sediment and water-column). **(B)** Alpha diversity (Observed) comparison between samples from the 2 fractions on *E. coli* SBS363 lawn based on V4 loop on 18S rDNA. **(C)** Principal coordinate analysis of Unifrac dissimilarities between all pairs of samples (colored by fraction). Axes 1 and 3 represent the two synthetic variables explaining the better variation of the dataset.

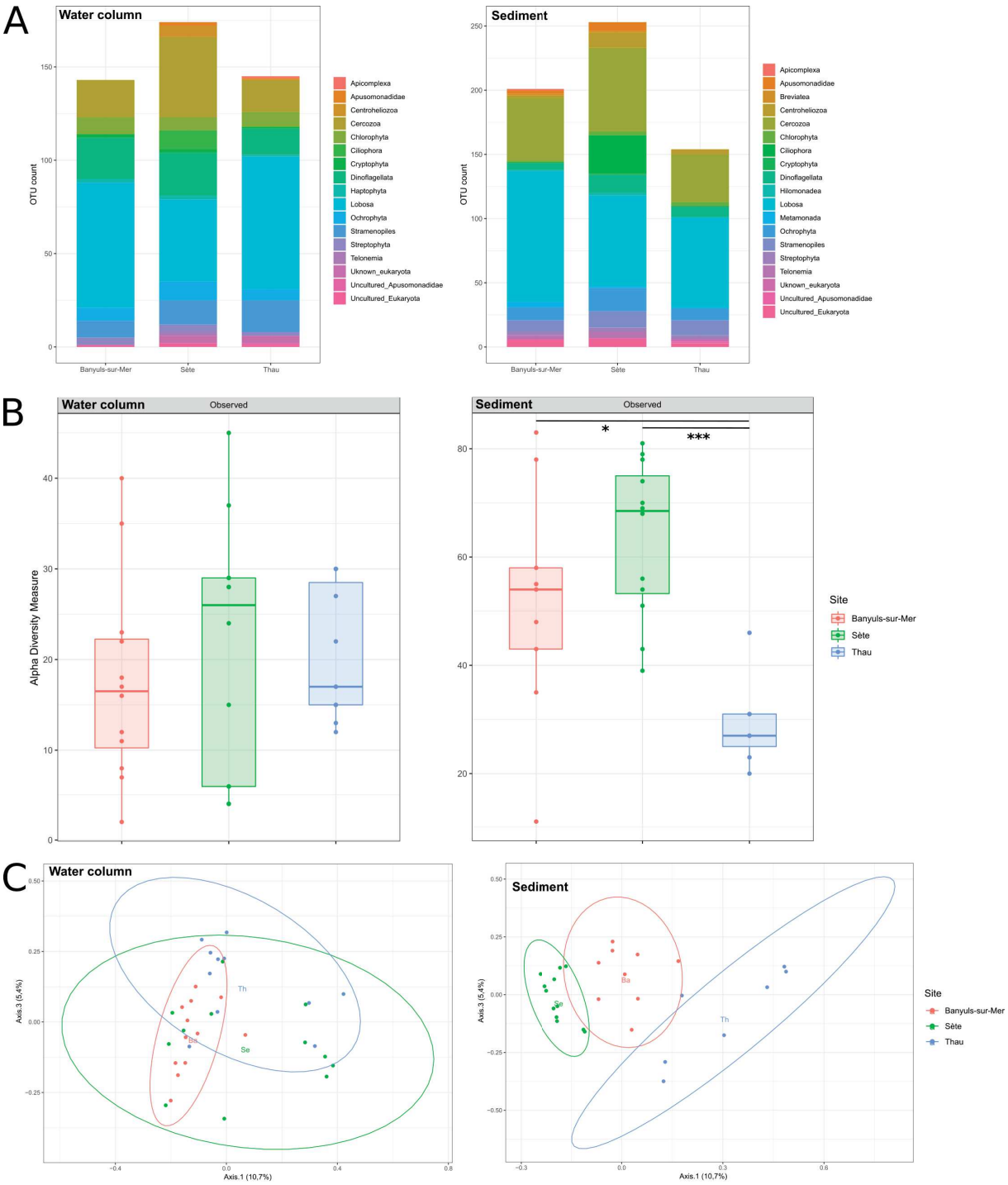


Figure 2. Sediment protist diversity is different and stable between Sète, Banyuls-sur-Mer and Thau but not water column protist diversity. (A) Phylum level composition per site for each fraction (Sète, Banyuls-sur-Mer and Thau). **(B)** Alpha diversity (Observed) comparison between sites for each fraction based on V4 loop on 18S rDNA. **(C)** Principal coordinate analysis of Unifrac dissimilarities between all pairs of samples (colored by site). Axes 1 and 3 represent the two synthetic variables explaining the better variation of the dataset.

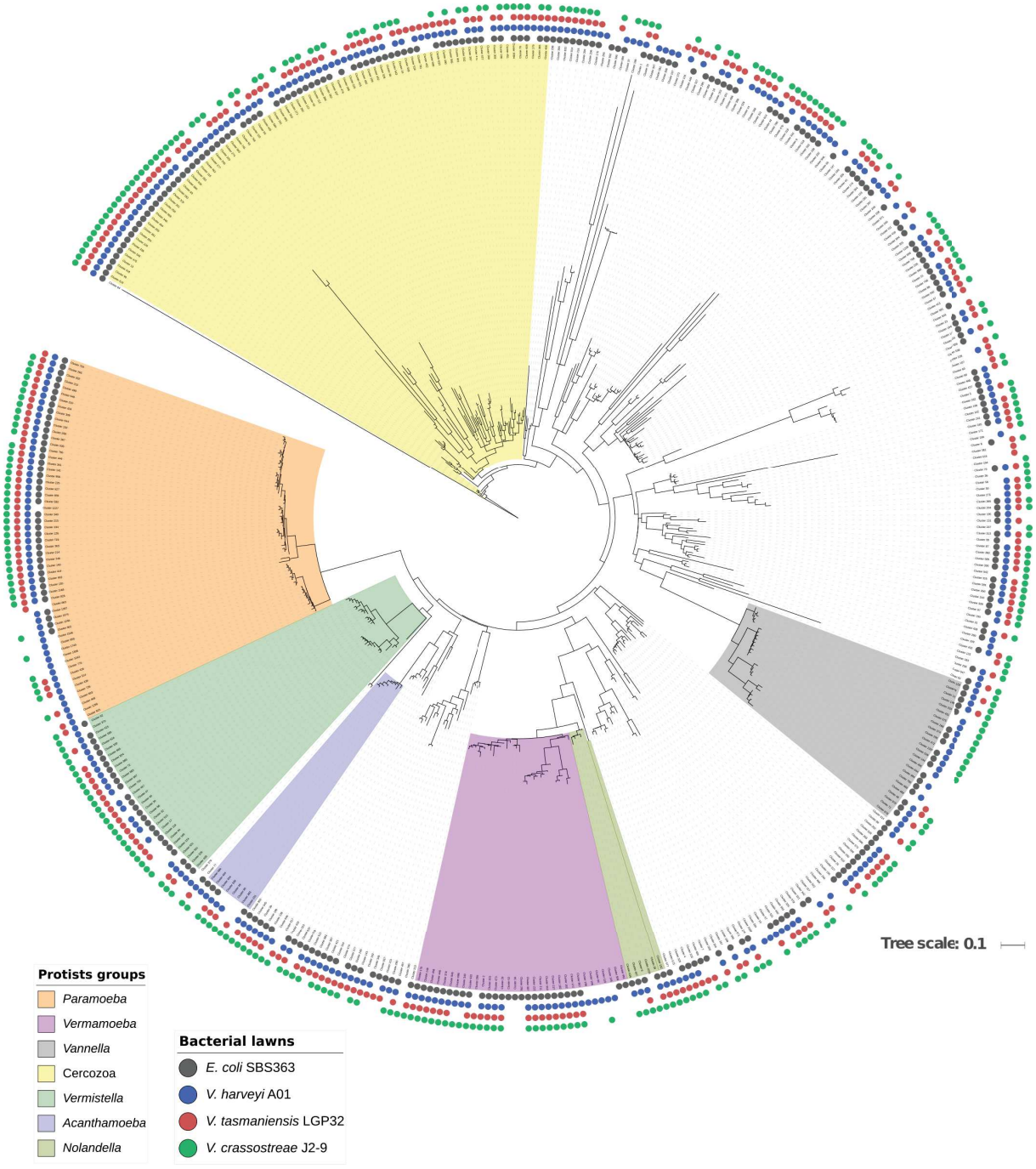


Figure 3. Phylogenetic tree of total cultivable protist diversity. Phylogenetic 18S rDNA-based tree was constructed with maximum-likelihood method using FROGS pipeline with all OTUs identified on E. coli SBS363 lawn during one year sampling. Protists groups of interest was colored inside tree (orange: *Paramoeba*, purple: *Vermamoeba*, grey: *Vannella*, yellow: *Cercozoa*, green: *Vermistella*, blue: *Acanthamoeba* and khaki: *Nolandella*). Colored circles outside the tree indicate the nutritive lawn on which an OTU were identified (grey: *E. coli* SBS363, blue: *V. harveyi* A01, red: *V. tasmaniensis* LGP32, green: *V. crassostreae* J2-9).

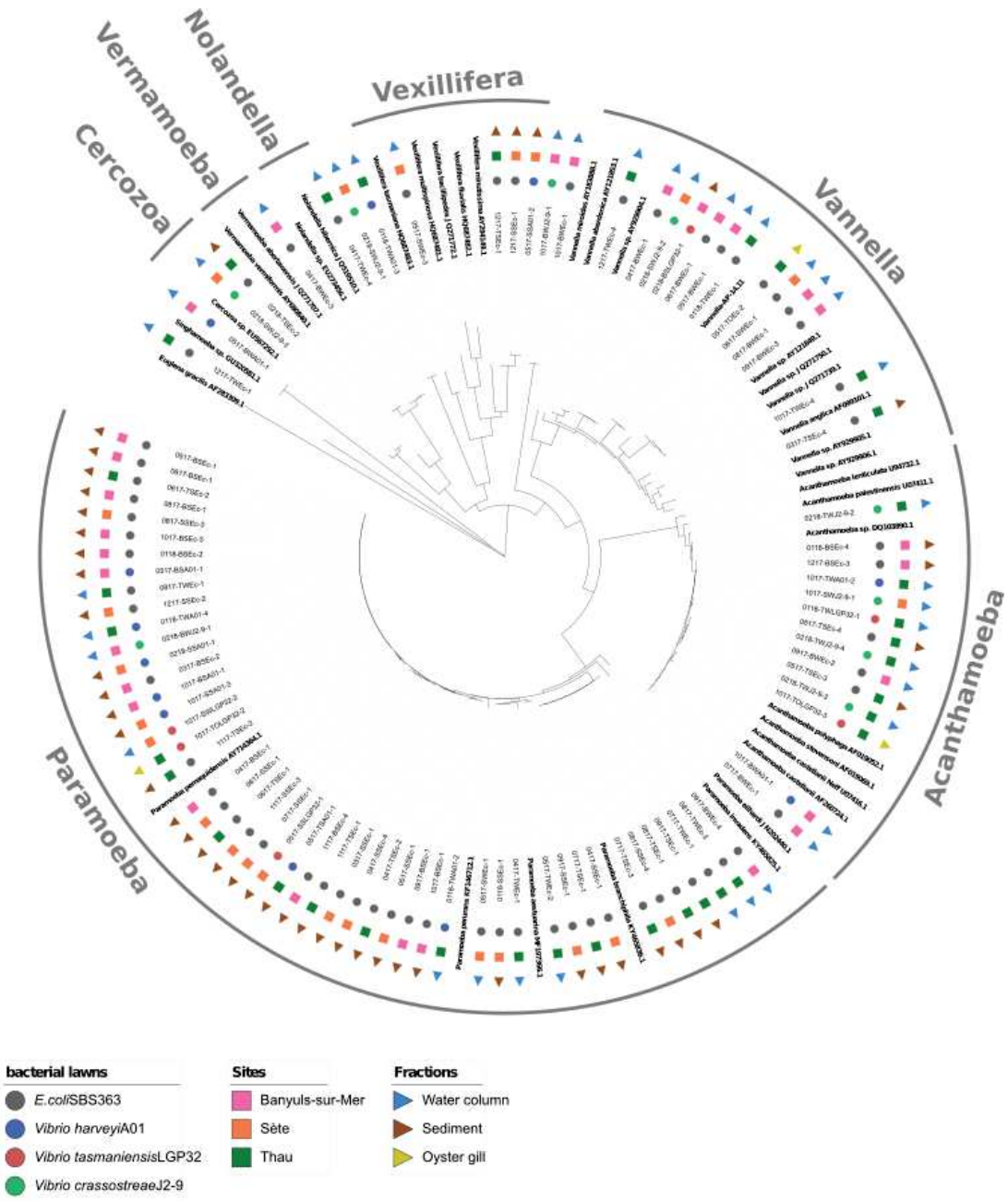


Figure 4. Phylogenetic tree of amoebae clones isolated during this study. Phylogenetic 18S rDNA-based tree was constructed with neighbor-joining method by bootstrap method (1000 replications). Reference sequences are in blod. Colored circles tree indicates the nutritive lawn on which amoebae clones were isolated. Colored squares indicate isolation sites and colored triangle indicate isolation fractions.

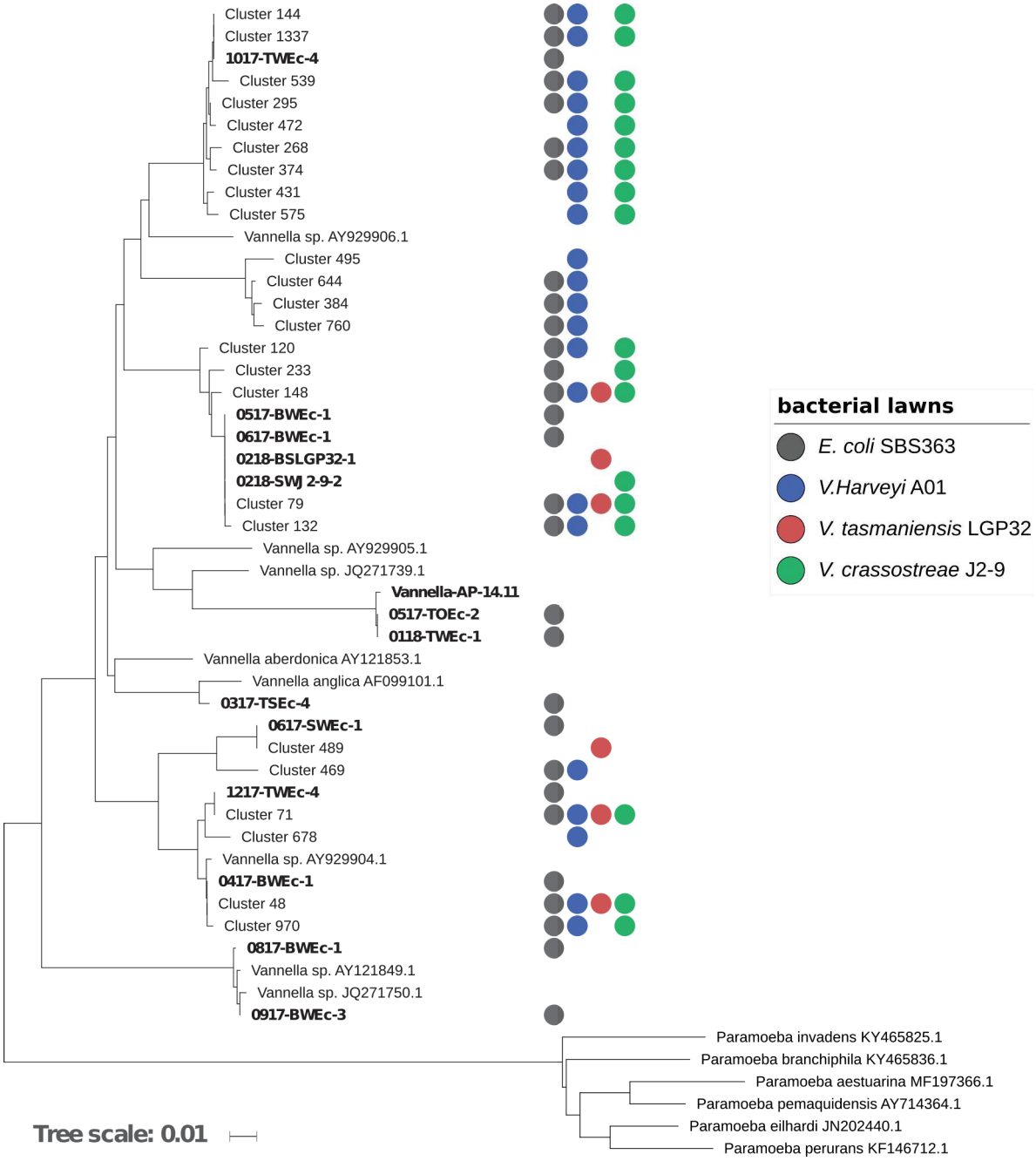


Figure 5. Phylogenetic tree of *Vannella* clones and OTUs identified during this study. Phylogenetic 18S rDNA-based tree was constructed with neighbor-joining method by bootstrap method (1000 replications). Colored circles indicate the nutritive lawn on which amoebae clones were isolated or OTUs were identified. Amoebae clones are in bold.

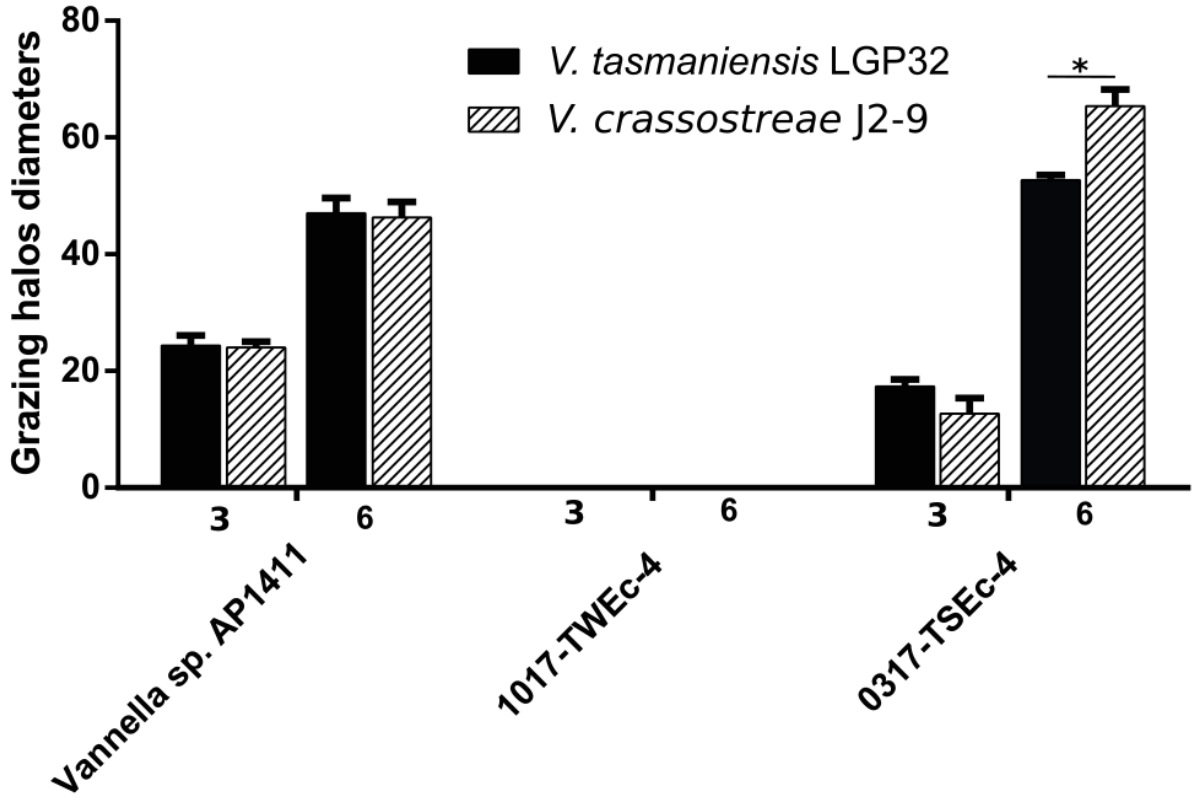


Figure 6. Various *Vannella* strains show different susceptibilities in co-culture with strains LGP32 and J2-9. Grazing assays were performed with *Vannella* sp. AP1411 and the two clones 1017-TWEc-4 and 0317-TSEc-4 isolated in this study. Grazings halos diameters were measured at day 3 and 6 of co-culture. Each condition was performed in technical triplicates and the results shown the result of one experiment. Error bars represent the standard error of the mean (± SEM). Statistical analysis was performed using Two way-Anova.

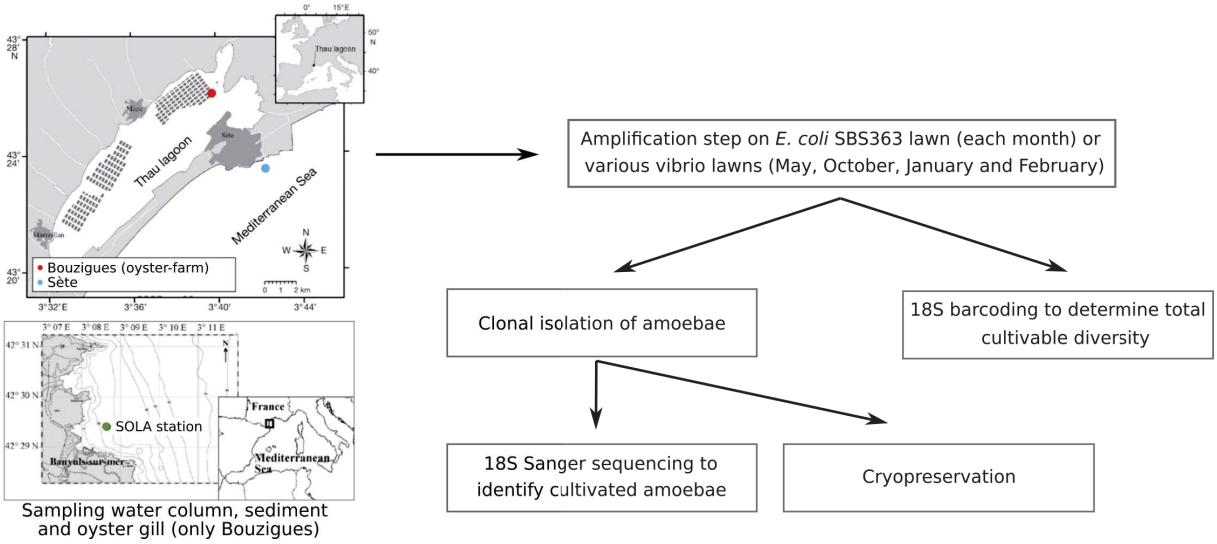


Figure S1. Simplified diagram of the sampling method. Briefly, Water column, sediment were sampled monthly during one year at Sète, Banyuls-sur-Mer and Thau lagoon. Oyster gill was sampled only at Thau lagoon, close to Bouzigues oyster farming area. Isolation and amplification were conducted with *E. coli* SBS363 as permissive nutritive food during all sampling. Isolation were performed during 4 months (May, October, January and February) with pathogenic oyster vibrios *V. tasmaniensis* LGP32, *V. crassostreae* J2-9 and *V. harveyi* A01.On the one hand, we defined total cultivable diversity of protists by 18S barcoding and on the other side, we clonally isolated amoebae then identified by Sanger sequencing on V4 loop hypervariable region of 18S rDNA. In addition, a part of amoebae clones were cryopreserved.

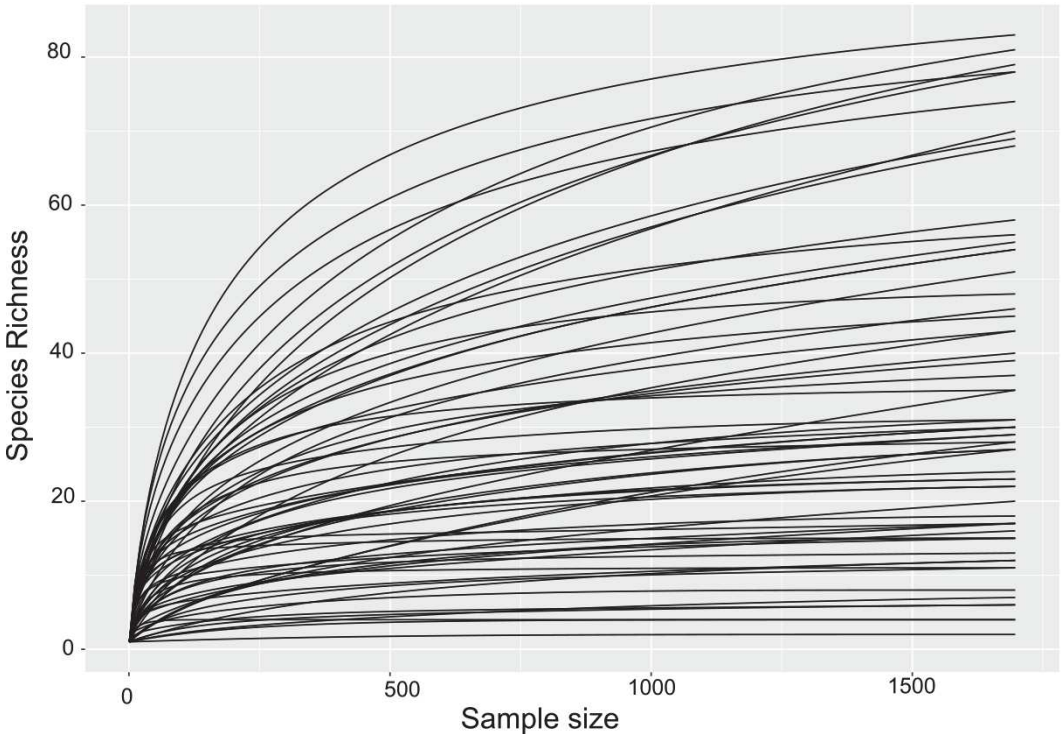


Figure S2. Rarefaction curves for samples from *E.coli* SBS363 lawn during one year.

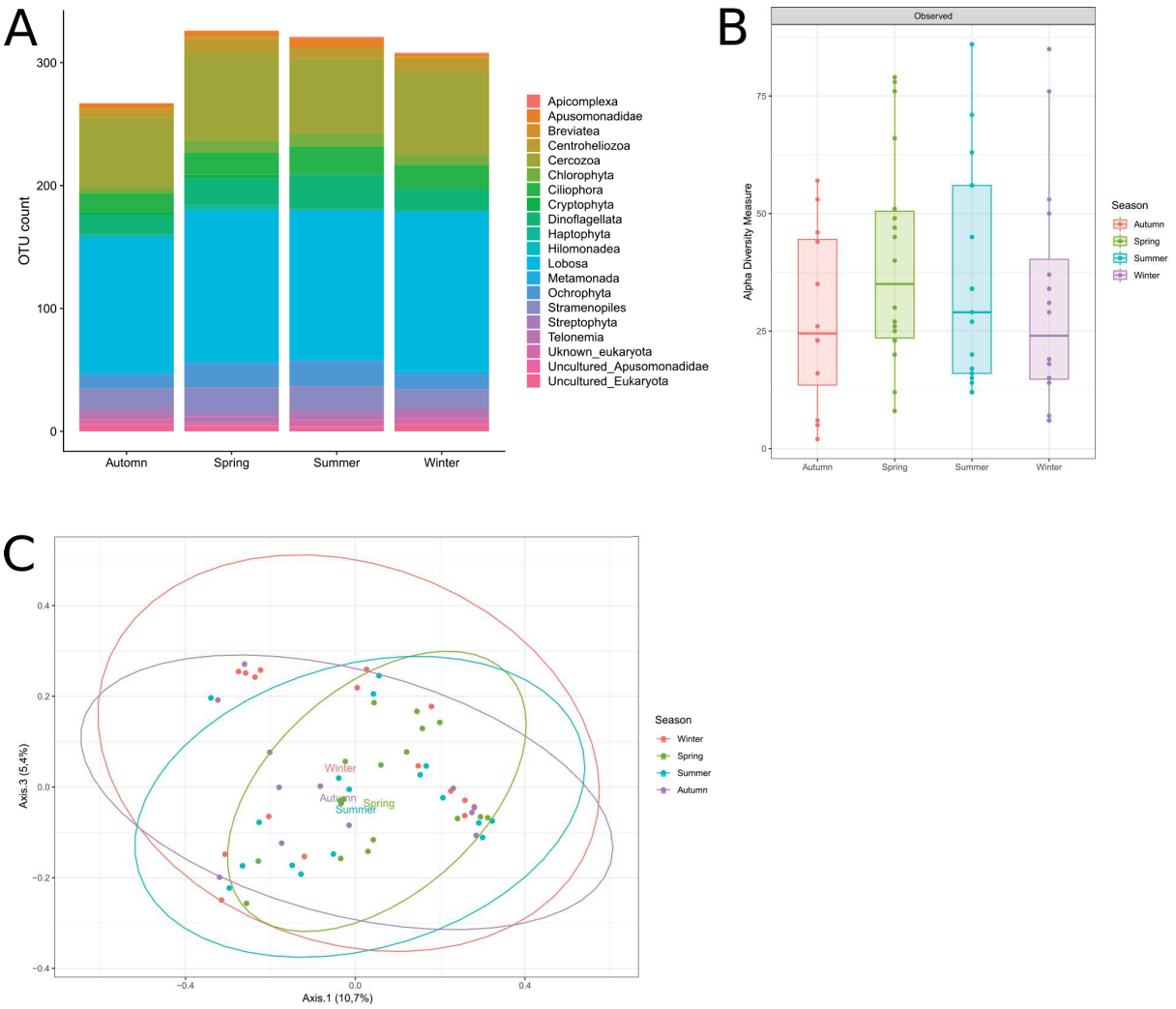


Figure S3. Absence of seasonal effect on protist diversity. (A) Phylum level composition per season within. **(B)** Alpha diversity (Observed) comparison between samples from the 4 seasons on *E. coli* SBS363 lawn based on V4 loop on 18S rDNA. **(C)** Principal coordinate analysis of Unifrac dissimilarities between all pairs of samples (colored by seasons). Axes 1 and 3 represent the two synthetic variables explaining the better variation of the dataset.

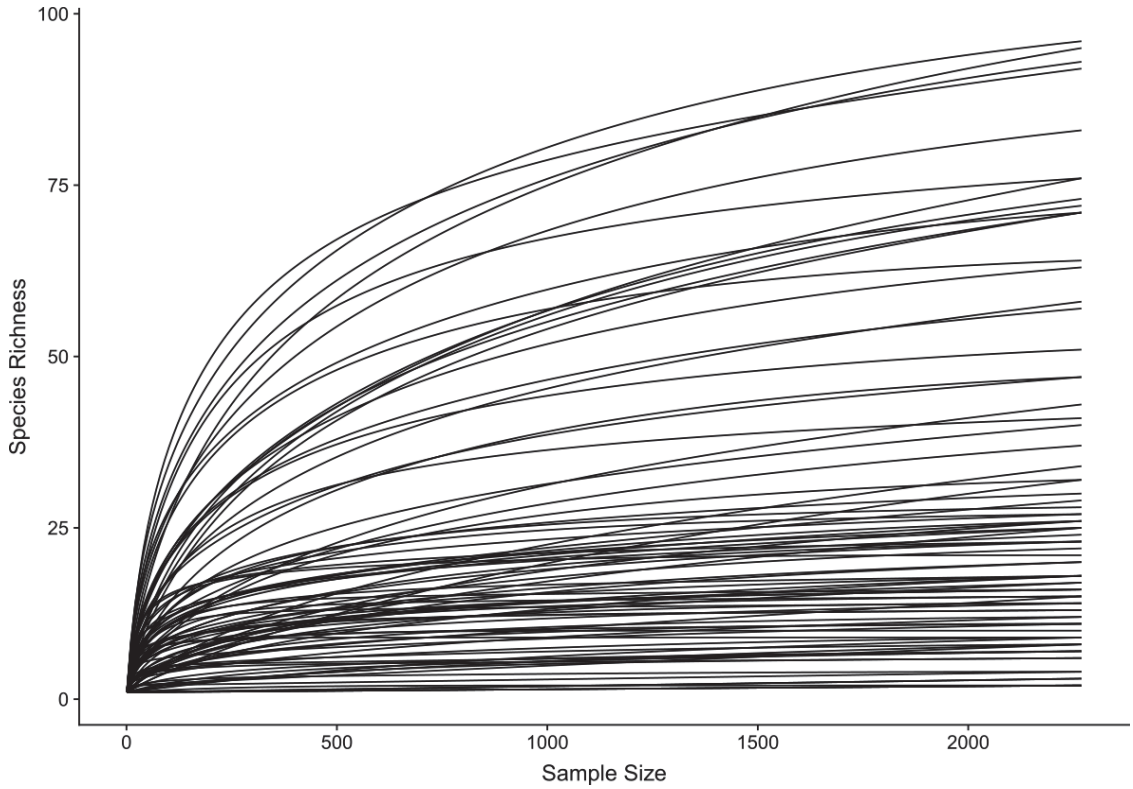


Figure S4. Rarefaction curves for samples from *E. coli* SBS363, *V. tamaniensis* LGP32, *V. crassostreae* J2-9 and *V. harveyi* A01 lawns during May, October, January and February.

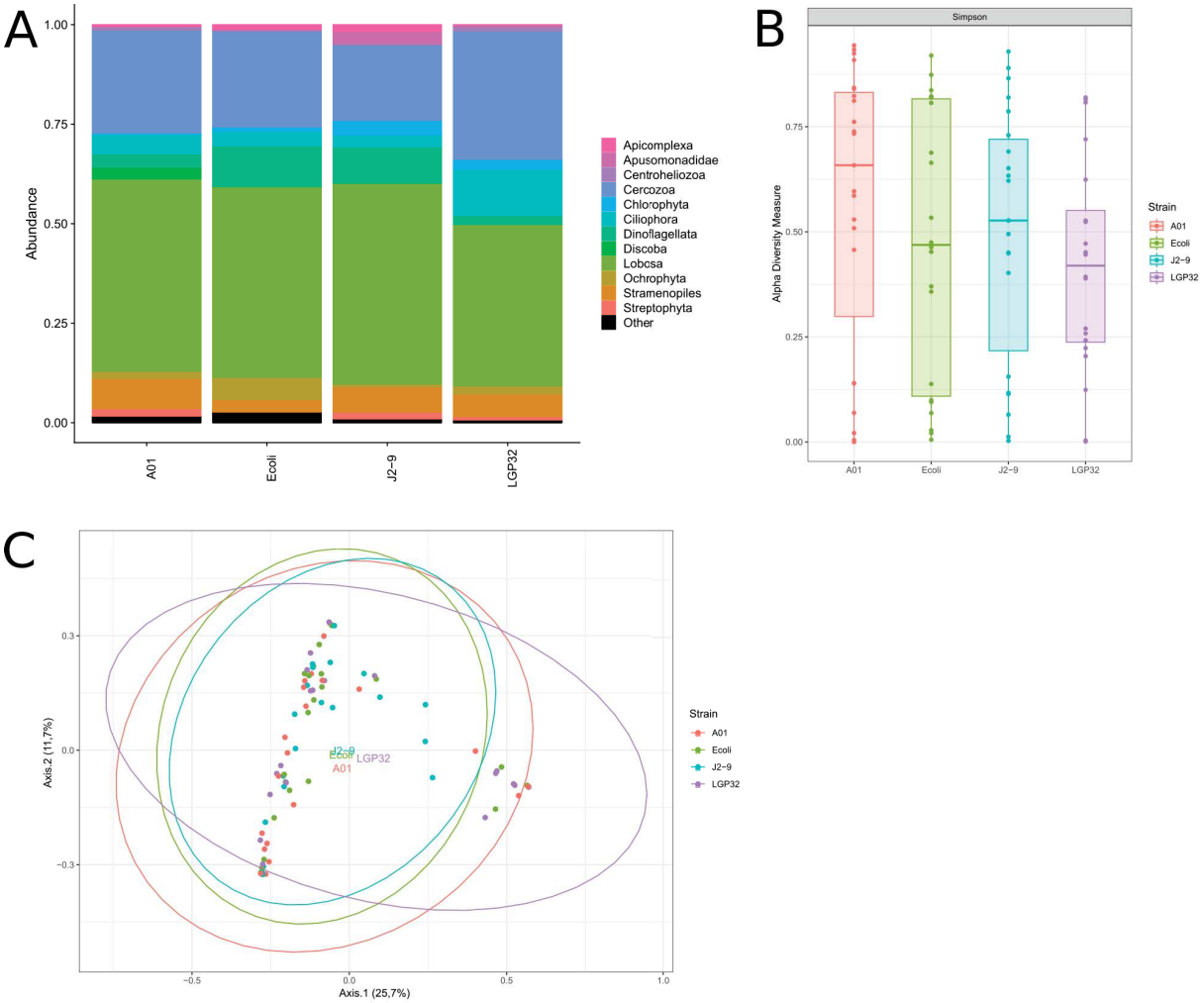


Figure S5. Absence of global strains effect on protist diversity. (A) Phylum level composition per strain (May, October, January and February samples). **(B)** Alpha diversity (Simpson) comparison between samples from the 4 strains based on V4 loop on 18S rDNA. (C) Principal coordinate analysis of Weighted Unifrac dissimilarities between all pairs of samples (colored by strain). Axes 1 and 2 represent the two synthetic variables explaining the better variation of the dataset.

<u>Contributions des auteurs:</u>

-ER : Echantillonnage, Extraction ADN, PCR 18S, séquençage sanger 18S, barcoding 18S, co-cultures, traitement des données, écriture.
-AP : Extraction ADN, PCR 18S, séquençage sanger 18S, barcoding 18S.
-LI: Echantillonnage.
-YG: Traitement des données.
-JCA : Traitement des données.
-MR: Echantillonnage.
-PL: Echantillonnage.
-DDG : Porteuse du projet, écriture.
-GMC : Porteur du projet, échantillonnage, traitement des données, écriture.

Synthèse des résultats

Afin de répondre aux questions posées lors de cette deuxième étude nous avons développé une approche globale grâce à un échantillonnage alliant des approches de microbiologie environnementale par l'isolement clonal d'amibes ainsi que de biologie moléculaire par suivi de la diversité des protistes par diverses méthodes de séquençage.

(i) Est-ce que la faible diversité amibienne observée en zone ostréicole dans la lagune de Thau est propre à cet environnement fortement anthropisé ?

Lors de notre précédente campagne d'échantillonnage au sein de la lagune de Thau au niveau des tables ostréicoles de Bouzigues, nous avons mis en évidence une faible diversité amibienne avec principalement la présence d'amibes appartenant au genre *Vannella* (Robino et *al.*, 2019). Ainsi, nous nous sommes demandé si cette faible diversité observée est caractéristique de ce milieu fortement anthropisé par l'élevage d'huître. La diversité amibienne en méditerranée étant peu connue, pour répondre à cette question, nous avons réalisé un nouvel échantillonnage mensuel pendant une année de 2017 à 2018, au niveau de 3 sites contrastés. Nous avons choisi d'échantillonner au niveau des tables de d'huître de Bouzigues dans la lagune de Thau, en mer ouverte à la sortie du port de Sète qui est un environnement modérément anthropisé et en mer ouverte à Banyuls-sur-mer dans un environnement peu anthropisé car proche d'une réserve marine protégée. Nous avons échantillonné sur les 3 sites le sédiment et la colonne d'eau ainsi que des branchies d'huîtres uniquement au point Bouzigues. Les échantillons prélevés ont été déposés sur un milieu eau de mer agar recouvert d'un tapis d'*E. coli* SBS363 comme source nutritive permissive afin de favoriser la croissance des amibes qui se nourrissent de celles-ci. Nous avons pu isoler des amibes de façon clonale que nous avons identifié par séquençage Sanger de la boucle V4 de l'ADNr 18S et également déterminer la diversité cultivable totale des protistes par barcoding 18S la encore en ciblant la boucle V4 de l'ADNr 18S.

Par ces deux approches nous avons mis en évidence une diversité amibienne supérieure à celle observé précédemment. En effet nous avons notamment identifié des amibes appartenant aux genres *Vannella, Paramoeba, Acanthamoeba, Vermamoeba, Nolandella et Vexillifera* ainsi que divers représentants appartenant au phylum des Cercozoa. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque les genres *Vannella*, *Paramoeba* et *Acanthamoeba* sont largement présent dans les environnements aquatiques (Samba-Louaka et *al.*, 2019 ; Page, 1973). La différence de diversité observée par rapport au premier échantillonnage peut s'expliquer par le fait que la méthode d'échantillonnage n'était pas la même, étant sans a priori en 2017-2018.

Ensuite nous avons étudié la distribution et la dynamique des protistes cultivables grâce au barcoding 18S au sein des différentes fractions et différents sites au cours de l'année d'échantillonnage. Les résultats ont montré une plus grande diversité au sein du sédiment que de la colonne d'eau avec des communautés de protistes différentes entre les deux fractions mis en évidence grâce à des analyses en coordonnées principales (PCoA). Nous avons tout de même mis en évidence que la diversité est plus faible dans la lagune de Thau au niveau des tables ostréicoles de Bouzigues qu'aux deux autres sites échantillonnés. De plus, les communautés de protistes sont différentes dans le sédiment entre les 3 sites échantillonnés mais pas dans la colonne d'eau. Ces résultats suggèrent que la structuration des communautés de protistes est plus stable dans le sédiment que dans la colonne d'eau et que la diversité est différente en fonction de la zone géographique. La diversité observée dans la lagune de Thau reste faible par rapport aux deux autres sites, et pourrait être expliqué par la forte anthropisation due à l'activité ostréicole. Pour finir, nous n'avons pas observé d'effet saisonnier sur la distribution des protistes quelque soit la fraction ou le site échantillonné.

(ii) Existe-t-il des différences entre les protistes hétérotrophes dans leur capacité à utiliser différents vibrios pathogènes comme source nutritive ?

Les protistes hétérotrophes comprenant les amibes se nourrissent de divers micro-organismes, comme les bactéries, présents dans les mêmes environnements. Ainsi la prédation par les protistes façonne les communautés bactériennes (Pernthaler, 2005). Réciproquement, divers micro-organismes peuvent également modifier les communautés de protistes (Guillou *et al.*, 2001; Amaro *et al.*, 2015). En effet, due à la longue histoire co-évolutive entre les protistes et les micro-organismes qu'elles prédatent, certains d'entre eux ont acquis des mécanismes de défenses intracellulaire et extracellulaire leurs permettant de résister à la prédation par les protistes (Matz et Kjelleberg, 2005). Lors de notre précédente étude, nous avons montré que la bactérie pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32 qui est capable de résister à la phagocytose par les hémocytes d'huîtres, est également capable de résister à la prédation par l'amibes *Vannella* sp. AP1411. D'autres espèces de vibrios ont été identifiés lors des épisodes de mortalité d'huîtres comme les espèces *V. crassostreae* et *V. harveyi* (Lemire et *al.*, 2015 ; Lagorce et *al.*, in prep). Bien que les mécanismes de virulence chez l'espèce *V. harveyi* n'ait pas encore été décrits, chez les espèces *V. crassostreae* et *V. tasmaniensis*, ceux mis en jeux chez les hémocytes d'huîtres sont différents (Rubio et *al.*, 2019). Nous nous sommes donc demandé si différentes sources nutritives non virulente ou virulentes, avec des modalités de virulence différentes pour les dernières, pouvait sélectionner différents protistes hétéroptrophes. Pour répondre à cette question, lors de notre échantillonnage, pendant 4 mois (Mai, Octobre, Janvier et Février) nous avons utilisé 4 souches bactériennes différentes comme source nutritive lors de l'isolement des protistes. Ainsi nous avons utilisé *E. coli* SBS363 comme source nutritive permissive et

les 3 vibrios pathogènes d'huîtres *V. tasmaniensis* LGP32, *V. crassostreae* J2-9 et *V. harveyi* A01. Bien que la diversité des protistes identifiée était plus faible en présence des 3 souches de vibrios comme source nutritive, nous n'avons pas pu déterminer d'effet significatif par une approche globale comme réalisée précédemment. La construction d'un arbre phylogénétique de l'ensemble des OTUs identifiés par Barcoding 18S nous a permis une étude plus fine de l'effet de la source nutritive. En effet, nous avons mis en évidence des susceptibilités différentes des genres amibiens identifiés en fonction de la source nutritive. Ainsi les protistes affiliés au phylum des Cercozoa et au genre *Vermistella* sont capables de se développer sur l'ensemble des tapis bactériens. En revanche, certains genres amibiens possèdent différentes sous-populations qui se développent sur des tapis bactériens différents. Le genre *Paramoeba* possède 3 clades différents dont un qui comprend des amibes capables de croître sur les 4 tapis bactériens, un autre comprenant des amibes capables de croître majoritairement sur tapis bactérien *V. harveyi* et un dernier comprenant des amibes se développant uniquement sur les 3 souches de vibrios avec l'ensemble de ces amibes ayant poussées sur tapis nutritif *V. harveyi* A01. Le genre *Vermamoeba* possède deux populations spécifiques ainsi qu'un ensemble d'OTUs ne montrant pas d'effet clair du tapis nutritif. Un premier clade n'a été trouvé qu'en présence d'*E.coli* SBS363 comme source nutritive tandis que le second n'a été trouvé qu'en présence de *V. harveyi* A01 avec un OTU également identifié sur tapis nutritif J2-9. Enfin, le genre *Vannella* montre une sensibilité plus importante vis-à-vis de la souche LGP32 que les 3 autres types de bactéries. Ceci n'est pas sans rappeler les résultats de notre précédente étude mettant en évidence une sensibilité de l'amibe *Vannella* sp. AP1411 à la bactérie V. *tasmaniensis* LGP32. Nous avons donc décidé de poursuivre notre étude en nous focalisant sur le genre *Vannella* qui montre une susceptibilité importante vis-à-vis de LGP32 mais moindre aux autres vibrios comme J2-9 qui possède des modalités de virulence différentes de LGP32. Ainsi pour confirmer les résultats observés par barcoding 18S, nous avons mené une étude fonctionnelle en réalisant des expériences de co-cultures entre différents clones d'amibes appartenant au genre *Vannella* et les bactéries utilisées lors de l'échantillonnage. Pour choisir nos amibes, nous avons identifié les clones d'amibes isolés lors de cette étude par séquençage Sanger de la boucle V4 de l'ADNr 18S. Ainsi les clones 1017-TWEc-4 et 0317-TSEc-4 appartenant au genre *Vannella* ainsi que l'amibe *Vannella* sp. AP1411 étant dans des groupes phylogénétiques distincts ont été choisi pour mener les expériences de co-cultures. Nous avons pu mettre en évidence que les 3 souches amibienne possèdent des sensibilités différentes aux vibrios LGP32 et J2-9 et qu'un isolat amibien montre une sensibilité différente entre les deux souches bactériennes. En effet l'amibe *Vannella* sp. AP1411 est capable de croître de la même manière en présence des deux vibrios LGP32 et J2-9 tandis que le clone 1017-TWEc-4 est incapable de croître en présences des deux bactéries. En revanche le clone 0317-TSEc-4 a montré une meilleure capacité de croissance en présence de J2-9 qu'avec LGP32 après 6 jours de co-culture.

En conclusion, cette étude a mis en évidence que la diversité des protistes hétérotrophes est plus importante dans le sédiment que dans l'eau de mer et que les communautés dans les sédiments sont différentes entre les 3 sites contrastés échantillonnés et stables. De plus, la diversité des protistes hétérotrophes du sédiment de la lagune de Thau au niveau des tables ostréicoles de Bouzigues est inférieure à la diversité des protistes du sédiment des deux autres sites. Nous avons émis l'hypothèse que cette faible diversité observée est potentiellement due au fait que cet environnement est fortement anthropisé par rapport aux deux autres environnements échantillonnés. De plus nous n'avons pas observé d'effet saisonnier influençant les communautés de protistes quelque soit le site ou la fraction échantillonné. Nous avons également mis en évidence que des sources nutritives variés peuvent influencer de façon différentes les communautés de protistes. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent qu'il existe des protistes que l'on pourrait considérer comme des généralistes capables de croître sur divers tapis bactériens comme les Cercozoa ou les amibes du genre *Vermistella tandis* que d'autres genres amibiens comme *Vermamoeba* et *Paramoeba* possèdent des sous populations ayant des susceptibilités différentes en fonction de la source nutritive suggérant des interactions plus spécifiques. De plus, nous avons mis en évidence que la majorité des amibes appartenant au genre *Vannella* n'ont pas été identifiées après culture en présence de LGP32 mais en présence d'autres souches bactériennes, notamment J2-9, ce qui suggère que le vibrio LGP32 possèdent des capacités de résistance supérieures vis-à-vis de l'ensemble des amibes du genre *Vannella*. Par des tests fonctionnels de divers souches d'amibes appartenant au genre *Vannella* en co-culture avec les vibrios LGP32 et J2-9 nous avons pu vérifier ces différences. Les résultats obtenus tendent à soutenir l'hypothèse selon laquelle les facteurs de virulence n'ont pas la même importance chez différents hôtes. En effet les 3 amibes appartenant au genre *Vannella* ont montré des sensibilités différentes aux vibrios. De plus, LGP32 a montré une meilleure capacité de résistance au grazing que J2-9 en co-culture avec l'amibe 0317-TSEc-4 suggérant que les mécanismes de virulence mis en jeux des deux souches sont différents et que ceux de la bactérie LGP32 sont plus efficaces ou « adaptés » lors de cette interaction. Ceci suggère encore un peu plus le fait que différentes souches bactériennes peuvent influencer de façons différentes l'assemblage des communautés de protistes.

En perspective, d'autres expérimentations de co-culture doivent encore être menées afin de confirmer ces premières observations car ici nous présentons le résultat d'une seule expérimentation. Ainsi, il est prévu de faire les mêmes expériences avec plus de représentants amibiens appartenant au genre *Vannella*. De plus dans ces nouvelles expérimentations, afin d'avoir un niveau d'information plus complet, les 4 souches bactériennes seront utilisées en co-cultures. Nous étendrons également nos essais fonctionnels à d'autres genres amibiens comme le genre *Vermamoeba* avec deux sous population intéressantes dont une capable de croître uniquement sur *E. coli* SBS363 ainsi que le

genre *Paramoeba* qui montre également des sous-populations phylogénétiques et qui est le genre le plus fortement représenté dans notre campagne d'échantillonnage. En parallèle, nous utiliserons également des amibes appartenant au genre *Vermistella* ou au phylum des Cercozoa afin de confirmer le caractère plutôt généraliste de ces protistes. En fonction des résultats obtenus, il sera peut-être nécessaire de réaliser des observations microscopiques afin d'avoir une idée plus fine des modalités d'interactions.

Données complémentaires

Identification des bactéries associées aux amibes de l'environnement méditerranéen

Certaines bactéries ont acquis la capacité de résister à la prédation par les amibes grâce à divers mécanismes de défenses intracellulaire et extracellulaire (Matz et Kjelleberg, 2005). Ces bactéries nommées ARB pour Amoebae Resistant Bacteria interagissent de façon transitoire avec les amibes. Cependant, d'autres bactéries nommées symbiontes entretiennent des relations étroites et durables avec des hôtes amibiens (Horn et *al.*, 1999 ; Horn et *al.*, 2000). Cette diversité a été bien décrite chez les amibes d'eau douce et du sol mais très peu chez les amibes marines. Récemment, les deux endosymbiontes *Candidatus Occultobacter Vannellae* et *Candidatus Nucleophilum amoebae* ont été identifié respectivement chez les amibes *Vannella* sp. A1 et JAMX8 (Amoebozoa). Ces deux endosymbiontes appartiennent aux Gammaprotéobactéries dans une lignée proche des *Coxiellaceae* (Schulz et *al.*, 2015).

Nous nous sommes donc interrogés à la diversité des symbiontes d'amibes marines encore méconnue à ce jour. Ainsi, une étude complémentaire en collaboration avec Olivier Duron (MIVEGEC, Montpellier) s'est adossée au projet VIBRAM présenté précédemment dans lequel un échantillonnage en vue d'isoler de façon clonale des amibes a été mené. Cette étude complémentaire a eu pour but d'identifier les bactéries associées aux clones d'amibes isolées lors de l'échantillonnage. Un barcoding 16S de paires appariées ciblant la région V3V4 de l'ADNr bactérien a été réalisé à partir de 93 extractions d'ADN utilisées pour l'identification de clones amibiens isolés. Les PCRs d'amplification ont été réalisées à l'aide des amorces 16S V3V4 Illumina (amorce sens : 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' ; amorce anti-sens : 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). Les conditions d'amplifications ont consisté en une étape de dénaturation initiales de 3 minutes à 98°C, suivi de 35 cycles comprenant une étape de dénaturation de 10 secondes a 98°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 55°C et une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C. Une extension finale de 5 minutes à 72°C a été menée. Le séquençage a été réaliser par la plateforme GenSeq de Montpellier sur un appareil MiSeq Illumina. Les séquences obtenues ont été analysé à l'aide du pipeline FROGS implémenté dans le logiciel Galaxy afin de réaliser une assignation taxonomique des différents OTUs identifiés (Escudié *et al.*, 2018). Brièvement, les séquences sens et anti-sens ont été fusionnées à l'aide de l'outils FLASH (Magoč and Salzberg, 2011). Les séquences des amorces ont été retirées grace à l'outils cutadapt (Martin, 2011) suivi par le partitionnement des amplicons en OTUs via l'algorithme SWARM avec une distance d'aggrégation égale à 3 (Mahé *et al.*, 2014). Les séquences chimériques ont été éliminées à l'aide de l'outils VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016).

Les amibes étant cultivées en eau de mer supplémentée en *E. coli* SBS363 comme source nutritive, la majeure partie des séquences identifiées étaient affiliées à l'espèce *Escherichia coli*. Cependant d'autres séquences étaient affiliées aux familles *Flavobacteriaceae, Chlamydiaceae, Vibrionaceae, Legionellaceae, Rickettsiaceae* ainsi qu'à d'autres mais dans des proportions extrêmement faibles (Figure 32). Bien que nous ayons identifié une majorité de séquences appartenant à la famille des *Flavobacteriaceae* (77%) et quelles sont retrouvées dans un grand nombre d'échantillons, les bactéries appartenant à cette famille sont peu connues pour adopter des stades de vie intracellulaire. Nous avons donc déduit que les bactéries de cette famille étaient présentes initialement dans nos échantillons et qu'elles ont sans doute été conservées durant toutes les étapes d'isolement des amibes dans l'environnement extracellulaire. Ainsi les bactéries de cette famille ne sont probablement pas des symbiontes de nos clones amibiens. En revanche les autres familles identifiées comportent des représentants connus pour adopter un stade de vie intracellulaire. En effet, les familles *Rickettsiaceae* et *Chlamydiaceae* comporte des espèces intracellulaires strictes tandis que les familles *Vibrionaceae* et *Legionellaceae* comporte des espèces capables d'adopter des stades intracellulaires plutôt de façon transitoire. Du fait de la méthode d'isolement des amibes qui a impliqué une culture de plus de 1 mois et demi en milieu contrôlé sous antibiotiques pour limiter la prolifération excessive des bactéries extracellulaires suggère que la relation entre les représentants des ces 4 familles et les clones amibiens est étroite et relativement stable. Il est également intéressant de souligner qu'il semble y avoir une certaine spécificité d'association. En effet, les séquences affiliées à la famille des *Chlamyiaceae* sont principalement associées aux *Paramoebae* isolées de Banyuls-sur-Mer tandis que les séquences affiliées à la famille de *Vibrionaceae* sont principalement associées aux *Vannella*. De plus, les *Vannella* associées à des séquences de *Vibrionaceae* ont été isolées à partir de branchies d'huîtres de la lagune de Thau au mois de Mai. Or, le mois de mai correspond à un mois durant lequel a eu lieu un épisode de surmortalité des huîtres, période pendant laquelle une grande quantité de vibrios est présente dans les huîtres. En raison de la thématique de ma thèse, nous nous sommes donc plutôt intéressés à ces clones sachant qu'à notre connaissance il n'a jamais été décrit d'association stable entre une amibe et un vibrio. Dans un premier temps, nous n'avons pas observé d'effet particulier de ces associations sur la croissance des clones amibiens associés aux *Vibrionaceae*, suggérant que ces relations ne sont pas délétères pour les amibes. Ensuite, nous avons confirmé par hybridation *in situ* en fluorescence la présence de bactéries appartenant à la famille des *Vibrionaceae* dans deux des clones amibiens (article 1, section A).

Suite à ces différents résultats, plusieurs perspectives se sont naturellement présentées à nous. Dans un premier temps, nous allons réaliser un barcoding 16S sur les clones amibiens que nous n'avons pas encore testés. En parallèle, nous réalisons une MLST des *Vibrionaceae* déjà identifiés et confirmés

afin d'avoir une assignation taxonomique plus précise. Enfin, les séquences affiliées aux *Chlamydiaceae, Legionellaceae* et *Rickettsiaceae* seront analysées plus en détails à l'aide de notre collaborateur Olivier Duron.

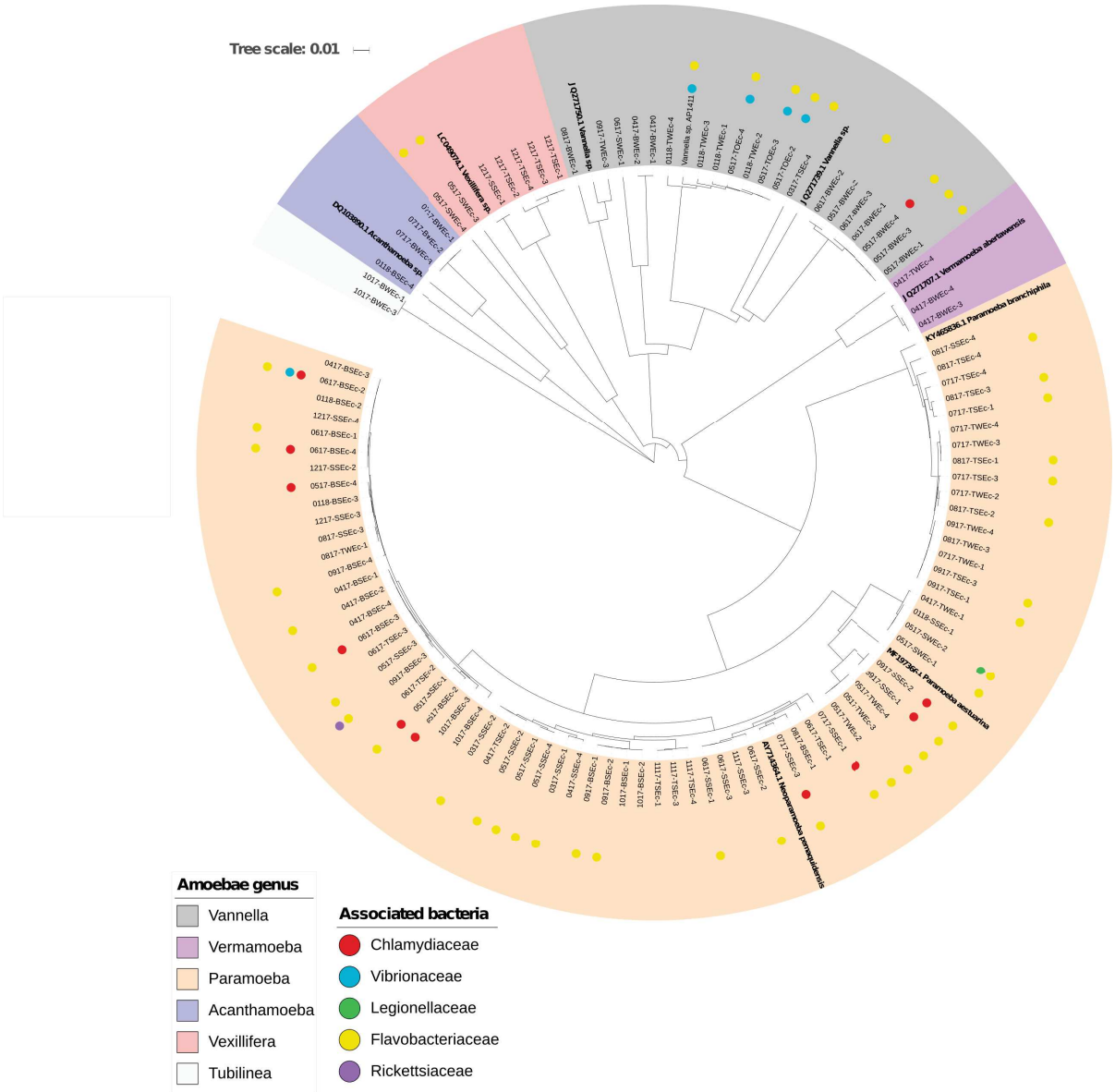


Figure 32. Arbre phylogénétique des clones amibiens en association potentielle ou non avec différentes familles bactériennes. L'arbre phylogénétique des clones amibiens a été généré par méthode Maximum-likelihood et les différentes familles bactériennes identifiées par barcoding 16S pour chaque clone sont indiquées par des cercles de différentes couleurs en fonction des familles (rouge : *Chlamydiaceae*, bleu : *Vibrionaceae*, vert : *Legionellaceae*, jaune : *Flavobacteriaceae*, violet : *Rickettsiaceae*). Les genres amibiens sont eux indiqués par différentes couleurs dans l'arbre. (gris : *Vannella*, violet : *Vermamoeba,* orange : *Paramoeba*, bleu : *Acanthamoeba*, rouge : *Vexillifera*).

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la dynamique des protistes hétérotrophes de l'environnement méditerranéen tels que les amibes, ainsi qu'aux relations trophiques que les amibes entretiennent avec différents vibrios pathogènes d'huître *C. gigas*. Nous avons également étudié leur rôle possible dans l'émergence et la dynamique de ces pathogènes. Concernant les études fonctionnelles, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à *V. tasmaniensis* LGP32 qui est un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître. Les mécanismes cellulaires et moléculaires du processus de phagocytose étant conservés entre des organismes distants, les amibes pourraient jouer le rôle de terrain d'entraînement favoriser l'acquisition et la sélection de traits phénotypiques (potentiels facteurs de virulence) impliqués dans la résistance à la phagocytose chez les cellules immunitaires des métazoaires, induisant diverses pathologies.

1 - Diversité des Protistes en méditerranée

1.1 Impact de la méthode d'échantillonnage et de l'anthropisation

La diversité des amibes marines cultivables présentes dans l'environnement méditerranéen et encore plus celle des lagunes étant peu caractérisée, un premier échantillonnage a été réalisé au sein de notre équipe pendant la thèse d'Aurore Poirier. Lors de cet échantillonnage réalisé durant un an au niveau des tables d'huîtres de Bouzigues dans la lagune de Thau, une faible diversité amibienne a été identifiée avec principalement des amibes appartenant au genre *Vannella* (article 1, section A). Bien que la diversité des amibes marines dans les lagunes était inconnue, nous avons été intrigués par cette observation puisqu'il a été mis en évidence dans des études antérieures que d'autres genres amibiens, comme le genre *Paramoeba*, sont trouvés de façon commune dans l'environnement marin (Page, 1973). Nous nous sommes donc demandé si cette faible diversité était caractéristique de ce milieu fortement anthropisé ou si un biais avait été induit lors de l'isolement des amibes. En effet, une augmentation de l'eutrophisation ou de pollution peut modifier les assemblages des communautés de protistes (Nguyen-Viet *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011). Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une nouvelle campagne d'échantillonnage mensuelle durant 1 an au niveau de 3 sites d'écologie contrastés. Ainsi, nous avons échantillonné une nouvelle fois au niveau des tables d'huîtres de Bouzigues dans la lagune de Thau, en mer ouverte à la sortie du port de Sète qui est un environnement modérément anthropisé et à Banyuls-sur-Mer en mer ouverte

dans un environnement faiblement anthropisé près d'une réserve marine protégée. Grâce à ce nouveau protocole d'échantillonnage plus exhaustif, nous avons mis en évidence une diversité des protistes hétérotrophes présents dans la lagune de Thau supérieure à celle observée lors du premier échantillonnage. Au-delà du genre *Vannella* déjà identifié, nous avons notamment identifié les genres*, Paramoeba, Acanthamoeba, Vermamoeba, Vexillifera, Vermistella, Nolandella* ; des protistes appartenant au phylum de Cercozoa ont également été identifiés (article 2, section B). Cette plus grande diversité a pu être identifiée grâce à des approches sans *a priori*. En effet, lors du premier échantillonnage les clones amibiens ont été repiqués manuellement après observations visuelles alors que pendant le second échantillonnage, nous avons réalisé un barcoding 18S de la diversité cultivable totale ainsi que des isolements de clones amibiens par dilutions limites, deux méthodes sans *a priori*. De plus, la méthode d'isolement du premier échantillonnage impliquait d'attendre que les amibes migrent suffisamment loin de la zone d'inoculation afin de maximiser les chances d'isoler de façon clonale des amibes. Les amibes appartenant au genre *Vannella* migrent particulièrement vite (données de vidéomicroscopie de l'article n°1), il est donc possible qu'elles migrent plus vite que la majorité des autres genres amibiens ce qui pourrait expliquer la faible diversité échantionnée précédemment.

Sur la base d'une plus grande diversité obtenue lors du deuxième échantillonnage, nous avons pu montrer un rôle important de l'environnement sur la diversité amibienne. Ainsi, celle-ci est beaucoup plus faible dans le sédiment de la lagune de Thau que dans le sédiment des deux autres sites, suggérant que la forte anthropisation de ce milieu (mais également d'autres facteurs non étudiés ici) pourrait jouer un rôle sur la diversité des communautés de protistes. Afin de savoir si cette faible diversité est bien due à une forte anthropisation de cette lagune ou si elle est caractéristique de l'environnement lagunaire en générale, il serait nécessaire de réaliser une nouvelle campagne d'échantillonnage de différentes lagunes qui sont exploitées ou non par l'Homme afin de pouvoir comparer la diversité entre des lagunes fortement anthropisées et faiblement anthropisées. Cette nouvelle campagne pourrait être réalisée en collaboration avec l'Ifremer qui mène une surveillance de l'état écologique et chimique de 20 lagunes du bassin méditerranéen depuis 2003 dans le cadre de la « Directive Cadre sur l'Eau dans les LAGunes méditérranéennes » (DCE-LAG). Cette collaboration permettrait de bénéficier de nombreuses informations sur le niveau d'anthropisation des différentes lagunes ainsi que de l'expertise des personnes impliquées dans cette surveillance.

1.2 Impact de la faible diversité des protistes sur la persistance des vibrios pathogènes dans l'environnement

La plus faible diversité de protistes détectée dans la lagune de Thau au niveau des tables d'huîtres de Bouzigues soulève un certain nombre de questions quant à l'adaptation des bactéries présentent dans ce milieu face à la prédation par les protistes hétérotrophes. Une diminution de la diversité des protistes signifie également une diminution de la diversité des types d'interactions possibles entre les bactéries et les protistes. En effet, les différents protistes que sont les amibes, les flagellés et les ciliés possèdent des modalités de déplacement et de prédation différentes. Les ciliés et les flagellés se nourrissent par piégeage de différentes proies et sont capables de nager dans la colonne d'eau tandis que les amibes internalisent leurs proies par phagocytose et se déplacent activement sur des surfaces biotiques ou abiotiques. Une faible diversité de prédateurs pourrait induire une capacité d'adaptation à la prédation facilitée pour les bactéries de l'environnement qui doivent faire face à des mécanismes microbicides moins diversifiés et pourrait peut-être favoriser l'émergence de bactéries résistantes et potentiellement pathogènes.

2 – Les interactions amibes/vibrios dans l'environnement

Les amibes, protistes hétérotrophes, se nourrissent des divers micro-organismes présents dans leurs environnements, en particulier de bactéries qu'elles internalisent par phagocytose. Afin d'échapper à la prédation par les amibes, certaines bactéries nommé ARB (Amoebae Resistant Bacteria) ont acquis différents mécanismes de défenses intracellulaires et extracellulaires (Greub et Raoult, 2004). La définition des ARB implique qu'elles sont capables de résister aux amibes dans une interaction qui est transitoire. En revanche, d'autres bactéries ont développé des relations plus étroites et stables avec des hôtes amibiens. Ces bactéries nommées endosymbiontes sont des intracellulaires obligatoires qui ont besoin de l'hôte amibes pour leur cycle de vie (survivre et se multiplier) (Taylor *et al.*, 2012).

2.1 Une interaction écologiquement réaliste ?

Après avoir constaté que *V. tasmaniensis* LGP32 était capable de résister à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 dans des conditions *in vitro*, nous avons interrogé la réalité de cette interaction dans l'environnement. Ceci a pu être vérifié par l'établissement d'un barcoding 16S de la région v3v4 de l'ADNr bactérien à partir 93 clones amibiens isolés lors de notre seconde campagne d'échantillonnage (données complémentaires, section B). Nous avons entre autres mis en évidence 2

clones amibiens appartenant au genre *Vannella* associés à des bactéries appartenant à la famille de *Vibrionaceae*. Des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence et des observations par microscopie confocale, ont confirmé cette association indiquant que l'interaction entre amibes et vibrios est retrouvée dans l'environnement naturel. Les *Vibrionaceae* ont été observés dans les amibes mais également à l'extérieur des amibes, suggérant que la bactérie adopte des stades intracellulaires et extracellulaires. Nous avons réussi à isoler les bactéries associées aux *Vannella* sur milieu TCBS (milieu sélectif de certains vibrios) après avoir broyé les amibes. Cependant, lors du repiquage de différentes colonies bactériennes sur milieu TCBS ou Zobell (milieu non sélectif des bactéries marines), aucune croissance n'a été observée. Ceci suggère que la présence d'amibes (vivantes ou mortes) est nécessaire à la croissance de ces bactéries, ce qui souligne une relation étroite entre ces *Vibrionaceae* et leurs amibes hôtes. A notre connaissance il n'a jamais été décrit de vibrios associés de manière stable à un protiste. A partir de colonies isolées sur milieu TCBS, nous proposons de réaliser une MLST (MultiLocus Sequence Typing) afin d'avoir une meilleure assignation taxonomique des *Vibrionaceae* associés aux amibes. Nous avons d'ores et déjà choisi Les gènes *topA, mreB, gyrB* et *hsp60* qui devraient permettre une assignation robuste des vibrios. Enfin, nous avons pour projet de réaliser les mêmes expérimentations à partir des clones amibiens isolés encore non caractérisés.

2.2 Vers une interaction plus spécifique pour certains vibrios ?

Les résultats discutés ci-dessus suggèrent qu'une relation spécifique (et non pas opportuniste) pourrait avoir évolué entre des amibes du genre *Vannella* et certains *Vibrionaceae*. En effet une remarquable stabilité a pu être mise en évidence dans les interactions entre vibrios et amibes. L'interaction entre les deux partenaires a été maintenue alors que les clones amibiens ont été isolés de cultures sur milieu eau de mer stérile 70% solide puis transférés en milieu liquide pendant 1 mois et demi à 2 mois (article 2, section B) en présence d'antibiotiques (chloramphénicol, pénicilline et streptomycine). De la même manière, Vincent Delafont (Université de Poitiers, UMR7267) a identifié une amibe de l'espèce *Paramoeba atlantica* (issue de la collection du CCAP, UK) associée de façon stable à une bactérie appartenant à la famille des *Vibrionaceae* (communication personnelle). En effet, diverses méthodes de dilution et l'utilisation d'antibiotiques n'ont pas permis de curer la souche de son symbionte. Une étude de métagénomique de cette amibe indique que la bactérie associée appartiendrait au clade Splendidus.

Diverses études ont exploré l'histoire évolutive des bactéries appartenant au genre *Bordetella* et leurs associations aux amibes (Soumana *et al.*, 2017; Taylor-Mulneix *et al.*, 2017a; Taylor-Mulneix *et*

al., 2017b; Linz *et al.*, 2019). Ces études se sont focalisées sur la souche *B. bronchiseptica* capable d'infecter différentes espèces animales et *B. pertussis* qui est un pathogène strict de l'Homme. Il a notamment été mis en évidence par phylogénie moléculaire que les souches pathogènes appartenant à ce genre ont une origine environnementale et qu'une acquisition de facteurs de virulence a permis une adaptation à différents hôtes allant jusqu'à une spécialisation d'hôte pour la souche *B. pertussis* qui est un pathogènes strict de l'Homme. De plus, par rapport aux souches environnementales, les souches *B. bronchiseptica* et *B. pertussis* montrent une réduction de leurs génomes avec une réduction plus importante pour le pathogène strict *B. pertussis.* Enfin, il a été montré que *B. bronchiseptica* est capable de résister à la prédation par l'amibe *D. discoideum* alors que *B. pertussis* ne l'est pas. L'ensemble des résultats de ces études suggèrent que les amibes sont des précurseurs évolutifs des interactions et peuvent permettrent la transition de l'environnement vers une spécialisation d'hôte.

Afin de tester l'hypothèse d'une évolution de certaines associations *Vibrio*/*Vannella* vers la symbiose, nous envisageons dans un avenir proche de cribler pour la présence de *Vibrionaceae*, un plus grand nombre d'amibes afin de voir si ces interactions sont plus fréquentes qu'on ne le pense. Pour cela dans un premier temps, en plus des clones amibiens isolés lors de notre échantillonnage, nous allons cribler les amibes marines du CCAP et de l'ATCC à l'aide d'amorces de qPCR spécifiques pour une séquence commune aux *Vibrionaceae*. Si nous détectons suffisamment d'amibes associées à des vibrios, il serait intéressant de réaliser des études de co-phylogénies afin de déterminer s'il existe des clades de vibrios associés spécifiquement à différents clades amibiens. Cette étude serait menée dans le cadre de notre collaboration avec Olivier Duron qui étudie notamment les endosymbiontes de tiques. Afin de voir si ces interactions sont extrêmement étroites et uniquement possibles entre l'amibe hôte et son symbionte, nous pourrions également essayer d'inoculer les symbiontes à d'autres amibes de la même espèce ou d'autres espèces afin de voir si une relation stable est capable de se mettre en place.

2.3 Nature des associations vibrios / amibes

Les bactéries peuvent entretenir différentes relations avec leurs hôtes amibiens. Elles peuvent en effet avoir un effet délétère pour leurs hôtes (parasitisme), comme illustré pour *V. tasmaniensis* LGP32 dans l'article I de cette thèse, ou au contraire être bénéfiques (mutualisme) pour eux en leurs apportant par exemple une protection face à différents pathogènes. Ainsi, les endosymbiontes *Protochlamydia amoebophila* et *Neochlamydia* eS13 protègent l'amibe *Acanthamoeba* spp. de l'infection par *L. pneumophila* (Maita et *al.*, 2018 ; König et *al.*, 2019). Bien que les mécanismes moléculaires soient encore inconnus, *Protochlamydia amoebophila* interfère avec le cycle

intracellulaire de *L. pneumophila* au sein des amibes alors que *Neochlamydia* eS13 empêche l'entrée de *L. pneumophila* dans les amibes. Dans le cas des associations « naturelles » mises en évidence dans l'article I, la croissance ainsi que la morphologie des deux *Vannella* et de la *Paramoeba* associées aux vibrios ne sont pas apparues altérées, suggérant que les interactions sont peu ou pas délétères pour les amibes.

Comme ces *Vibrionaceae* ne montrent pas d'effets néfastes pour les amibes, il serait intéressant de voir si au contraire elles pourraient les protéger d'infections délétères. Nous pourrions pour cela réaliser des co-cultures avec différentes souches bactériennes pathogènes et suivre leurs survies ainsi que la croissance amibienne. Des observations microscopiques pourraient également permettre d'identifier des modalités d'interactions particulières entre les amibes, leurs symbiontes et une souche bactérienne pathogène extérieure.

3 - Hypothèse de la sélection concomitante

Différentes études au sein de notre laboratoire ont mis en évidence que la virulence de LGP32 est dépendante de la phagocytose par les hémocytes d'huître provoquant leurs lyses et implique un large panel de facteurs de virulence (Rubio et al., 2019). Ainsi, LGP32 possède des facteurs de virulence extracellulaire comme les protéases sécrétées Vsm, InhA et Vsp et des facteurs de virulence intracellulaire comme les systèmes d'efflux du cuivre CopA et CusABC, la superoxyde dismutase SodA ou encore un système de sécrétion de type VI (Le roux et *al.*, 2007 ; Binesse et *al.*, 2008 ; Vanhove et *al.*, 2015 ; Vanhove et *al.*, 2016).

3.1 Facteurs de virulence et spécificité d'hôtes

Afin d'étayer l'hypothèse de sélection concomitante, nous avons réalisé des co-cultures entre LGP32 sauvage ainsi que différentes souches mutantes et l'amibe *Vannella* sp. AP1411 trouvée de façon ubiquitaire au niveau des tables d'huîtres de Bouzigues de la lagune de Thau. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence qu'en plus d'être résistante à la phagocytose par les hémocytes, LGP32 est également résistante à l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Dans un deuxième temps, nous avons montré que les facteurs de virulence Vsm et copA qui sont impliqué chez les hémocytes, sont essentiel à la survie de la bactérie chez l'amibe *Vannella sp*. AP1411. En revanche d'autres facteurs de virulence impliqués chez l'huître comme le système d'efflux du cuivre CusABC, la superoxyde dismutase SodA, les protéases InhA et PrtV et les systèmes de sécrétion de type VI, ne sont pas impliqués dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. L'ensemble de ces

résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle certains facteurs de virulence sont impliqués chez un large spectre d'hôtes tandis que certains sont impliqués dans des interactions spécifiques et qu'ils n'ont pas la même importance chez différents hôtes.

Par exemple, les systèmes de sécrétion de type VI de LGP32 et *V. cholerae* ne semblent pas impliqués dans la résistance à la prédation par les amibes *Vannella* sp. AP1411 et *A. castellanii* respectivement (Van der Henst et *al.*, 2018 ; Robino et al., 2019). Cependant il a été mis en évidence que le système de sécrétion de type VI est impliqué dans la virulence de *V. cholerae* lors de l'interaction avec l'amibe *D. discoideum* (Pukatzki et *al.*, 2006). Il a également été mis en évidence que *V. cholerae* possède des facteurs de virulence mineurs chez l'Homme jouant un rôle majeur chez l'amibe *A. castellanii* comme la metalloprotéase HapA et l'hémolysine HlyA (Van der Henst et *al.*, 2018). Ainsi, avec les connaissances actuelles, il semble que certains facteurs de virulence chez les vibrios et notamment le système de sécrétion de type VI soient impliqués dans des interactions spécifiques.

En revanche, de manière intéressante les protéases sécrétées des vibrios jouent un rôle important lors d'interactions avec des cellules eucaryotes et semblent impliquées de manière plus générale. De plus, ce type de facteurs de virulence est largement présent au sein des vibrios. Nous pouvons citer *V. cholerae* qui possède la protéase sécrétée PrtV qui participe à sa résistance à la prédation par le cilié *Tetrahymena pyriformis*, le flagellé *Cafeteria roenbergensis* (Lutz et *al.*, 2013). De plus, lors de l'interaction avec *C. elegans*, PrtV est nécessaire pour tuer le nématode (Lutz et *al.*, 2013). Enfin PrtV est également impliqué chez l'Homme dans la dégradation du tissu épithélial provoquant une inflammation (Sakib et *al.*, 2018). Chez LGP32, la protéase sécrété Vsm est à la fois impliqué dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 et à la fois impliqué dans la virulence chez l'huître. Un autre, vibrio pathogène d'huître, *V. aestuarianus,* possède la protéase Vam, homologue de Vsm, qui est impliquée dans la résistance à la phagocytose par les hémocytes d'huîtres (Labreuche *et al.*, 2010). A notre connaissance l'interaction entre *V. aestuarianus* et un protozoaire n'a pas été décrite laissant sans réponse une implication potentielle de Vam dans ce type d'interactions.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la phagocytose étant conservés entre des organismes distants, l'hypothèse de la sélection concomitante prédit que les protistes hétérotrophes de l'environnement incluant les amibes pouvaient favoriser l'émergence de vibrios pathogènes d'huître (Boulais et *al.*, 2010). Cette hypothèse peut potentiellement s'appliquer dans notre cas pour les deux facteurs de virulence CopA et Vsm. Cependant, il faut rester très prudent car ces facteurs sont impliqués chez plusieurs hôtes et pourraient êtres le fruit d'une acquisition via des interactions multi-hôtes. De plus, nous n'avons pas montré l'implication d'autres facteurs de virulence chez *Vannella*

sp. AP1411 qui sont mis en jeux chez *C. gigas*. Ces facteurs qui semblent impliqués dans des interactions plus spécifiques ont pu être acquis chez un ou des hôtes distants de l'amibe *Vannella* sp. AP1411.

L'implication différentielle des facteurs de virulence en fonction de l'hôte rencontré a été également largement décrite chez le pathogène *Legionella pneumophila* qui est capables de coloniser une variété d'hôtes importante (Boamah *et al.*, 2017; Ghosh and O'Connor, 2017). Ainsi, la compréhension de la spécificité des facteurs de virulence est complexe et nécessiterait d'étudier une grande diversité d'interactions biotiques afin de mieux déchiffrer leur implication en fonction des hôtes rencontrés. Dans le cas de notre étude, afin d'affiner notre compréhension concernant les facteurs de virulence de LGP32, il serait judicieux de réaliser des co-cultures avec des protistes hétérotrophe différents comme des ciliés, des flagellés ou encore des amibes distantes phylogénétiquement du genre *Vannella*. Ces nouvelles interactions pourraient mettre en lumière l'implication de facteurs de virulence qui ne sont pas impliqué chez l'amibe *Vannella* sp. AP1411 suggérant une acquisition de facteurs de virulence par des interactions multi-hôtes.

3.2 Une approche plus globale pour identifier des traits adaptatifs généralistes

Avec notre étude, nous avons montré que certains facteurs de virulence impliqués chez les hémocytes d'huître sont également impliqués dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Bien que ces résultats aillent dans le sens de l'hypothèse de sélection concomitante pour certains facteurs de virulence, ils restent cependant trop parcellaires. Notre étude effectuée à partir de gènes candidats précédemment identifiés chez l'huître n'étant pas assez complète, il nous ait donc apparu nécessaire d'adopter une approche plus globale pour amener plus de poids à cette hypothèse et d'essayer d'identifier l'ensemble des facteurs de virulence à la fois impliqués dans la colonisation de l'huître et dans la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Nous avons donc décidé de mettre en œuvre une approche de criblage massif du génome de LGP32 par TnSeq (ou INseq) afin de comparer les facteurs nécessaires à la résistance à la prédation chez l'huitre et chez l'amibe. Cette approche repose sur deux éléments clés : la génération d'une banque de mutants par mutagénèse aléatoire à l'aide de l'insertion d'un transposon et le criblage de cette banque de manière globale grâce à un séquençage haut-débit de type HiSeq Illumina. En effet, le transposon Mariner comporte des séquences spécifiques qui sont utilisées pour le séquençage des régions flanquantes du site d'insertion permettant d'identifier tous les gènes mutés par l'insertion aléatoire du transposon (van Opijnen *et al.*, 2009; Goodman *et al.*, 2011; Brooks *et al.*, 2014).

Brièvement, l'utilisation du transposon mariner permet de générer une librairie de mutants (par conjugaison entre une souche donneuse et une souche receveuse) dont chaque représentant contient une unique mutation aléatoire. Un nombre d'évènements de transposition important doit permettre de générer une librairie de mutants couvrant l'ensemble du génome de la bactérie d'intérêt. Cette librairie de mutants est soumise à différentes conditions environnementales (comme par exemple la prédation par une amibe), puis elle est criblée par un séquençage haut débit et comparée à la banque de mutants initiale afin d'identifier l'ensemble des gènes fonctionnellement impliqués dans l'adaptation d'une bactérie à l'environnement auquel elle aura été exposée.

Cette approche a été initiée pendant ma thèse en collaboration avec Mark Mandel et son équipe (Université du Wisconsin, Madison, USA) qui ont déjà mis en œuvre cette technique avec succès dans l'étude de la colonisation de l'organe lumineux du calamar *Euprymna scolopes* par *Vibrio fischeri* (Brooks et *al*., 2014). Ainsi, ils ont pu identifier 380 gènes de *V. fischeri* impliqués dans la colonisation de l'organe lumineux du calamar dont 37 étaient déjà connus. Parmi les gènes impliqués, ils ont notamment identifié les gènes codant pour des systèmes d'efflux du cuivre (CusC et CopA), des gènes codant pour des protéines de la membrane externe dont les fonctions prédites sont de participer à la composition et à l'assemblage d'un système de sécrétion de type V aussi appelé autotransporteurs (TamB/YtfN) ainsi que le gène codant la protéine chaperonne DnaJ jouant un rôle dans la formation de biofilm. Des expérimentations de compétitions entre la souche *V. fischeri* sauvage et des souches mutantes pour les gènes *copA, tamB* et *dnaJ* ont confirmé un défaut de colonisation de l'organe lumineux du calamar par les souches mutées. Ainsi les systèmes d'efflux du cuivre, le système de sécrétion de type V et la formation de biofilm jouent un rôle essentiel lors de la colonisation de l'organe lumineux du calamar par *V. fischeri*.

Afin de répondre à notre problématique, nous devons réaliser une librairie de mutants de la souche LGP32 que nous allons mettre en contact avec des huîtres ainsi qu'en co-culture avec l'amibe *Vannella* sp. AP1411 (Figure 33). Ceci permettra d'identifier d'une part les facteurs de virulence de LGP32 impliqués dans la colonisation de *C. gigas* et d'autre part les facteurs de résistance à la prédation amibienne. En comparant les résultats de séquençage après passage au travers des deux filtres de sélection, nous seront en mesure de d'identifier la proportion de gènes mis en jeux chez les deux hôtes de LGP32 et ceux spécifiques de chaque hôte (Figure 33).

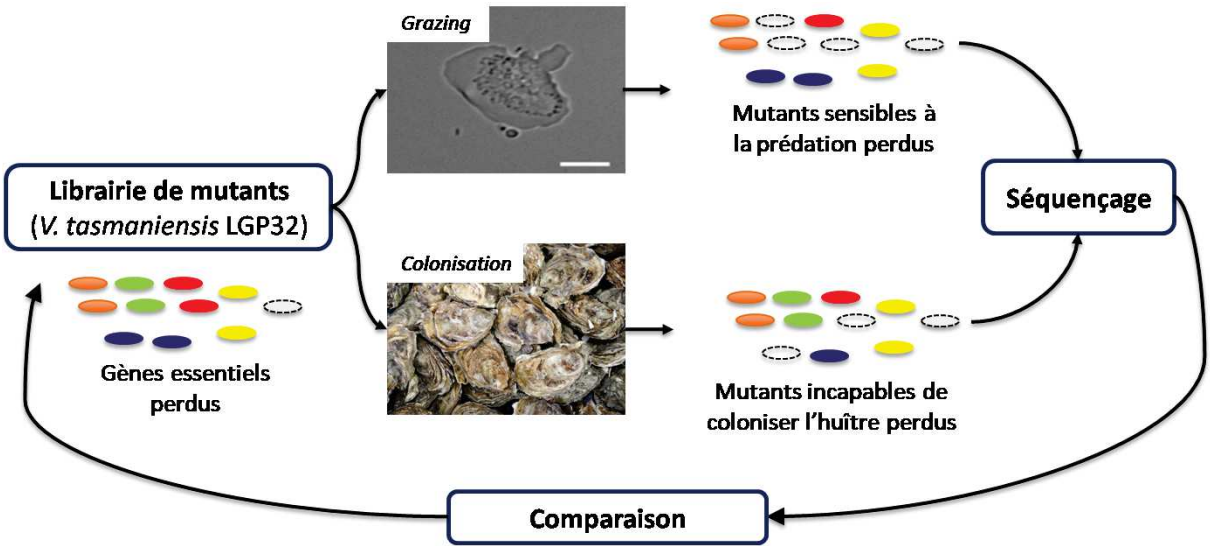


Figure 33. Identification des déterminants génétiques nécessaires à la colonisation de l'huître *C. gigas* et à la survie à la prédation amibienne. Schéma global du protocole expérimental permettant de déterminer les gènes de LGP32 nécessaire à la colonisation de l'huître et à la résistance à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 grâce à l'approche Tn-seq.

Pour le moment, nous avons modifié le plasmide fournit par Mark Mandel nécessaire à la génération de la librairie de mutants de LGP32. Dans un premier temps, nous avons remplacé la cassette de résistance à l'érythromycine présente au sein du transposon par une casette de résistance au chloramphénicol afin de pouvoir sélectionner sur milieu sélectif les mutants ayant intégré un transposon dans leur génome. Dans un deuxième temps, nous avons remplacé le promoteur *V. fischeri* de la transposase par un promoteur fort *V. tasmaniensis* afin d'augmenter l'efficacité de transposition. Les premiers tests de conjugaisons ont été menés et nous avons malheureusement observé une efficacité de transposition 10 fois plus faible que celle de Mark Mandel durant son étude. En perspective, nous devons maintenant essayer de nouveaux promoteurs afin d'améliorer au maximum l'efficacité de transposition afin de maximiser nos chances de couvrir l'ensemble du génome de LGP32. En parallèle, pour être certain que les transposons s'insèrent de manière aléatoire, nous avons dessiné deux couples d'amorces semi-spécifiques nous permettant d'amplifier et d'identifier les sites d'insertions chez un panel de transformants que nous choisirons aléatoirement.

4 – Une spécificité d'interaction au détriment d'autres relations biotiques ?

Au-delà de l'interaction *Vannella / V. tasmaniensis* dont j'ai exploré certains mécanismes au cours de ma thèse, je me suis également intéressé à l'interaction entre l'amibe *Vannella* sp. AP1411 et deux

populations de vibrios appartenant à l'espèce *V. splendidus* qui sont proches phylogénétiquement de l'espèce *V. tasmaniensis* (Section A, données complémentaires). Ces deux populations (#23 et #24) associées positivement aux huîtres, ont été isolées en dehors d'un épisode de mortalité pour la population #23 ou pendant un épisode infectieux pour la population #24 (Bruto et *al.*, 2017). De plus, les souches de la population #24 possèdent le plasmide de virulence pGV1512 alors que les souches de la population #23 ne le possèdent pas. Ce plasmide a été identifié chez des souches de l'espèce *V. crassostreae* dans lesquelles il participe à la virulence chez l'huître mais pas à sa colonisation (Bruto et *al.*, 2017). Par des co-cultures entre les souches de ces deux populations et l'amibe *Vannella* sp. AP1411 nous avons pu montrer que les souches de la population #24 possédant le plasmide de virulence sont sensibles à la prédation par l'amibe alors que les souches de la population #23 ne possédant pas le plasmide de virulence sont résistantes à la prédation amibienne. De plus, nous avons mis en évidence qu'une souche de la population #24 curée du plasmide de virulence devient résistante à la prédation amibienne. Ces résultats indiquent que la résistance au grazing par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 est une caractéristique commune aux espèces V. *tasmaniensis* et *V. splendidus*. Cependant la population #24 de *V. splendidus* (possédant le plasmide de virulence pGV1512) est plus sensible à la prédation amibienne. Ceci montre que le plasmide ne confère pas de protection face à la prédation amibienne et aurait même un effet délétère sur ce phénotype, rendant l'interaction amibe/vibrio défavorable.

Un certain nombre de bactéries pathogènes ont évolué vers des interactions spécialisées impliquant un seul hôte ou un nombre réduit. Cette spécialisation d'hôte, bien souvent accompagnée d'une réduction de génome, permet d'augmenter leur fitness vis-à-vis de cet hôte au détriment des interactions biotiques avec d'autres hôtes. En revanche, d'autres bactéries présentent un caractère plus généraliste et sont capables d'interagir avec un nombre plus important d'hôtes grâce à un panel de gènes de virulence permettant de s'adapter aux différents hôtes rencontrés dans l'environnement. C'est notamment le cas de la bactérie *Legionella pneumophila* qui possède 7 ilôts génomiques impliqués de manière différente en fonction de l'espèce amibienne hôte (O'Connor *et al.*, 2011; Boamah *et al.*, 2017). L'ensemble de nos observations suggèrent que la population *V. splendidus* #24 aurait évolué en direction d'interactions plus spécifiques avec l'huître par l'acquisition d'un plasmide de virulence, au détriment d'autres interactions biotiques, notamment avec les amibes de l'environnent marin. Pour tester cette hypothèse plusieurs expérimentations sont envisageables. Nous devons avant tout confirmer nos observations en criblant l'ensemble des souches de la population #24 curées du plasmide pGV1512 en co-culture avec l'amibe *Vannella* sp. AP1411. Afin de savoir si l'acquisition de ce plasmide de virulence a un coût dans d'autres interactions biotiques, nous pourrions réaliser des co-cultures des souches de la population #24 curées ou non du plasmide de virulence avec d'autres protistes hétérotrophes comme des ciliés ou

des flagellés issus de mediterrannée ou d'atlantique. La sensibilité à la prédation des souches de la population #23 par ces différents protistes hétérotrophes devra également être suivie. Il serait également intéressant d'utiliser des souches de la population #23 dans lesquelles le plasmide de virulence pGV1512 pourrait être introduit, afin de voir si ces souches deviennent sensibles à la prédation par l'amibe *Vannella* sp. AP1411 voir d'autres protistes hétérotrophes et si leur virulence est augmentée chez l'huître. Enfin, nous pourrions élargir cette étude à des souches appartenant à l'espèce *V. crassostreae* possédant ou non ce plasmide de virulence pGV1512.

Conlusion générale

Conclusion générale

Depuis 2008, les huîtres juvéniles *C. gigas* sont victimes d'épisodes de surmortalité d'origine polymicrobienne impliquant le virus Herpes OsHv-1 µvar qui cible les hémocytes de l'huître provoquant une immunosuppression de l'animal. Diverses bactéries opportunistes sont ensuite capables de coloniser l'huître créant une septicémie aboutissant à la mort de l'animal. Différentes espèces de vibrios sont associés à ces épisodes de mortalité et notamment la souche *V. tasmaniensis* LGP32 qui est un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes. Sachant que les mécanismes cellulaire et moléculaire de la phagocytose sont conservés entre des espèces distantes, des protozoaires aux métazoaires, nous avons émis l'hypothèse que les protistes hétérotrophes de l'environnement comme les amibes, pourraient participer à l'émergence et à la dynamique de bactéries pathogènes pour l'huître *C. gigas*.

La diversité des protistes hétérotrophes étant mal connue dans l'environnement méditerranéen et encore plus dans les lagunes exploitées par les fermes ostréicoles, nous avons caractérisé leur diversité dans différents environnements allant d'un environnement fortement anthropisé par l'élevage ostréicole dans la lagune de Thau jusqu'à un environnement peu anthropisé près d'une réserve marine protégée à Banyuls-sur-Mer. Notre étude de terrain a permis de mettre en évidence que les communautés de protistes du sédiment sont plus diversifiées, plus stables et différentes entre des sites géographiques distincts par rapport aux communautés de la colonne d'eau. Nous avons également montré que le sédiment de la zone ostréicole de Bouzigues dans la lagune de Thau possède une plus faible diversité que le sédiment de deux autres sites moins anthropisé.

Nous avons aussi montré que différents vibrios pathogènes d'huître possédant différentes modalités de virulence peuvent influencer la croissance de certains protistes hétérotrophes et que certains protistes semblent être plutôt généralistes tandis que d'autres montrent des sensibilités différentes suggérant des interactions plus spécifiques. Des tests fonctionnels confirment qu'il existe des capacités de prédation différentes vis-à-vis de vibrios pathogènes possédant des mécanismes de virulence différents.

Enfin, nous avons aussi étudié l'interaction entre une amibe appartenant au genre *Vannella*, ubiquitaire en zone ostréicole, et le vibrio pathogène d'huître *V. tasmaniensis* LGP32. Nous avons mis en évidence que cette bactérie qui est capable de résister à la phagocytose par les hémocytes est

également capable de résister à la prédation par cette amibe. Par biologie cellulaire comparée nous avons montré que certains facteurs de virulence impliqués chez l'huître le sont également chez l'amibe alors que d'autres n'ont pas montré d'importance lors de l'interaction avec l'amibe. Ceci suggère une nouvelle fois que certains facteurs de virulence sont spécifiques de certains hôtes alors que d'autres sont probablement impliqués chez plusieurs hôtes.

Bien que les amibes de l'environnement marin soient encore peu étudiées, l'ensemble de ces résultats indiquent que les protistes hétérotrophes dont font partie les amibes jouent un rôle important dans les réseaux trophiques pouvant potentiellement favoriser l'émergence et le maintien de bactéries pathogènes. De plus, malgré le fait que cette thèse ait permis d'améliorer notre compréhension du rôle des amibes dans l'environnement marin, il apparaît nécessaire de poursuivre les recherches afin d'appréhender de façon plus exacte leurs rôles dans cet environnement.

Références bibliographiques

-A-

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

Abd, H., Valeru, S.P., Sami, S.M., Saeed, A., Raychaudhuri, S., and Sandström, G. (2010) Interaction between Vibrio mimicus and Acanthamoeba castellanii. *Environ Microbiol Rep* **2**: 166–171.

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

Abia, A.L.K., Ubomba-Jaswa, E., and Momba, M.N.B. (2017) Riverbed Sediments as Reservoirs of Multiple Vibrio cholerae Virulence-Associated Genes: A Potential Trigger for Cholera Outbreaks in Developing Countries. *J Environ Public Health* **2017**:.

Adiba, S., Nizak, C., van Baalen, M., Denamur, E., and Depaulis, F. (2010) From grazing resistance to pathogenesis: The coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* **5**: 1–10.

Adl, S.M., SIMPSON, A.G.B., FARMER, M.A., ANDERSEN, R.A., ANDERSON, O.R., BARTA, J.R., et al. (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 399–451.

Aguilar-Díaz, H., Carrero, J.C., Argüello-García, R., Laclette, J.P., and Morales-Montor, J. (2011) Cyst and encystment in protozoan parasites: Optimal targets for new life-cycle interrupting strategies? *Trends Parasitol* **27**: 450–458.

Aijaz, I. and Koudelka, G.B. (2017) Tetrahymena phagocytic vesicles as ecological micro-niches of phage transfer. *FEMS Microbiol Ecol* **93**: 1–8.

Akaza, Y., Tsuji, A., and Yasukawa, H. (2002) Analysis of the gene encoding copper/zinc superoxide dismutase homolog in Dictyostelium discoideum. *Biol Pharm Bull* **25**: 1528–1532.

Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., and Alizadeh, H. (2002) Resistance of Acanthamoeba castellanii Cysts to Physical, Chemical, and Radiological Conditions. *J Parasitol* **88**: 621.

Al-Khodor, S., Price, C.T., Habyarimana, F., Kalia, A., and Abu Kwaik, Y. (2008) A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of Legionella pneumophila is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol Microbiol* **70**: 908–923.

Alibaud, L., Pawelczyk, J., Gannoun-Zaki, L., Singh, V.K., Rombouts, Y., Drancourt, M., et al. (2014) Increased phagocytosis of Mycobacterium marinum mutants defective in lipooligosaccharide production a structure-activity relationship study. *J Biol Chem* **289**: 215–228.

Allombert, J., Fuche, F., Michard, C., and Doublet, P. (2013) Molecular mimicry and original biochemical strategies for the biogenesis of a Legionella pneumophila replicative niche in phagocytic cells. *Microbes Infect* **15**: 981–988.

Allombert, J., Vianney, A., Laugier, C., Petry, S., and Hébert, L. (2014) Survival of taylorellae in the environmental amoeba Acanthamoeba castellanii. *BMC Microbiol* **14**:.

Alsam, S., Sissons, J., Dudley, R., and Khan, N.A. (2005) Mechanisms associated with Acanthamoeba castellanii (T4) phagocytosis. *Parasitol Res* **96**: 402–409.

Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Müller, K.D., and Michel, R. (1997) Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Appl Environ Microbiol* **63**: 115–121.

Amaro, F., Wang, W., Gilbert, J.A., Roger Anderson, O., and Shuman, H.A. (2015) Diverse protist grazers select for virulence-related traits in Legionella. *ISME J* **9**: 1607–1618.

Andersen, K.S. and Winding, A. (2004) Non-target effects of bacterial biological control agents on soil Protozoa. *Biol Fertil Soils* **40**: 230–236.

Andrä, J., Berninghausen, O., Wülfken, J., and Leippe, M. (1996) Shortened amoebapore analogs with enhanced antibacterial and cytolytic activity. *FEBS Lett* **385**: 96–100.

Andrä, J., Herbst, R., and Leippe, M. (2003) Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes.

Dev Comp Immunol **27**: 291–304.
Anwar, A., Khan, N.A., and Siddiqui, R. (2018) Combating Acanthamoeba spp. cysts: What are the options? *Parasites and Vectors* **11**: 4–6.
Armstrong, E., Rogerson, A., and Leftley, J.W. (2000) The abundance of heterotrophic protists associated with intertidal seaweeds. *Estuar Coast Shelf Sci* **50**: 415–424.
Arnold, J.W., Spacht, D., and Koudelka, G.B. (2016) Determinants that govern the recognition and uptake of Escherichia coli O157 : H7 by Acanthamoeba castellanii. *Cell Microbiol* **18**: 1459–1470.
Aubry, A., Mougari, F., Reibel, F., and Cambau, E. (2017) Mycobacterium marinum. 1–17.
Austin, B. and Zhang, X.H. (2006) Vibrio harveyi: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* **43**: 119–124.

-B-

Babior, B.M. (2004) NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* **16**: 42–47.
Baker-Austin, C. and Oliver, J.D. (2018) Vibrio vulnificus: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ Microbiol* **20**: 423–430.
Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F., and Martinez-Urtaza, J. (2018) Vibrio spp. infections. *Nat Rev Dis Prim* **4**:.
Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., and Martinez-Urtaza, J. (2010) Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus: A European perspective. *Environ Microbiol Rep* **2**: 7–18.
Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Taylor, N.G.H., Hartnell, R., Siitonen, A., and Martinez-Urtaza, J. (2012) Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nat Clim Chang* **3**: 73–77.
Balczun, C. and Scheid, P.L. (2017) Free-living amoebae as hosts for and vectors of intracellular microorganisms with public health significance. *Viruses* **9**:.
Baldauf, S.L. (2000) A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science (80-)* **290**: 972–977.
Baldwin, K.M. and Bowers, B. (1995) Isolation of N-Acety-B-Hexosaminidase from Acanthamoeba castellanii. *J Eukaryot Microbiol* **42**: 237–242.
Barisch, C., Paschke, P., Hagedorn, M., Maniak, M., and Soldati, T. (2015) Lipid droplet dynamics at early stages of Mycobacterium marinum infection in Dictyostelium. *Cell Microbiol* **17**: 1332–1349.
Barisch, C. and Soldati, T. (2017a) Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets. *Biochimie* **141**: 54–61.
Barisch, C. and Soldati, T. (2017b) Mycobacterium marinum Degrades Both Triacylglycerols and Phospholipids from Its Dictyostelium Host to Synthesise Its Own Triacylglycerols and Generate Lipid Inclusions. *PLoS Pathog* **13**: 1–30.
Bass, D., Chao, E.E.Y., Nikolaev, S., Yabuki, A., Ishida, K. ichiro, Berney, C., et al. (2009) Phylogeny of Novel Naked Filose and Reticulose Cercozoa: Granofilosea cl. n. and Proteomyxidea Revised. *Protist* **160**: 75–109.
Bedard, K., Lardy, B., and Krause, K. (2007) NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie* **89**: 1107–1112.
Beeton, M.L., Atkinson, D.J., and Waterfield, N.R. (2013) An amoeba phagocytosis model reveals a novel developmental switch in the insect pathogen Bacillus thuringiensis. *J Insect Physiol* **59**: 223–231.
Ben-haim, Y., Zicherman-keren, M., and Rosenberg, E. (2003) Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral Pocillopora damicornis by the Novel Pathogen Vibrio coralliilyticus. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4236–4242.
Benghezal, M., Fauvarque, M.O., Tournebize, R., Froquet, R., Marchetti, A., Bergeret, E., et al. (2006)

Specific host genes required for the killing of Klebsiella bacteria by phagocytes. *Cell Microbiol* **8**: 139–148.

Berdjeb, L., Parada, A., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2018) Short-term dynamics and interactions of marine protist communities during the spring-summer transition. *ISME J* **12**: 1907–1917.

Berney, C., Romac, S., Mahé, F., Santini, S., Siano, R., and Bass, D. (2013) Vampires in the oceans: predatory cercozoan amoebae in marine habitats. *ISME J* **7**: 2387–2399.

Besold, A.N., Culbertson, E.M., and Culotta, V.C. (2016) The Yin and Yang of copper during infection. *J Biol Inorg Chem* **21**: 137–144.

Best, A.M. and Abu Kwaik, Y. (2019) Evasion of phagotrophic predation by protist hosts and innate immunity of metazoan hosts by Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **21**: 1–16.

Beuchat, L.R. (1975) Environmental Factors Affecting Survival and Growth of Vibrio parahaemolyticus. A Review. *J Milk Food Technol* **38**: 476–480.

Bhattacharya, A., Ghosh, M., and Choudhury, A. (1987) Seasonal Abundance of *Acanthamoeba rhysodes* (Singh, 1952) (Protozoa: Gymnamoebia) in a Mangrove Litter-Soil Ecosystem of Gangetic-Estuary, India1,2. *J Protozool* **34**: 403–405.

Bhattacharya, D., HELMCHEN, T., and MELKONIAN, M. (1995) Molecular Evolutionary Analyses of Nuclear-Encoded Small Subunit Ribosomal RNA Identify an Independent Rhizopod Lineage Containing the Euglyphina and the Chlorarachniophyta. *J Eukaryot Microbiol* **42**: 65–69.

Bhattacharya, D. and Weber, K. (1997) The actin gene of the glaucocystophyte Cyanophora paradoxa: analysis of the coding region and introns, and an actin phylogeny of eukaryotes. *Curr Genet* **31**: 439–446.

Biard, T., Stemmann, L., Picheral, M., Mayot, N., Vandromme, P., Hauss, H., et al. (2016) In situ imaging reveals the biomass of giant protists in the global ocean. *Nature* **532**: 504–507.

Binesse, J., Delsert, C., Saulnier, D., Champomier-Vergès, M.C., Zagorec, M., Munier-Lehmann, H., et al. (2008) Metalloprotease Vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of Vibrio splendidus. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7108–7117.

Birtles, R.J., Rowbotham, T.J., Michel, R., Pitcher, D.G., Lascola, B., Alexiou-Daniel, S., and Raoult, D. (2000) 'Candidatus Odyssella thessalonicensis' gen. nov., sp. nov., an obligate intracellular parasite of Acanthamoeba species. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 63–72.

Blanc, C., Charette, S., Cherix, N., Lefkir, Y., Cosson, P., and Letourneur, F. (2005) A novel phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding domain targeting the Phg2 kinase to the membrane in Dictyostelium cells. *Eur J Cell Biol* **84**: 951–960.

Blokesch, M. (2015) Protocols for Visualizing Horizontal Gene Transfer in Gram-Negative Bacteria Through Natural Competence., pp. 189–204.

Boamah, D.K., Zhou, G., Ensminger, A.W., and O'Connor, T.J. (2017) From many hosts, one accidental pathogen: The diverse protozoan hosts of Legionella. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:.

Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., et al. (2013) Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods* **10**: 57–59.

Bolivar, I., Fahrni, J.F., Smirnov, A., and Pawlowski, J. (2001) SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera Amoeba and Chaos (lobosea, gymnamoebia): The origin of gymnamoebae revisited. *Mol Biol Evol* **18**: 2306–2314.

Borel, N., Polkinghorne, A., and Pospischil, A. (2018) A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? *Vet Pathol* **55**: 374–390.

Botelho, R.J. and Grinstein, S. (2011) Phagocytosis. *Curr Biol* **21**: 533–538.

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.

Bowers, B. and Korn, E.D. (1969) The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol* **41**: 786–805.

Bovee, E.C. (1953) Morphological Identification of Free-Living Amoebida. **60**:.

Bovee, E.C. (1970) The lobose amebas: II. A new ameba of the 'Proteus' group, polychaos nitidubia N.

Sp. *Hydrobiologia* **35**: 554–567.
Boyd, E.F. and Brüssow, H. (2002) Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* **10**: 521–9.
Bozue, J.A. and Johnson, W. (1996) Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii : Uptake by Coiling Phagocytosis and Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion. **64**: 668–673.
Bozzaro, S., Bucci, C., and Steinert, M. (2008) Phagocytosis and Host-Pathogen Interactions in Dictyostelium with a Look at Macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* **271**: 253–300.
Bozzaro, S., Buracco, S., and Peracino, B. (2013) Iron metabolism and resistance to infection by invasive bacteria in the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 1–9.
Bozzaro, S. and Roseman, S. (1983) Adhesion of Dictyostelium discoideum cells to carbohydrates immobilized in polyacrylamide gels. *J Biol Chem* **258**: 13882–13889.
Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**: 238–250.
Brooks, J.F., 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* **111**: 17284–17289.
Brown, S.P., Cornforth, D.M., and Mideo, N. (2012) Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol* **20**: 336–342.
Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Gouyette, C., et al. (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **8**: 1228–1240.
Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivesse, S., Alunno-Bruscia, M., et al. (2017) Vibrio crassostreae, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* **11**: 1043–1052.
Buckley, C.M., Gopaldass, N., Bosmani, C., Johnston, S.A., Soldati, T., Insall, R.H., and King, J.S. (2016) WASH drives early recycling from macropinosomes and phagosomes to maintain surface phagocytic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E5906–E5915.
Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**: 169–184.
Buracco, S., Peracino, B., Andreini, C., Bracco, E., and Bozzaro, S. (2018) Differential effects of iron, zinc, and copper on dictyostelium discoideum cell growth and resistance to Legionella pneumophila. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–20.
Buracco, S., Peracino, B., Cinquetti, R., Signoretto, E., Vollero, A., Imperiali, F., et al. (2015) Dictyostelium Nramp1, which is structurally and functionally similar tomammalian DMT1 transporter, mediates phagosomal iron efflux. *J Cell Sci* **128**: 3304–3316.
Burlando, B., Evangelisti, V., Dondero, F., Pons, G., Viarengo, A., and Camakaris, J. (2002) Occurrence of Cu-ATPase in Dictyostelium: Possible role in resistance to copper. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 476–483.
Butler, H. and Rogerson, A. (1995) Temporal and Spatial Abundance of Naked Amoebae (Gymnamoebae) in Marine Benthic Sediments of the Clyde Sea Area, Scotland. *J Eukaryot Microbiol* **42**: 724–730.
BYERS, T.J., AKINS, R.A., MAYNARD, B.J., LEFKEN, R.A., and MARTIN, S.M. (1980) Rapid Growth of Acanthamoeba In Defined Media; Induction of Encystment By Glucose-Acetate Starvation. *J Protozool* **27**: 216–219.

-C-

Callewaert, L. and Michiels, C.W. (2010) Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci* **35**: 127–160.
Cann, J.P. and Page, F.C. (1982) Fine structure of small free-living Paramoeba (Amoebida) and taxonomy of the genus. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* **62**: 25–43.
Cardenal-Muñoz, E., Barisch, C., Lefrançois, L.H., López-Jiménez, A.T., and Soldati, T. (2018) When dicty met myco, a (not so) romantic story about one amoeba and its intracellular pathogen. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–20.
Carnell, M., Zech, T., Calaminus, S.D., Ura, S., Hagedorn, M., Johnston, S.A., et al. (2011) Actin polymerization driven by WASH causes V-ATPase retrieval and vesicle neutralization before exocytosis. *J Cell Biol* **193**: 831–839.
Casadevall, A., Fu, M.S., Guimaraes, A., and Albuquerque, P. (2019) The 'amoeboid predator-fungal animal virulence' hypothesis. *J Fungi* **5**:.
Cavaillon, J.M. and Legout, S. (2016) Centenary of the death of Elie Metchnikoff: a visionary and an outstanding team leader. *Microbes Infect* **18**: 577–594.
Cavalier-Smith, T., Chao, E.E., and Lewis, R. (2016) 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Mol Phylogenet Evol* **99**: 275–296.
Cavalier-Smith, T., Chao, E.E., and Lewis, R. (2018) Multigene phylogeny and cell evolution of chromist infrakingdom Rhizaria: contrasting cell organisation of sister phyla Cercozoa and Retaria. *Protoplasma* **255**: 1517–1574.
Cavalier-Smith, T. and Chao, E.E.Y. (2003a) Phylogeny and Classification of Phylum Cercozoa (Protozoa). *Protist* **154**: 341–358.
Cavalier-Smith, T. and Chao, E.E.Y. (2003b) Phylogeny of choanozoa, apusozoa, and other protozoa and early eukaryote megaevolution. *J Mol Evol* **56**: 540–563.
Cavalier-Smith, T., Chao, E.E.Y., and Oates, B. (2004) Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont Phalansterium. *Eur J Protistol* **40**: 21–48.
Cavalier-Smith, T., Fiore-Donno, A.M., Chao, E., Kudryavtsev, A., Berney, C., Snell, E.A., and Lewis, R. (2015) Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Mol Phylogenet Evol* **83**: 293–304.
Chase, E., Young, S., and Harwood, V.J. (2015) Sediment and vegetation as reservoirs of Vibrio vulnificus in the Tampa Bay Estuary and Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* **81**: 2489–2494.
Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Bonilla, P., and Martínez-Palomo, A. (2005) Ultrastructural study of encystation and excystation in Acanthamoeba castellanii. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 153–158.
Chen, J., De Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) Legionella Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science (80-)* **303**: 1358–1361.
Chihi, A., Stensvold, C.R., Ben-Abda, I., Ben-Romdhane, R., Aoun, K., Siala, E., and Bouratbine, A. (2018) Development and evaluation of molecular tools for detecting and differentiating intestinal amoebae in healthy individuals. *Parasitology*.
Choi, D.-H., Na, B.-K., Seo, M.-S., Song, H.-R., and Song, C.-Y. (2000) Purification and Characterization of Iron Superoxide Dismutase and Copper-Zinc Superoxide Dismutase from Acanthamoeba castellanii. *J Parasitol* **86**: 899.
Cirillo, S.L.G., Lum, J., and Cirillo, J.D. (2000) Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila. *Microbiology* **146**: 1345–1359.
Cirillo, S.L.G., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M., and Cirillo, J.D. (2002) Role of the Legionella pneumophila rtxA gene in amoebae. *Microbiology* **148**: 1667–1677.
Clark, C.G. and Cross, G.A.M. (1988) Small-subunit ribosomal RNA sequence from Naegleria gruberi supports the polyphyletic origin of amoebas. *Mol Biol Evol* **5**: 12–18.
Clarke, M., Köhler, J., Arana, Q., Liu, T., Heuser, J., and Gerisch, G. (2002) Dynamics of the vacuolar H+-ATPase in the contractile vacuole complex and the endosomal pathway of Dictyostelium cells.
Clarke, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., et al. (2013) Genome of

Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* **14**: R11.

Clemens, J.D., Nair, G.B., Ahmed, T., Qadri, F., and Holmgren, J. (2017) Cholera. *Lancet* **390**: 1539–1549.

Colwell, R.R. and Grimes, D.J. (1984) Vibrio diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **37**: 265–287.

Conner, J.G., Teschler, J.K., Jones, C.J., and Yildiz, F.H. (2016) Staying Alive: Vibrio cholerae's Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. In, *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*., pp. 593–633.

Cordingley, john; Trzyna, W. (2008) Multiple factors affecting growth and encystment of Acanthamoeba castellanii in axenic culture.

Cordingley, J.S., Willis, R.A., and Villemez, C.L. (1996) Osmolarity is an independent trigger of Acanthamoeba castellanii differentiation. *J Cell Biochem* **61**: 167–171.

Cornillon, S., Gebbie, L., Benghezal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle-Haller, B., et al. (2006) An adhesion molecule in free-living Dictyostelium amoebae with integrin β features. *EMBO Rep* **7**: 617–621.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., et al. (2000) Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in Dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* **275**: 34287–34292.

Corsaro, D., Michel, R., Walochnik, J., Müller, K.D., and Greub, G. (2010) Saccamoeba lacustris, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia 'Candidatus Metachlamydia lacustris' (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *Eur J Protistol* **46**: 86–95.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (2010) Resistance of Acanthamoeba cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol* **48**: 2689–2697.

-D-

Danelishvili, L., Wu, M., Stang, B., Harriff, M., Cirillo, S., Cirillo, J., et al. (2007) Identification of Mycobacterium avium pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11038–11043.

Dang, H. and Lovell, C.R. (2016) Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**: 91–138.

Dawson, M.P., Humphrey, B.A., and Marshall, K.C. (1981) Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr Microbiol* **6**: 195–199.

De Jonckheere, J.F. (2002) A century of research on the amoeboflagellate genus Naegleria. *Acta Protozool* **41**: 309–342.

De Jonckheere, J.F., Baumgartner, M., Eberhardt, S., Opperdoes, F.R., and Stetter, K.O. (2011b) Oramoeba fumarolia gen. nov., sp. nov., a new marine heterolobosean amoeboflagellate growing at 54°C. *Eur J Protistol* **47**: 16–23.

De Jonckheere, J.F., Baumgartner, M., Opperdoes, F.R., and Stetter, K.O. (2009) Marinamoeba thermophila, a new marine heterolobosean amoeba growing at 50 °C. *Eur J Protistol* **45**: 231–236.

De Jonckheere, J. De, Murase, J., and Opperdoes, F. (2011a) A New Thermophilic Heterolobosean Amoeba, Fumarolamoeba ceborucoi, gen. nov., sp. nov., Isolated Near a Fumarole at a Volcano in Mexico.

de Souza Santos, M., Salomon, D., and Orth, K. (2017) T3SS effector VopL inhibits the host ROS response, promoting the intracellular survival of Vibrio parahaemolyticus. *PLoS Pathog* **13**: 1–25.

de Souza, T.K., Soares, S.S., Benitez, L.B., and Rott, M.B. (2017) Interaction Between Methicillin-

Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and Acanthamoeba polyphaga. *Curr Microbiol* **74**: 541–549.

Delafont, V., Samba-Louaka, A., Bouchon, D., Moulin, L., and Héchard, Y. (2015) Shedding light on microbial dark matter: A TM6 bacterium as natural endosymbiont of a free-living amoeba. *Environ Microbiol Rep* **7**: 970–978.

Delincé, M.J., Bureau, J.B., López-Jiménez, A.T., Cosson, P., Soldati, T., and McKinney, J.D. (2016) A microfluidic cell-trapping device for single-cell tracking of host-microbe interactions. *Lab Chip* **16**: 3276–3285.

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., et al. (2018) Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* **9**:.

Dembo, M. (1989) Mechanics and control of the cytoskeleton in Amoeba proteus. *Biophys J* **55**: 1053–1080.

Dempsey, P.W., Vaidya, S.A., and Cheng, G. (2003) The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2604–2621.

Derengowski, L. da S., Paes, H.C., Albuquerque, P., Tavares, A.H.F.P., Fernandes, L., Silva-Pereira, I., and Casadevall, A. (2013) The transcriptional response of cryptococcus neoformans to ingestion by Acanthamoeba castellanii and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. *Eukaryot Cell* **12**: 761–774.

Desjardins, M., Houde, M., and Gagnon, E. (2005) Phagocytosis: The convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev* **207**: 158–165.

de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahe, F., Logares, R., et al. (2015) Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science (80-)* **348**: 1261605–1261605.

Dhakshinamoorthy, R., Bitzhenner, M., Cosson, P., Soldati, T., and Leippe, M. (2018) The saposin-like protein apld displays pore-forming activity and participates in defense against bacterial infection during a multicellular stage of dictyostelium discoideum. *Front Cell Infect Microbiol* **8**: 1–13.

Diard, M. and Hardt, W.D. (2017) Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* **41**: 679–697.

Dingle, A. D. ; Fulton, C. (1966) DEVELOPMENT OF THE FLAGELLAR APPARATUS OF NAEGLERIA. *J Cell Biol* **31**: 43–54.

Dirren, S. and Posch, T. (2016) Promiscuous and specific bacterial symbiont acquisition in the amoeboid genus Nuclearia (Opisthokonta). *FEMS Microbiol Ecol* **92**: 1–16.

Dormann, D., Weijer, G., Dowler, S., and Weijer, C.J. (2004) In vivo analysis of 3-phosphoinositide dynamics during Dictyostelium phagocytosis and chemotaxis. *J Cell Sci* **117**: 6497–6509.

Douglas-Helders, G.M., O'Brien, D.P., McCorkell, B.E., Zilberg, D., Gross, A., Carson, J., and Nowak, B.F. (2003) Temporal and spatial distribution of paramoebae in the water column - A pilot study. *J Fish Dis* **26**: 231–240.

Dubert, J., Barja, J.L., and Romalde, J.L. (2017) New insights into pathogenic vibrios affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. *Front Microbiol* **8**: 1–16.

Duclos, S., Corsini, R., and Desjardins, M. (2003) Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5. *J Cell Sci* **116**: 907–918.

Dunn, J.D., Bosmani, C., Barisch, C., Raykov, L., Lefrançois, L.H., Cardenal-Muñoz, E., et al. (2018) Eat prey, live: Dictyostelium discoideum as a model for cell-autonomous defenses. *Front Immunol* **8**:.

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., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., et al. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of Crassostrea gigas immune cells by the oyster pathogen Vibrio splendidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2993–8.

Dyková, I., Figueras, A., and Peric, Z. (2000) Neoparamoeba Page, 1987: Light and electron

microscopic observations on six strains of different origin. *Dis Aquat Organ* **43**: 217–223.
Dyková, I., Nowak, B.F., Crosbie, P.B.B., Fiala, I., Pecková, H., Adams, M.B., et al. (2005) Neoparamoeba branchiphila n. sp., and related species of the genus Neoparamoeba Page, 1987: Morphological and molecular characterization of selected strains. *J Fish Dis* **28**: 49–64.

-E-

Erken, M., Lutz, C., and McDougald, D. (2013) The Rise of Pathogens: Predation as a Factor Driving the Evolution of Human Pathogens in the Environment. *Microb Ecol* **65**: 860–868.
Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013) From Amoeba to Macrophages: Exploring the Molecular Mechanisms of Legionella pneumophila Infection in Both Hosts. In, *Life Science Journal*., pp. 1–34.
Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**: 1287–1294.
Essig, A., Heinemann, M., Simnacher, U., and Marre, R. (1997) Infection of Acanthamoeba castellanii by chlamydia pneumoniae. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1396–1399.
Evstigneeva, A., Raoult, D., Karpachevskiy, L., and La Scola, B. (2009) Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and Streptococcus pneumoniae. *Microbiology* **155**: 657–664.

-F-

Fahrni, J.F., Bolivar, I., Berney, C., Nassonova, E., Smirnov, A., and Pawlowski, J. (2003) Phylogeny of Lobose Amoebae Based on Actin and Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *Mol Biol Evol* **20**: 1881–1886.
Fang, F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**: 820–832.
Faria, J., da Cunha, A. M., & Pinto, C. (1922) Estudos sobre Protozoarios do mar.
Faucher, S.P., Mueller, C.A., and Shuman, H.A. (2011) Legionella pneumophila transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. *Front Microbiol* **2**: 1–18.
Faury, N., Saulnier, D., Thompson, F.L., Gay, M., Swings, J., and Le Roux, F. (2004) Vibrio crassostreae sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (Crassostrea gigas). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2137–2140.
Feehan, C.J., Johnson-Mackinnon, J., Scheibling, R.E., Lauzon-Guay, J.S., and Simpson, A.G.B. (2013) Validating the identity of Paramoeba invadens, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Dis Aquat Organ* **103**: 209–227.
Fey, P., Stephens, S., Titus, M.A., and Chisholm, R.L. (2002) SadA , a novel adhesion receptor in Dictyostelium. **159**: 1109–1119.
Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., and Grinstein, S. (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* **7**: 61–98.
Flegontova, O., Flegontov, P., Malviya, S., Audic, S., Wincker, P., de Vargas, C., et al. (2016) Extreme Diversity of Diplonemid Eukaryotes in the Ocean. *Curr Biol* **26**: 3060–3065.
Fokin, SI. (2004) Bacterial endocytobionts of Ciliophora and their interactions with the host cell. *Int Rev Cytol* **236**:.
Forget, L., Ustinova, J., Wang, Z., Huss, V.A.R., and Lang, B.F. (2002) Hyaloraphidium curvatum: A linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Mol Biol Evol* **19**: 310–319.
Fouque, E., Trouilhé, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., and Hécharda, Y. (2012) Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell*

11: 382–387.
Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., and Rediers, H. (2011) Vibrio anguillarum as a fish pathogen : virulence factors , diagnosis and prevention. 643–661.
Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L., and Lindquist, T.D. (1993) Occurrence of bacterial endosymbionts in Acanthamoeba spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J Clin Microbiol* **31**: 1122–1126.
Froquet, R., Le Coadic, M., Perrin, J., Cherix, N., Cornillon, S., and Cosson, P. (2012) TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* **23**: 679–686.

-G-

Garate, M., Cao, Z., Bateman, E., and Panjwani, N. (2004) Cloning and characterization of a novel mannose-binding protein of Acanthamoeba. *J Biol Chem* **279**: 29849–29856.
Garcia, M.X.U., Foote, C., Van Es, S., Devreotes, P.N., Alexander, S., and Alexander, H. (2000) Differential developmental expression and cell type specificity of Dictyostelium catalases and their response to oxidative stress and UV-light. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* **1492**: 295–310.
Gay, M., Berthe, F.C.J., and Le Roux, F. (2004a) Screening of Vibrio isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Dis Aquat Organ* **59**: 49–56.
Gay, M., Renault, T., Pons, A., and Le Roux, F. (2004b) Two Vibrio splendidus related strains collaborate to kill Crassostrea gigas: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ* **62**: 65–74.
Genitsaris, S., Monchy, S., Viscogliosi, E., Sime-Ngando, T., Ferreira, S., and Christaki, U. (2015) Seasonal variations of marine protist community structure based on taxon-specific traits using the eastern English Channel as a model coastal system. *FEMS Microbiol Ecol* **91**: 1–15.
Georges, C., Monchy, S., Genitsaris, S., and Christaki, U. (2014) Protist community composition during early phytoplankton blooms in the naturally iron-fertilized Kerguelen area (Southern Ocean). *Biogeosciences* **11**: 5847–5863.
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.
German, N., Lüthje, F., Hao, X., Rønn, R., and Rensing, C. (2016) Microbial Virulence and Interactions With Metals, Elsevier Inc.
Ghosh, S. and O'Connor, T.J. (2017) Beyond paralogs: The multiple layers of redundancy in bacterial pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–14.
Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., and Domalain, D. (2006) " Summer Syndrome " in Litopenaeus stylirostris in New Caledonia : Pathology and epidemiology of the etiological agent , Vibrio nigripulchritudo. **253**: 105–113.
Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., and Imhoff, J.F. (2010) chemical interactions between Marine macroalgae and bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **409**: 267–300.
González-Robles, A., Castañón, G., Hernández-Ramírez, V.I., Salazar-Villatoro, L., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M., et al. (2008) Acanthamoeba castellanii: Identification and distribution of actin cytoskeleton. *Exp Parasitol* **119**: 411–417.
Goodman, A.L., Wu, M., and Gordon, J.I. (2011) Identifying microbial fitness determinants by insertion sequencing using genome-wide transposon mutant libraries. *Nat Protoc* **6**: 1969–80.
Gordon, S. (2008) Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *Eur J Immunol* **38**: 3257–3264.
Gotthardt, D., Warnatz, H.J., Henschel, O., Brückert, F., Schleicher, M., and Soldati, T. (2002) High-Resolution Dissection of Phagosome Maturation Reveals Distinct Membrane Trafficking Phases. *Mol Biol Cell* **13**: 3508–3520.

Grace, E., Asbill, S., and Virga, K. (2015) Naegleria fowleri: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. *Antimicrob Agents Chemother* **59**: 6677–6681.

Greub, G. and Raoult, D. (2004) Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413–433.

Greub, G., La Scola, B., and Raoult, D. (2003) Parachlamydia acanthamoeba is endosymbiotic or lytic for Acanthamoeba polyphaga depending on the incubation temperature. In, *Annals of the New York Academy of Sciences*., pp. 628–634.

Griffin, J.L. (1960) The isolation, characterization, and identification of the crstalline inclusions of the large free-living amebae. *J Biophys Biochem Cytol* **7**: 227–34.

Grimes, D.J., Johnson, C.N., Dillon, K.S., Flowers, A.R., Noriea, N.F., and Berutti, T. (2009) What genomic sequence information has revealed about vibrio ecology in the ocean-a review. *Microb Ecol* **58**: 447–460.

Guillou, L., Jacquet, S., Chrétiennot-Dinet, M.J., and Vaulot, D. (2001) Grazing impact of two small heterotrophic flagellates on Prochlorococcus and Synechococcus. *Aquat Microb Ecol* **26**: 201–207.

Gunderson, J.H. and Sogin, M.L. (1986) Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists Acanthamoeba castellanii and Euglena gracilis. *Gene* **44**: 63–70.

Guzman, C.A., Rohde, M., Bock, M., and Timmis, K.N. (1994) Invasion and intracellular survival of Bordetella bronchiseptica in mouse dendritic cells. *Infect Immun* **62**: 5528–5537.

-H-

Hagedorn, M., Rohde, K.H., Russell, D.G., and Soldati, T. (2009) Infection by Tubercular Mycobacteria. *Science (80-)* **323**: 1729–1733.

Hagedorn, M. and Soldati, T. (2007) Flotillin and RacH modulate the intracellular immunity of Dictyostelium to Mycobacterium marinum infection. *Cell Microbiol* **9**: 2716–2733.

Hahn, M.W. and Ho, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its e ¡ ect on populations of aquatic bacteria. **35**:.

Hahn, M.W. and Höfle, M.G. (1999) Flagellate predation on a bacterial model community: Interplay of size- selective grazing, specific bacterial cell size, and bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4863–4872.

Hall, J. and Voelz, H. (1985) Bacterial Endosymbionts of Acanthamoeba sp. *J Parasitol* **71**: 89.

Hara, T., Takeda, T. aki, Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., and Fukada, T. (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci* **67**: 283–301.

Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, Legionella pneumophila, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**: 126–132.

Harding, T., Brown, M.W., Plotnikov, A., Selivanova, E., Park, J.S., Gunderson, J.H., et al. (2013) Amoeba stages in the deepest branching heteroloboseans, including pharyngomonas: Evolutionary and systematic implications. *Protist* **164**: 272–286.

Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O. V., Schroer, T.A., and Grinstein, S. (2003) Phagosomes Fuse with Late Endosomes and/or Lysosomes by Extension of Membrane Protrusions along Microtubules: Role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* **23**: 6494–6506.

Hecht, O., Van Nuland, N.A., Schleinkofer, K., Dingley, A.J., Bruhn, H., Leippe, M., and Grötzinger, J. (2004) Solution Structure of the Pore-forming Protein of Entamoeba histolytica. *J Biol Chem* **279**: 17834–17841.

Heidelberg, J.F., Elsen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., et al. (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae. *Nature* **406**: 477–483.

Van der Henst, C., Scrignari, T., Maclachlan, C., and Blokesch, M. (2015) An intracellular replication

niche for Vibrio cholerae in the amoeba Acanthamoeba castellanii. *ISME J* **10**: 1–14.
Van der Henst, C., Vanhove, A.S., Drebes Dörr, N.C., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Clerc, S., et al. (2018) Molecular insights into Vibrio cholerae's intra-amoebal host-pathogen interactions. *Nat Commun* **9**: 3460.
Hess, S., Sausen, N., and Melkonian, M. (2012) Shedding light on vampires: The phylogeny of vampyrellid amoebae revisited. *PLoS One* **7**:.
Hikima, S., Hikima, J. ichi, Rojtinnakorn, J., Hirono, I., and Aoki, T. (2003) Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against Vibrio species. *Gene* **316**: 187–195.
Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (2001) Icm/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **42**: 603–617.
Hilbi, H., Weber, S., and Finsel, I. (2011) Anchors for effectors: Subversion of phosphoinositide lipids by Legionella. *Front Microbiol* **2**: 1–8.
Hiyoshi, H., Kodama, T., Saito, K., Gotoh, K., Matsuda, S., Akeda, Y., et al. (2011) VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for vibrio parahaemolyticus-induced enterotoxicity. *Cell Host Microbe* **10**: 401–409.
Hodgkinson, V. and Petris, M.J. (2012) Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem* **287**: 13549–13555.
Hood, M.. and Winter, P.. (2006) Attachment of Vibrio cholerae under various environmental conditions and to selected substrates. *FEMS Microbiol Ecol* **22**: 215–223.
Hood, M.I. and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**: 525–537.
Horn, M., Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (1999) Novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. related to the Paramecium caudatum symbiont Caedibacter caryophilus. *Environ Microbiol* **1**: 357–367.
Horn, M., Fritsche, T.R., Linner, T., Gautom, R.K., Harzenetter, M.D., and Wagner, M. (2002) Obligate bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. related to the β-Proteobacteria: Proposal of 'Candidatus Procabacter acanthamoebae' gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 599–605.
Horn, M., Harzenetter, M.D., Linner, T., Schmid, E.N., Müller, K.D., Michel, R., and Wagner, M. (2001) Members of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum as intracellular bacteria of Acanthamoebae: Proposal of 'Candidatus Amoebophilus asiaticus'. *Environ Microbiol* **3**: 440–449.
Horn, M., Wagner, M., Müller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer, K.H., and Michel, R. (2000) Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis. *Microbiology* **146**: 1231–1239.
Horwitz, M.A. (1983) Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium (legionella pneumophila) in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 1319–1331.
Hubber, A. and Roy, C.R. (2010) Modulation of Host Cell Function by Legionella pneumophila Type IV Effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 261–283.
Hunt, D.E., Gevers, D., Vahora, N.M., and Polz, M.F. (2008) Conservation of the chitin utilization pathway in the Vibrionaceae. *Appl Environ Microbiol* **74**: 44–51.

-I-

Ibáñez de Aldecoa, A.L., Zafra, O., and González-Pastor, J.E. (2017) Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front Microbiol* **8**: 1–19.
Igbinosa, E.O. and Okoh, A.I. (2008) Emerging Vibrio species: an unending threat to public health in developing countries. *Res Microbiol* **159**: 495–506.

Insall, R., Müller-Taubenberger, A., Machesky, L., Köhler, J., Simmeth, E., Atkinson, S.J., et al. (2001) Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton* **50**: 115–128.

Isberg, R.R., O'Connor, T.J., and Heidtman, M. (2009) The Legionella pneumophila replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 13–24.

-J-

Jahn, T.L. and Bovee, E.C. (1965) Mechanisms of Movement in Taxonomy of Sarcodina. I. As a Basis for a New Major Dichotomy into Two Classes, Autotractea and Hydraulea. *Am Midl Nat* **73**: 30.

Janssen, K.P., Rost, R., Eichinger, L., and Schleicher, M. (2001) Characterization of CD36/LIMPII Homologues in Dictyostelium discoideum. *J Biol Chem* **276**: 38899–38910.

Jeon, K.W. and Lorch, I.J. (1967) Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp Cell Res* **48**: 236–240.

Jones, G.M. (1985) Paramoeba invadens n. sp. (Amoebida, Paramoebidae), a Pathogenic Amoeba from the Sea Urchin, Strongylocentrotus droebachiensis , in Eastern Canada 1. *J Protozool* **32**: 564–569.

Joshi, A., Kostiuk, B., Rogers, A., Teschler, J., Pukatzki, S., and Yildiz, F.H. (2017) Rules of Engagement: The Type VI Secretion System in Vibrio cholerae. *Trends Microbiol* **25**: 267–279.

Journet, A., Chapel, A., Jehan, S., Adessi, C., Freeze, H., Klein, G., and Garin, J. (1999) Characterization of Dictyostelium discoideum cathepsin D. *J Cell Sci* **112 (Pt 2**: 3833–43.

Juhas, M. (2015) Horizontal gene transfer in human pathogens. *Crit Rev Microbiol* **41**: 101–108.

Jürgens, K. and Matz, C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **81**: 413–434.

-K-

Kahane, S., Dvoskin, B., Mathias, M., and Friedman, M.G. (2001) Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis Survival within Amoebal Cysts. *Society* **67**: 4789–4795.

Kambe, T., Matsunaga, M., and Takeda, T.A. (2017) Understanding the contribution of zinc transporters in the function of the early secretory pathway. *Int J Mol Sci* **18**: 1–18.

Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Itsumura, N. (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev* **95**: 749–784.

Kang, S., Tice, A.K., Spiegel, F.W., Silberman, J.D., Pánek, T., Cepicka, I., et al. (2017) Between a Pod and a Hard Test: The Deep Evolution of Amoebae. *Mol Biol Evol* **34**: 2258–2270.

Katoh, K. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**: 3059–3066.

Kebbi-beghdadi, C. and Greub, G. (2014) Importance of amoebae as a tool to isolate amoeba-resisting microorganisms and for their ecology and evolution : the Chlamydia paradigm. **6**: 309–324.

Kelleher, J.F., Atkinson, S.J., and Pollard, T.D. (1995) Sequences, structural models, and cellular localization of the actin- related proteins Arp2 and Arp3 from Acanthamoeba. *J Cell Biol* **131**: 385–397.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., and Gibson, L. (2009) Two pathogens of greenshell™ mussel larvae, perna canaliculus: Vibrio splendidus and a V. coralliilyticus/neptunius-like isolate. *J Fish Dis* **32**: 499–507.

Kim, D.Y., Countway, P.D., Jones, A.C., Schnetzer, A., Yamashita, W., Tung, C., and Caron, D.A. (2014) Monthly to interannual variability of microbial eukaryote assemblages at four depths in the eastern North Pacific. *ISME J* **8**: 515–530.

Kim, J.H., Matin, A., Shin, H.J., Park, H., Yoo, K.T., Yuan, X.Z., et al. (2012) Functional roles of mannose-binding protein in the adhesion, cytotoxicity and phagocytosis of Acanthamoeba castellanii. *Exp Parasitol* **132**: 287–292.

Kim, J.Y., Na, B.K., Song, K.J., Park, M.H., Park, Y.K., and Kim, T.S. (2012) Functional expression and characterization of an ironcontaining superoxide dismutase of Acanthamoeba castellanii. *Parasitol Res* **111**: 1673–1682.

Kim, S. and Park, M.G. (2016) Paulinella longichromatophora sp. nov., a New Marine Photosynthetic Testate Amoeba Containing a Chromatophore. *Protist* **167**: 1–12.

Kim, W.S., Kong, K.H., Kim, J.O., Jung, S.J., Kim, J.H., and Oh, M.J. (2017) Amoebic gill disease outbreak in marine fish cultured in Korea. *J Vet Diagnostic Investig* **29**: 357–361.

King, J.S., Gueho, A., Hagedorn, M., Gopaldass, N., Leuba, F., Soldati, T., and Insall, R.H. (2013) WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol Biol Cell* **24**: 2714–2726.

Kodama, T., Rokuda, M., Park, K.S., Cantarelli, V. V, Matsuda, S., Iida, T., and Honda, T. (2007) Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the Vibrio parahaemolyticus type III secretion system 2. *Cell Microbiol* **9**: 2598–2609.

Koehbach, J. and Craik, D.J. (2019) The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends Pharmacol Sci* **40**: 517–528.

Köhler, C.D. and Dobrindt, U. (2011) What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? *Int J Med Microbiol* **301**: 642–647.

Kolonko, M., Geffken, A.C., Blumer, T., Hagens, K., Schaible, U.E., and Hagedorn, M. (2014) WASH-driven actin polymerization is required for efficient mycobacterial phagosome maturation arrest. *Cell Microbiol* **16**: 232–246.

König, L., Wentrup, C., Schulz, F., Wascher, F., Escola, S., Swanson, M.S., et al. (2019) Symbiont-Mediated Defense against Legionella pneumophila in Amoebae. *MBio* **10**: 1–18.

Kudryashov, D.S., Oztug Durer, Z.A., Ytterberg, A.J., Sawaya, M.R., Pashkov, I., Prochazkova, K., et al. (2008) Connecting actin monomers by iso-peptide bond is a toxicity mechanism of the Vibrio cholerae MARTX toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18537–18542.

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.

Kudryavtsev, A., Pawlowski, J., and Hausmann, K. (2011) Description of Paramoeba atlantica n. sp. (Amoebozoa, Dactylopodida) - a Marine Amoeba from the Eastern Atlantic, with emendation of the dactylopodid families. *Acta Protozool* **50**: 239–253.

Kuwae, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y., and Abe, A. (2016) BteA secreted from the Bordetella bronchiseptica type III secetion system induces necrosis through an actin cytoskeleton signaling pathway and inhibits phagocytosis by macrophages. *PLoS One* **11**: 1–20.

Kwaik, Y.A. (1996) The phagosome containing Legionella pneumophila within the protozoan Hartmannella vermiformis is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2022–2028.

-L-

Labreuche, Y., Le Roux, F., Henry, J., Zatylny, C., Huvet, A., Lambert, C., et al. (2010) Vibrio aestuarianus zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster Crassostrea gigas and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immunol* **29**: 753–758.

Labreuche, Y., Chenivesse, S., Jeudy, A., Le Panse, S., Boulo, V., Ansquer, D., et al. (2017) Nigritoxin is

a bacterial toxin for crustaceans and insects. *Nat Commun* **8**:.
Lahr, D.J.G., Parfrey, L.W., Mitchell, E.A.D., Katz, L.A., and Lara, E. (2011) The chastity of amoebae: Re-evaluating evidence for sex in amoeboid organisms. *Proc R Soc B Biol Sci* **278**: 2081–2090.
Lamberti, Y.A., Hayes, J.A., Perez Vidakovics, M.L., Harvill, E.T., and Rodriguez, M.E. (2010) Intracellular trafficking of Bordetella pertussis in human macrophages. *Infect Immun* **78**: 907–913.
Landers, P., Kerr, K.G., Rowbotham, T.J., Tipper, J.L., Keig, P.M., Ingham, E., and Denton, M. (2000) Survival and growth of Burkholderia cepacia within the free-living amoeba Acanthamoeba polyphaga. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 121–123.
Lardy, B., Bof, M., Aubry, L., Paclet, M.H., Morel, F., Satre, M., and Klein, G. (2005) NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in Dictyostelium discoideum. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1744**: 199–212.
Lee, C. Te, Pajuelo, D., Llorens, A., Chen, Y.H., Leiro, J.M., Padrós, F., et al. (2013) MARTX of Vibrio vulnificus biotype 2 is a virulence and survival factor. *Environ Microbiol* **15**: 419–432.
Lee, X., Reimmann, C., Greub, G., Sufrin, J., and Croxatto, A. (2012) The Pseudomonas aeruginosa toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in Acanthamoeba castellanii. *Microbes Infect* **14**: 268–272.
Leippe, M. (2014) Pore-forming toxins from pathogenic amoebae. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 4347–4353.
Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O.L., Horstmann, R.D., and Müller-Eberhard, H.J. (1991) Pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytica. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7659–7663.
Lemgruber, L., Lupetti, P., De Souza, W., Vommaro, R.C., and Da Rocha-Azevedo, B. (2010) The fine structure of the Acanthamoeba polyphaga cyst wall. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 170–176.
Lemire, A., Goudenège, 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* **December 9**: 1–9.
Lemire, J.A., Harrison, J.J., and Turner, R.J. (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* **11**: 371–384.
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. Le, Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., et al. (2015) The emergence of Vibrio pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). *Front Microbiol* **6**: 830.
Le Roux, F., Zouine, M., Chakroun, N., Binesse, J., Saulnier, D., Bouchier, C., et al. (2009) Genome sequence of Vibrio splendidus: An abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environ Microbiol* **11**: 1959–1970.
Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J.L., Gouy, M., and Berthe, F. (2004) Phylogenetic study and identification of Vibrio splendidus-related strains based on gyrB gene sequences. *Dis Aquat Organ* **58**: 143–150.
Letunic, I. and Bork, P. (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **47**: W256–W259.
Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., and Jia, M. (2019) Molecular mechanisms of Vibrio parahaemolyticus pathogenesis. *Microbiol Res* **222**: 43–51.
Lichanska, A.M. and Hume, D.A. (2000) Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol* **28**: 601–611.
Linz, B., Ma, L., Rivera, I., and Harvill, E.T. (2019) Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens: lesson from the genus Bordetella. *Curr Opin Infect Dis* **32**: 223–230.
Lippi, D., Gotuzzo, E., and Caini, S. (2016) Cholera. *Microbiol Spectr* **4**: 173–180.
Loomis, W.F. (2014) Cell signaling during development of dictyostelium. *Dev Biol* **391**: 1–16.
Loovers, H.M., Kortholt, A., de Groote, H., Whitty, L., Nussbaum, R.L., and van Haastert, P.J.M. (2007) Regulation of phagocytosis in Dictyostelium by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog

Dd5P4. *Traffic* **8**: 618–628.
López-Jiménez, A.T., Cardenal-Muñoz, E., Leuba, F., Gerstenmaier, L., Barisch, C., Hagedorn, M., et al. (2018) The ESCRT and autophagy machineries cooperate to repair ESX-1-dependent damage at the Mycobacterium-containing vacuole but have opposite impact on containing the infection. *PLoS Pathog* **14**: 1–29.
Lopez-Joven, C., Rolland, J.L., Haffner, P., Caro, A., Roques, C., Carré, C., et al. (2018) Oyster Farming, Temperature, and Plankton Influence the Dynamics of Pathogenic Vibrios in the Thau Lagoon. *Front Microbiol* **9**: 2530.
Lorenzo-Morales, J., Khan, N.A., and Walochnik, J. (2015) An update on Acanthamoeba keratitis: Diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* **22**:.
Loś, J.M., Łoś, M., Węgrzyn, A., and Węgrzyn, G. (2010) Hydrogen peroxide-mediated induction of the Shiga toxin-converting lambdoid prophage ST2-8624 in Escherichia coli O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol* **58**: 322–329.
Lu, H. and Clarke, M. (2005) Dynamic properties of Legionella-containing phagosomes in Dictyostelium amoebae. *Cell Microbiol* **7**: 995–1007.
Luscher, A., Fröhlich, F., Barisch, C., Littlewood, C., Metcalfe, J., Leuba, F., et al. (2019) Lowe syndrome–linked endocytic adaptors direct membrane cycling kinetics with OCRL in Dictyostelium discoideum. *Mol Biol Cell* **30**: 2268–2282.
Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., and McDougald, D. (2013) Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of Vibrio cholerae. *Front Microbiol* **4**: 1–15.

-M-

Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., and Sørensen, S.J. (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol* **65**: 183–195.
Magoč, T. and Salzberg, S.L. (2011) FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957–2963.
Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2014) Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* **2014**: 1–13.
Mahoney, J.C., Gerding, M.J., Jones, S.H., and Whistler, C.A. (2010) Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical Vibrio parahaemolyticus strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7459–7465.
Maita, C., Matsushita, M., Miyoshi, M., Okubo, T., Nakamura, S., Matsuo, J., et al. (2018) Amoebal endosymbiont Neochlamydia protects host amoebae against Legionella pneumophila infection by preventing Legionella entry. *Microbes Infect* **20**: 236–244.
Mandel, M.J. and Dunn, A.K. (2016) Impact and influence of the natural vibrio-squid symbiosis in understanding bacterial-animal interactions. *Front Microbiol* **7**: 1–10.
March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J.M., et al. (2013) Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of Klebsiella pneumoniae with Phagocytes. *PLoS One* **8**: 1–16.
Marchetti, A., Lelong, E., and Cosson, P. (2009) A measure of endosomal pH by flow cytometry in Dictyostelium. *BMC Res Notes* **2**: 1–8.
Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J., and Houssin, M. (2011) Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster , Crassostrea gigas between 2008 and 2010. *Virus Res* **160**: 25–31.
Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10.
Mast, S.O. (1926) Structure, movement, locomotion, and stimulation in amoeba. *J Morphol* **41**: 347–425.
Mathur, J. and Waldor, M.K. (2004) The Vibrio cholerae ToxR-regulated porin OmpU confers

resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**: 3577–3583.
Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S., and Khan, N.A. (2008) Increasing importance of Balamuthia mandrillaris. *Clin Microbiol Rev* **21**: 435–448.
Matsuo, J., Oguri, S., Nakamura, S., Hanawa, T., Fukumoto, T., Hayashi, Y., et al. (2010) Ciliates rapidly enhance the frequency of conjugation between Escherichia coli strains through bacterial accumulation in vesicles. *Res Microbiol* **161**: 711–719.
Mattoo, S. and Cherry, J.D. (2005) Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to. *Society* **18**: 326–382.
Matz, C. and Jürgens, K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 921–929.
Matz, C. and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook - How bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302–307.
Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H., and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16819–16824.
Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008) Pseudomonas aeruginosa uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *ISME J* **2**: 843–852.
Matz, C., Nouri, B., McCarter, L., and Martinez-Urtaza, J. (2011) Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic vibrio parahaemolyticus in the interaction with bacterivorous protists. *PLoS One* **6**:.
Mazzola, M., De Bruijn, I., Cohen, M.F., and Raaijmakers, J.M. (2009) Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for Pseudomonas fluorescens. *Appl Environ Microbiol* **75**: 6804–6811.
McCuddin, Z.P., Carlson, S.A., Rasmussen, M.A., and Franklin, S.K. (2006) Klebsiella to Salmonella gene transfer within rumen protozoa: Implications for antibiotic resistance and rumen defaunation. *Vet Microbiol* **114**: 275–284.
McMurdie, P.J. and Holmes, S. (2013) Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **8**:.
Meiborn, K.L., Li, X.B., Nielsen, A.T., Wu, C.Y., Roseman, S., and Schoolnik, G.K. (2004) The Vibrio cholerae chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2524–2529.
Melcarne, C., Lemaitre, B., and Kurant, E. (2019) Phagocytosis in Drosophila: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem Mol Biol* **109**: 1–12.
Metzstein, M.M., Stanfield, G.M., and Horvitz, H.R. (1998) Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. *Trends Genet* **14**: 410–416.
Michalek, M., Sönnichsen, F.D., Wechselberger, R., Dingley, A.J., Hung, C.W., Kopp, A., et al. (2013) Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic acanthamoeba. *Nat Chem Biol* **9**: 37–42.
Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizarro-Cerdá, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud, E., et al. (2015) The legionella kinase legk2 targets the arp2/3 complex to inhibit actin nucleation on phagosomes and allow bacterial evasion of the late endocytic pathway. *MBio* **6**: 1–14.
Michel, R. and Hauröder, B. (1997) Isolation of an Acanthamoeba strain with intracellular Burkholderia pickettii infection. *Zentralblatt fur Bakteriol* **285**: 541–557.
Miyata, S.T., Kitaoka, M., Brooks, T.M., McAuley, S.B., and Pukatzki, S. (2011) Vibrio cholerae requires the type VI secretion system virulence factor vasx to kill dictyostelium discoideum. *Infect Immun* **79**: 2941–2949.
Molmeret, M. and Abu Kwaik, Y. (2002) How does Legionella pneumophila exit the host cell? *Trends Microbiol* **10**: 258–260.
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.
Molofsky, A.B. and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: Lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29–40.

De Moraes, J. and Alfieri, S.C. (2008) Growth, encystment and survival of Acanthamoeba castellanii grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 221–229.

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. . *J Eukaryot Microbiol* **54**: 169–183.

Müller, I., Šubert, N., Otto, H., Herbst, R., Rühling, H., Maniak, M., and Leippe, M. (2005) A dictyostelium mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *J Biol Chem* **280**: 10435–10443.

Müller, M. (1969) Lysosomal Hydrolases in Acanthamoeba sp. *J Protozool* **16**: 428–431.

Munday, B.L., Zilberg, D., and Findlay, V. (2001) Gill disease of marine fish caused by infection with Neoparamoeba pemaquidensis. *J Fish Dis* **24**: 497–507.

Munn, C.B. (2015) The Role of Vibrios in Diseases of Corals. *Microbiol Spectr* **3**: 1–12.

Munson, D.A. (1992) Marine Amoebae from Georgia Coastal Surface Waters. *Trans Am Microsc Soc* **111**: 360.

-N-

Nasser, W., Santhanam, B., Miranda, E.R., Parikh, A., Juneja, K., Rot, G., et al. (2013) Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Curr Biol* **23**: 862–872.

Nassonova, 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.

Nguyen-Viet, H., Bernard, N., Mitchell, E.A.D., Badot, P.M., and Gilbert, D. (2008) Effect of lead pollution on testate amoebae communities living in Sphagnum fallax: An experimental study. *Ecotoxicol Environ Saf* **69**: 130–138.

Nguyen, A.N., Disconzi, E., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., Bouloc, P., Le Roux, F., and Jacq, A. (2018) csrB Gene Duplication Drives the Evolution of Redundant Regulatory Pathways Controlling Expression of the Major Toxic Secreted Metalloproteases in Vibrio tasmaniensis LGP32. *mSphere* **3**: 1–17.

Niewöhner, J., Weber, I., Maniak, M., Müller-Taubenberger, A., and Gerisch, G. (1997) Talin-Null Cells of Dictyostelium Are Strongly Defective in Adhesion to Particle and Substrate Surfaces and Slightly Impaired in Cytokinesis. *J Cell Biol* **138**: 349–361.

Nikolaev, S.I., Berney, C., Petrov, N.B., Mylnikov, A.P., Fahrni, J.F., and Pawlowski, J. (2006) Phylogenetic position of Multicilia marina and the evolution of Amoebozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 1449–1458.

Nikolaev, S.I., Mitchell, E.A.D., Petrov, N.B., Berney, C., Fahrni, J., and Pawlowski, J. (2005) The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist* **156**: 191–202.

Noga, E.J., Smolowitz, R., and Khoo, L.H. (2000) Pathology of shell disease in the blue crab, Callinectes sapidus Rathbun, (Decapoda: Portunidae). *J Fish Dis* **23**: 389–399.

Nomoto, K., Umeda, Y., and Yasukawa, H. (2010) Identification of the Dictyostelium discoideum gene for a protein showing sequence similarity to iron superoxide dismutase. *Japanese J Protozool* **43**: 19–23.

Noorian, P., Hu, J., Chen, Z., Kjelleberg, S., Wilkins, M.R., Sun, S., and McDougald, D. (2017) Pyomelanin produced by Vibrio cholerae confers resistance to predation by Acanthamoeba castellanii. *FEMS Microbiol Ecol* **93**: 1–10.

Novohradská, S., Ferling, I., and Hillmann, F. (2017) Exploring virulence determinants of filamentous fungal pathogens through interactions with soil amoebae. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:.

Nowak, B.F. and Archibald, J.M. (2018) Opportunistic but Lethal: The Mystery of Paramoebae. *Trends Parasitol* **34**: 404–419.

-O-

O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., and Isberg, R.R. (2011) Minimization of the Legionella pneumophila genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2011) 108, 36 (14733-14740) DOI: 10.1073/pnas.1111678. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 17856.

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

Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., et al. (2019) Package ' vegan '.

Oldham, T., Rodger, H., and Nowak, B.F. (2016) Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) - An epidemiological review. *Aquaculture* **457**: 35–42.

Olofsson, J., Axelsson-Olsson, D., Brudin, L., Olsen, B., and Ellström, P. (2013) Campylobacter jejuni actively invades the amoeba Acanthamoeba polyphaga and survives within non digestive vacuoles. *PLoS One* **8**:.

Orsi, W., Edgcomb, V., Jeon, S., Leslin, C., Bunge, J., Taylor, G.T., et al. (2011) Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. II. Habitat specialization. *ISME J* **5**: 1357–1373.

-P-

Page, F.C. (1983) Marine Gymnamoebae. 129–130.

Page, F.C. (1973) Paramoeba: A Common Marine Genus. *Hydrobiologia* **41**: 183–188.

Page, F.C. (1969) Platyamoeba stenopodia. n. g., n. sp., a Freshwater Amoeba*. *J Protozool* **16**: 437–441.

Page, F.C. (1987b) The Classification of 'Naked' Amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch fur Protistenkd* **133**: 199–217.

Page, F.C. (1987a) Transfer of Stachyamoeba lipophora to the Class Heterolobosea. *Arch fur Protistenkd* **133**: 191–197.

Page, F.C. (1970) Two New Species of Paramoeba from Maine*. *J Protozool* **17**: 421–427.

Page, F.C. and Blakey, S.M. (1979) Cell surface structure as a taxonomic character in the Thecamoebidae (Protozoa: Gymnamoebia). *Zool J Linn Soc* **66**: 113–135.

Pagnier, I., Yutin, N., Croce, O., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Benamar, S., et al. (2015) Babela massiliensis, a representative of a widespread bacterial phylum with unusual adaptations to parasitism in amoebae. *Biol Direct* **10**: 1–17.

Pan, Y.J., Lin, T.L., Hsu, C.R., and Wang, J.T. (2011) Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in Klebsiella pneumoniae. *Infect Immun* **79**: 997–1006.

Pan, M., Neilson, M.P., Grunfeld, A.M., Cruz, P., Wen, X., Insall, R.H., and Jin, T. (2018) A G-protein-coupled chemoattractant receptor recognizes lipopolysaccharide for bacterial phagocytosis. *PLoS Biol* **16**: 1–20.

Panek, T. and Epik, I. (2012) Diversity of Heterolobosea. *Genet Divers Microorg*.

Parfrey, L.W., Grant, J., Tekle, Y.I., Lasek-Nesselquist, E., Morrison, H.G., Sogin, M.L., et al. (2010) Broadly sampled multigene analyses yield a well-resolved eukaryotic tree of life. *Syst Biol* **59**: 518–533.

Park, J., Zhang, Y., Chen, C., Dudley, E.G., and Harvill, E.T. (2015) Diversity of secretion systems

associated with virulence characteristics of the classical bordetellae. *Microbiol (United Kingdom)* **161**: 2328–2340.

Park, J.S. (2017) A New Heterolobosean Amoeboflagellate, Tetramitus dokdoensis n. sp., Isolated from a Freshwater Pond on Dokdo Island in the East Sea, Korea. *J Eukaryot Microbiol* **64**: 771–778.

Park, J.S., De Jonckheere, J.F., and Simpson, A.G.B. (2012) Characterization of Selenaion koniopes n. gen., n. sp., an amoeba that represents a new major lineage within heterolobosea, isolated from the Wieliczka salt mine. *J Eukaryot Microbiol* **59**: 601–613.

Peracino, B., Balest, A., and Bozzaro, S. (2010) Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to Legionella infection in Dictyostelium. *J Cell Sci* **123**: 4039–4051.

Peracino, B., Buracco, S., and Bozzaro, S. (2013) The Nramp (Slc11) proteins regulate development, resistance to pathogenic bacteria and iron homeostasis in Dictyostelium discoideum. *J Cell Sci* **126**: 301–311.

Peracino, B., Wagner, C., Balest, A., Balbo, A., Pergolizzi, B., Noegel, A.A., et al. (2006) Function and mechanism of action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic* **7**: 22–38.

Pernet, F., Barret, J., Gall, P. Le, Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., et al. (2012) Mass mortalities of Pacific oysters Crassostrea gigas reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon , France. **2**: 215–237.

Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol* **3**: 537–546.

Pernthaler, J., Sattler, B., Šimek, K., Schwarzenbacher, A., and Psenner, R. (1996) Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquat Microb Ecol* **10**: 255–263.

Piel, D., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Lambert, C., Janicot, A., et al. (2019) Selection of Vibrio crassostreae relies on a plasmid expressing a type 6 secretion system cytotoxic for host immune cells. *Environ Microbiol* 1462–2920.14776.

Pomorski, P., Krzemiński, P., Wasik, A., Wierzbicka, K., Barańska, J., and Kłopocka, W. (2007) Actin dynamics in Amoeba proteus motility. *Protoplasma* **231**: 31–41.

Poolman, J.T. and Wacker, M. (2016) Extraintestinal pathogenic Escherichia coli, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. *J Infect Dis* **213**: 6–13.

Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010) FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**:.

Proca-Ciobanu, M., Lupascu, G., Petrovici, A., and Ionescu, M.D. (1975) Electron microscopic study of a pathogenic Acanthamoeba castellani strain: The presence of bacterial endosymbionts. *Int J Parasitol* **5**: 49–56.

Pukatzki, S., Kessin, R.H., and Mekalanos, J.J. (2002) The human pathogen Pseudomonas aeruginosa utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3159–3164.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2007) Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15508–15513.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1528–1533.

-R-

Radosa, S., Ferling, I., Sprague, J.L., Westermann, M., and Hillmann, F. (2019) The different morphologies of yeast and filamentous fungi trigger distinct killing and feeding mechanisms in a

fungivorous amoeba. *Environ Microbiol* **21**: 1809–1820.
Reczuga, M.K., Swindles, G.T., Grewling, Ł., and Lamentowicz, M. (2015) Arcella peruviana sp. nov. (Amoebozoa: Arcellinida, Arcellidae), a new species from a tropical peatland in Amazonia. *Eur J Protistol* **51**: 437–449.
Reddien, P.W. and Horvitz, H.R. (2004) THE ENGULFMENT PROCESS OF PROGRAMMED CELL DEATH IN CAENORHABDITIS ELEGANS. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 193–221.
Ribeiro, N.S., dos Santos, F.M., Garcia, A.W.A., Ferrareze, P.A.G., Fabres, L.F., Schrank, A., et al. (2017) Modulation of zinc homeostasis in Acanthamoeba castellanii as a possible antifungal strategy against Cryptococcus gattii. *Front Microbiol* **8**: 1–11.
Rivero, F. and Xiong, H. (2016) Rho Signaling in Dictyostelium discoideum. In, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc., pp. 61–181.
Robino, E., Poirier, A.C., Amraoui, H., Le Bissonnais, S., Perret, A., Lopez-Joven, C., et al. (2019) Resistance of the oyster pathogen Vibrio tasmaniensis LGP32 against grazing by Vannella sp . marine amoeba involves Vsm and CopA virulence factors . *Environ Microbiol* **00**:.
Robinson, B.S., Christy, P.E., and De Jonckheere, J.F. (1989) A temporary flagellate (mastigote) stage in the vahlkampfiid amoeba Willaertia magna and its possible evolutionary significance. *BioSystems* **23**: 75–86.
Rodríguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* **20**: 225–241.
Rogerson, A. (1991) On the abundance of marine naked amoebae on the surface of five species of macroalgae. *FEMS Microbiol Lett* **85**: 301–312.
Rogerson, A. (1993) Parvamoeba rugata n. g., n. sp., (Gymnamoebia, Thecamoebidae): An exceptionally small marine naked amoeba. *Eur J Protistol* **29**: 446–452.
Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**: 1–22.
Romeralo, M., Spiegel, F.W., and Baldauf, S.L. (2010) A Fully Resolved Phylogeny of the Social Amoebas (Dictyostelia) Based on Combined SSU and ITS rDNA Sequences. *Protist* **161**: 539–548.
Rosales, C. and Uribe-Querol, E. (2017) Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int* **2017**: 1–18.
Rosenberg, E. and Falkovitz, L. (2004) The Vibrio shiloi / Oculina patagonica Model System of Coral Bleaching. *Annu Rev Microbiol* **58**: 143–159.
Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.
Rubenina, I., Kirjušina, M., Berzins, A., Valcina, O., and Jahundoviča, I. (2017) Relationships between free-living amoeba and their intracellular bacteria. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact, Appl Sci* **71**: 259–265.
Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., et al. (2019) Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of *Vibrio* infections. *Proc Natl Acad Sci* 201905747.
Rupper, A., Grove, B., and Cardelli, J. (2001) Rab7 regulates phagosome maturation in Dictyostelium. *J Cell Sci* **114**: 2449–2460.

-S-

Saeed, A., Abd, H., Edvinsson, B., and Sandström, G. (2007) Vibrio cholerae-Acanthamoeba castellanii interaction showing endosymbiont-host relation. In, *Symbiosis*., pp. 153–158.
Saisongkorh, W., Robert, C., La Scola, B., Raoult, D., and Rolain, J.M. (2010) Evidence of transfer by conjugation of type IV secretion system genes between bartonella species and rhizobium radiobacter in amoeba. *PLoS One* **5**: 1–14.
Sakai, T., Hirae, T., Yuasa, K., Kamaishi, T., Matsuyama, T., Miwa, S., et al. (2007) Mass mortality of cultured kuruma prawn Penaeus japonicus caused by vibrio nigripulchritudo. *Fish Pathol* **42**:

141–147.
Sakib, S.N., Reddi, G., and Almagro-Moreno, S. (2018) Environmental role of pathogenic traits in Vibrio cholerae. *J Bacteriol* **200**: 1–12.
Salah, I.B., Ghigo, E., and Drancourt, M. (2009) Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* **15**: 894–905.
Salmond, G.P.C. and Fineran, P.C. (2015) A century of the phage: Past, present and future. *Nat Rev Microbiol* **13**: 777–786.
Salt, G.W. (1968) The Feeding of Amoeba proteus on Paramecium aurelia *. *J Protozool* **15**: 275–280.
Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M.-H., Cateau, E., and Héchard, Y. (2019) Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol Rev* **43**: 415–434.
Sanchez, J.F., Lescar, J., Chazalet, V., Audfray, A., Gagnon, J., Alvarez, R., et al. (2006) Biochemical and structural analysis of Helix pomatia agglutinin: A hexameric lectin with a novel fold. *J Biol Chem* **281**: 20171–20180.
Sandström, G., Saeed, A., and Abd, H. (2010) Acanthamoeba polyphaga is a possible host for Vibrio cholerae in aquatic environments. *Exp Parasitol* **126**: 65–68.
Satchell, K.J. (2009) Actin Crosslinking Toxins of Gram-Negative Bacteria. *Toxins (Basel)* **1**: 123–133.
Sattler, N., Bosmani, C., Barisch, C., Guého, A., Gopaldass, N., Dias, M., et al. (2018) Functions of the Dictyostelium LIMP-2 and CD36 homologues in bacteria uptake, phagolysosome biogenesis and host cell defence. *J Cell Sci* **131**:.
Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y., and Miura, H. (2007) Mass Mortality of Japanese Abalone Haliotis discus hannai Caused by Vibrio harveyi Infection. *Microbes Environ* **22**: 300–308.
Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Rohul Amin, A.K.M., Mino, S., et al. (2013) Updating the Vibrio clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of Vibrio tritonius sp. nov. *Front Microbiol* **4**: 1–14.
Sawyer, T.K. (1975a) Clydonella N. G. (Amoebida: Thecamoebidae), proposed to provide an appropriate generic home for Schaeffer's marine species of Rugipes, C. vivax (Schaeffer, 1926) n. comb. *Trans Am Microsc Soc* **94**: 395–400.
Sawyer, T.K. (1975b) Marine Amoebae from Surface Waters of Chincoteague Bay, Virginia: One New Genus and Eleven New Species within the Families Thecamoebidae and Hyalodiscidae. *Trans Am Microsc Soc* **94**: 305.
Schaap, P. (2016) Evolution of developmental signalling in Dictyostelid social amoebas. *Curr Opin Genet Dev* **39**: 29–34.
Schaap, P. (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: Dictyostelium discoideum. *Development* **138**: 387–396.
Schaeffer, A.A. (1926) DO CILIATED ORGANISMS ROTATE COUNTER-CLOCKWISE WHILE SWIMMING? *Science (80-)* **64**: 40–40.
Schaeffer, A.A. (1918) Three New Species of Amebas: Amoeba bigemma nov. spec., Pelomyxa lentissima nov. spec. and P. schiedti nov. spec. *Trans Am Microsc Soc* **37**: 79.
Scheid, P. (2014) Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol Res* **113**: 2407–2417.
Schlimme, W., Marchiani, M., Hanselmann, K., and Jenni, B. (2006) Gene transfer between bacteria within digestive vacuoles of protozoa. *FEMS Microbiol Ecol* **23**: 239–247.
Schulz, F., Lagkouvardos, I., Wascher, F., Aistleitner, K., Kostanjšek, R., and Horn, M. (2014) Life in an unusual intracellular niche: A bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae. *ISME J* **8**: 1634–1644.
Schulz, F., Tyml, T., Pizzetti, I., Dyková, I., Fazi, S., Kostka, M., and Horn, M. (2015) Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Sci Rep* **5**: 1–10.
La Scola, B. and Raoult, D. (1999) Afipia felis in hospital water supply in association with free-living amoebae. *Lancet* **353**: 1330.
Seastone, D.J., Harris, E., Temesvari, L.A., Bear, J.E., Saxe, C.L., and Cardelli, J. (2001) The WASp-like

protein scar regulates macropinocytosis, phagocytosis and endosomal membrane flow in Dictyostelium. *J Cell Sci* **114**: 2673–2683.
Segal, G. and Shuman, H.A. (1999) Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages. *Infect Immun* **67**: 2117–2124.
Shanan, S., Abd, H., Hedenström, I., Saeed, A., and Sandström, G. (2011) Detection of Vibrio cholerae and Acanthamoeba species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC Res Notes* **4**: 109.
Shanan, S., Bayoumi, M., Saeed, A., Sandström, G., and Abd, H. (2016) Swedish isolates of Vibrio cholerae enhance their survival when interacted intracellularly with Acanthamoeba castellanii. *Infect Ecol Epidemiol* **6**: 31060.
Sherr, B., Sherr, E., Caron, D., Vaulot, D., and Worden, A. (2007) Oceanic Protists. *Oceanography* **20**: 130–134.
Sherr, E.B. and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **81**: 293–308.
Shiratori, T. and Ishida, K.I. (2016) Trachyrhizium urniformis n. g., n. sp., a Novel Marine Filose Thecate Amoeba Related to a Cercozoan Environmental Clade (Novel Clade 4). *J Eukaryot Microbiol* **63**: 722–731.
Shirley, D.A.T., Farr, L., Watanabe, K., and Moonah, S. (2018) A review of the global burden, new diagnostics, and current Therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infect Dis* **5**: 1–9.
Sibbald, S.J., Cenci, U., Colp, M., Eglit, Y., O'Kelly, C.J., and Archibald, J.M. (2017) Diversity and Evolution of Paramoeba spp. and their Kinetoplastid Endosymbionts. *J Eukaryot Microbiol* **64**: 598–607.
Siddiqui, R. and Khan, N.A. (2012) Acanthamoeba is an evolutionary ancestor of macrophages: A myth or reality? *Exp Parasitol* **130**: 95–97.
Simon, S. and Hilbi, H. (2015) Subversion of Cell-Autonomous Immunity and Cell Migration by Legionella pneumophila Effectors. *Front Immunol* **6**: 1–11.
Sims, G.P., Rogerson, A., and Aitken, R. (1999) Primary and secondary structure of the small-subunit ribosomal RNA of the naked, marine amoeba Vannella anglica: Phylogenetic implications. *J Mol Evol* **48**: 740–749.
Smirnov, A. and Brown, S. (2004) Guide To the Methods of Study and Identification of Soil Gymnamoebae. *Protistology* 148–190.
Smirnov, A., Nassonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I., and Pawlowski, J. (2005) Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist* **156**: 129–142.
Smirnov, A. and Thar, R. (2004) Vertical distribution of gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in the top layer of brackish-water sediments. *Protist* **155**: 437–446.
Smirnov, A. V. (2007) Cryptic freshwater amoeba species in the bottom sediments of Nivå Bay (Øresund, Baltic Sea). *Eur J Protistol* **43**: 87–94.
Smirnov, A. V., Bedjagina, O.M., and Goodkov, A. V. (2011) Dermamoeba algensis n. sp. (Amoebozoa, Dermamoebidae) - An algivorous lobose amoeba with complex cell coat and unusual feeding mode. *Eur J Protistol* **47**: 67–78.
Smirnov, A. V., Nassonova, E.S., Chao, E., and Cavalier-Smith, T. (2007) Phylogeny, Evolution, and Taxonomy of Vannellid Amoebae. *Protist* **158**: 295–324.
Smith, J., Manoranjan, J., Pan, M., Bohsali, A., Xu, J., Liu, J., et al. (2008) Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape from the vacuole. *Infect Immun* **76**: 5478–5487.
Smith, L.M. and May, R.C. (2013) Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem Soc Trans* **41**: 475–490.
Soldati, T. and Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)! *Traffic* **13**: 1042–52.
Solomon, J.M., Leung, G.S., and Isberg, R.R. (2003) Intracellular Replication of Mycobacterium marinum within Dictyostelium discoideum: Efficient Replication in the Absence of Host Coronin. *Society* **71**: 3578–3586.

Soumana, I.H., Linz, B., and Harvill, E.T. (2017) Environmental origin of the genus Bordetella. *Front Microbiol* **8**: 1–10.

Souza, G.M., Hirai, J., Mehta, D.P., and Freeze, H.H. (1995) Identification of two novel Dictyostelium discoideum cysteine proteinases that carry N-acetylglucosamine-1-P modification. *J Biol Chem* **270**: 28938–28945.

Souza, G.M., Mehta, D.P., Lammertz, M., Rodriguez-Paris, J., Wu, R., Cardelli, J.A., and Freeze, H.H. (1997) Dictyostelium lysosomal proteins with different sugar modifications sort to functionally distinct compartments. *J Cell Sci* **110**: 2239–2248.

Speare, L., Cecere, A.G., Guckes, K.R., Smith, S., Wollenberg, M.S., Mandel, M.J., et al. (2018) Bacterial symbionts use a type VI secretion system to eliminate competitors in their natural host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E8528–E8537.

Sprague, V., Beckett, R.L., and Sawyer, T.K. (1969) A new species of Paramoeba (Amoebida, Paramoebidae) parasitic in the crab Callinectes sapidus. *J Invertebr Pathol* **14**: 167–174.

Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., and Visvesvara, G.S. (2008) Survival of Acanthamoeba cysts after desiccation for more than 20 years. *J Clin Microbiol* **46**: 4045–4048.

Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M.D.M., Breiner, H.W., and Richards, T.A. (2010) Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Mol Ecol* **19**: 21–31.

Stone, B.J. and Abu Kwaik, Y. (1998) Expression of multiple pili by Legionella pneumophila: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**: 1768–1775.

Strassmann, J.E. and Shu, L. (2017) Ancient bacteria–amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *PLoS Biol* **15**: 1–8.

Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A.B. (2005) Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* **22**: 539–550.

Subramanian Vignesh, K. and Deepe, G.S. (2016) Immunological orchestration of zinc homeostasis: The battle between host mechanisms and pathogen defenses. *Arch Biochem Biophys* **611**: 66–78.

Sultan, Z., Miyoshi, S.I., and Shinoda, S. (2006) Presence of LuxS/AI-2 based quorum-sensing system in Vibrio mimicus: LuxO controls protease activity. *Microbiol Immunol* **50**: 407–417.

Sun, S., Kjelleberg, S., and McDougald, D. (2013) Relative Contributions of Vibrio Polysaccharide and Quorum Sensing to the Resistance of Vibrio cholerae to Predation by Heterotrophic Protists. *PLoS One* **8**:.

Sun, S., Noorian, P., and McDougald, D. (2018) Dual role of mechanisms involved in resistance to predation by protozoa and virulence to humans. *Front Microbiol* **9**: 1–12.

Sunaga, N., Monna, M., Shimada, N., Tsukamoto, M., and Kawata, T. (2008) Expression of zinc transporter family genes in Dictyostelium. *Int J Dev Biol* **52**: 377–381.

-T-

Táborský, P., Pánek, T., and Čepička, I. (2017) Anaeramoebidae fam. nov., a Novel Lineage of Anaerobic Amoebae and Amoeboflagellates of Uncertain Phylogenetic Position. *Protist* **168**: 495–526.

Takemura, A.F., Chien, D.M., and Polz, M.F. (2014) Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol* **5**: 38.

Taylor-Mulneix, D.L., Bendor, L., Linz, B., Rivera, I., Ryman, V.E., Dewan, K.K., et al. (2017a) Bordetella bronchiseptica exploits the complex life cycle of Dictyostelium discoideum as an amplifying transmission vector. *PLoS Biol* **15**: 1–28.

Taylor-Mulneix, D.L., Soumana, I.H., Linz, B., and Harvill, E.T. (2017b) Evolution of bordetellae from environmental microbes to human respiratory pathogens: Amoebae as a missing link. *Front Cell Infect Microbiol* **7**: 1–7.

Taylor, D.L. and Condeelis, J.S. (1979) Cytoplasmic Structure and Contractility in Amoeboid Cells.

Taylor, M., Mediannikov, O., Raoult, D., and Greub, G. (2012) Endosymbiotic bacteria associated with nematodes, ticks and amoebae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **64**: 21–31.

Tekle, Y.I., Grant, J., Anderson, O.R., Nerad, T.A., Cole, J.C., Patterson, D.J., and Katz, L.A. (2008) Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within 'Amoebozoa' upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. *Mol Phylogenet Evol* **47**: 339–352.

Tekle, Y.I. and Williams, J.R. (2016) Cytoskeletal architecture and its evolutionary significance in amoeboid eukaryotes and their mode of locomotion. *R Soc Open Sci* **3**:.

Tezcan-merdol, D., Ljungstro, M., Winiecka-krusnell, J., Linder, E., Engstrand, L., and Rhen, M. (2004) Uptake and Replication of Salmonella enterica in Acanthamoeba rhysodes. **70**: 3706–3714.

Thom, S., Warhurst, D., and Drasar, B.S. (1992) Association of Vibrio cholerae with fresh water amoebae. *J Med Microbiol* **36**: 303–306.

Thomas, D.C. (2017) The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent advances. *Immunol Lett* **192**: 88–96.

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., and Greub, G. (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2428–2438.

Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., and Greub, G. (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* **10**: 2728–2745.

Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., and Maillard, J.Y. (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 231–259.

Thompson, F., Thompson, F.L., Iida, T., and Swings, J. (2004) Biodiversity of Vibrios. **68**: 403–431.

Tilney, L.G., Harb, O.S., Connelly, P.S., Robinson, C.G., and Roy, C.R. (2001) How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: Implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**: 4637–4650.

Tobin, D.M. and Ramakrishnan, L. (2008) Comparative pathogenesis of Mycobacterium marinum and Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol* **10**: 1027–1039.

Tomov, A.T., Tsvetkova, E.D., Tomova, I.A., Michailova, L.I., and Kassovski, V.K. (1999) Persistence and multiplication of obligate anaerobe bacteria in amebae under aerobic conditions. *Anaerobe* **5**: 19–23.

Toranzo, A.E., Magariños, B., and Romalde, J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* **246**: 37–61.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., and Lightner, D. V (2013) Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis Aquat Organ* **105**: 45–55.

Trosky, J.E., Mukherjee, S., Burdette, D.L., Roberts, M., McCarter, L., Siegel, R.M., and Orth, K. (2004) Inhibition of MAPK signaling pathways by VopA from Vibrio parahaemolyticus. *J Biol Chem* **279**: 51953–51957.

Tsao, H.F., Scheikl, U., Volland, J.M., Köhsler, M., Bright, M., Walochnik, J., and Horn, M. (2017) 'Candidatus Cochliophilus cryoturris' (Coxiellaceae), a symbiont of the testate amoeba Cochliopodium minus. *Sci Rep* **7**: 1–8.

Tsuji, A., Akaza, Y., Nakamura, S., Kodaira, K.I., and Yasukawa, H. (2003) Multinucleation of the sodC-deficient Dictyostelium discoideum. *Biol Pharm Bull* **26**: 1174–1177.

Turner, N.A. (2000) Emergence of resistance to biocides during differentiation of Acanthamoeba castellanii. *J Antimicrob Chemother* **46**: 27–34.

Tuxworth, R.I., Stephens, S., Ryan, Z.C., and Titus, M.A. (2005) Identification of a myosin VII-talin complex. *J Biol Chem* **280**: 26557–26564.

-U-

Uchiyama, H. (2000) Distribution of Vibrio species isolated from aquatic environments with TCBS agar. *Environ Health Prev Med* **4**: 199–204.

Urbanczyk, H., Ogura, Y., and Hayashi, T. (2014) Contrasting inter-and intraspecies recombination patterns in the 'harveyi clade' vibrio collected over large spatial and temporal scales. *Genome Biol Evol* **7**: 71–80.

Urbanczyk, H., Ogura, Y., and Hayashi, T. (2013) Taxonomic revision of Harveyi clade bacteria (family Vibrionaceae) based on analysis of whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 2742–2751.

Urwyler, S., Brombacher, E., and Hilbi, H. (2009) Endosomal and secretory markers of the Legionella-containing vacuole. *Commun Integr Biol* **2**: 107–109.

Urwyler, S., Nyfeler, Y., Ragaz, C., Lee, H., Mueller, L.N., Aebersold, R., and Hilbi, H. (2008) Proteome analysis of Legionella vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* **10**: 76–87.

-V-

Vaitkevicius, K., Lindmark, B., Ou, G., Song, T., Toma, C., Iwanaga, M., et al. (2006) A Vibrio cholerae protease needed for killing of Caenorhabditis elegans has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 9280–9285.

Valeru, S.P., Rompikuntal, P.K., Ishikawa, T., Vaitkevicius, K., Sjöling, Å., Dolganov, N., et al. (2009) Role of melanin pigment in expression of vibrio cholerae virulence factors. *Infect Immun* **77**: 935–942.

Valeru, S.P., Wai, S.N., Saeed, A., Sandström, G., and Abd, H. (2012) ToxR of Vibrio cholerae affects biofilm, rugosity and survival with Acanthamoeba castellanii. *BMC Res Notes* **5**:.

Vanhove, A.S., Duperthuy, M., Charrière, G.M., Le Roux, F., Goudenège, 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.

Vanhove, A.S.A.S., Rubio, T.P.T.P., Nguyen, A.N.A.N., Lemire, A., Roche, D., Nicod, J., et al. (2016) Copper homeostasis at the host vibrio interface: Lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environ Microbiol* **18**: 875–888.

Van Opijnen, T., Bodi, K.L., and Camilli, A. (2009) Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods* **6**: 767–772.

Vaulot, D., Romari, K., and Not, F. (2002) Are autotrophs less diverse than heterotrophs in marine picoplankton ? **10**: 266–267.

Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S., and Kwaik, Y.A. (1997) Identification of a Gal/GalNAc Lectin in the Protozoan Hartmannella vermiformis as a Potential Receptor for Attachment and Invasion by the Legionnaires' Disease Bacterium. *J Exp Med* **186**: 537–547.

Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G., and Pruzzo, C. (2012) Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: Evidence from the vibrios. *ISME J* **6**: 21–30.

Vezzulli, L., Colwell, R.R., and Pruzzo, C. (2013) Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol* **65**: 817–825.

Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M.G., and Brettar, I. (2016) Climate influence on Vibrio and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic.

Vezzulli, L., Pezzati, E., Moreno, M., Fabiano, M., Pane, L., Pruzzo, C., and The VibrioSea Consortium (2009) Benthic ecology of Vibrio spp. and pathogenic Vibrio species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). *Microb Ecol* **58**: 808–818.

Vicente-Manzanares, M. and Sánchez-Madrid, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* **4**: 110–122.

Vieira, O. V, Bucci, C., Harrison, R.E., Trimble, W.S., Lanzetti, L., Gruenberg, J., et al. (2003) Modulation of Rab5 and Rab7 Recruitment to Phagosomes by Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol Cell Biol* **23**: 2501–2514.

Visvesvara, G.S., Moura, H., and Schuster, F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. *FEMS Immunol Med Microbiol* **50**: 1–26.

Vogan, C.L., Costa-Ramos, C., and Rowley, A.F. (2002) Shell disease syndrome in the edible crab, Cancer pagurus - Isolation, characterization and pathogenicity of chitinolytic bacteria. *Microbiology* **148**: 743–754.

Volkova, E. and Kudryavtsev, A. (2017) Description of Neoparamoeba longipodia n. sp. and a new strain of Neoparamoeba aestuarina (Page, 1970) (Amoebozoa, Dactylopodida) from deep-sea habitats. *Eur J Protistol* **61**: 107–121.

Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M.A. (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149–167.

-W-

Wai, S.N., Mizunoe, Y., and Yoshida, S.I. (1999) How Vibrio cholerae survive during starvation. *FEMS Microbiol Lett* **180**: 123–131.

Walsh, E.A., Kirkpatrick, J.B., Rutherford, S.D., Smith, D.C., Sogin, M., and D'Hondt, S. (2016) Bacterial diversity and community composition from seasurface to subseafloor. *ISME J* **10**: 979–989.

Weerdenburg, E.M., Abdallah, A.M., Rangkuti, F., El Ghany, M.A., Otto, T.D., Adroub, S.A., et al. (2015) Genome-wide transposon mutagenesis indicates that Mycobacterium marinum customizes its virulence mechanisms for survival and replication in different hosts. *Infect Immun* **83**: 1778–1788.

Weisman, R.A. and Shaw, G.B. (1976) Differentiation in Acanthamoeba castellanii. 189–219.

Wickham, H. (2009) ggplot2.

Wildschutte, H. and Lawrence, J.G. (2007) Differential Salmonella survival against communities of intestinal amoebae. *Microbiology* **153**: 1781–1789.

Wildschutte, H., Wolfe, D.M., Tamewitz, A., and Lawrence, J.G. (2004) Protozoan predation, diversifying selection, and the evolution of antigenic diversity in Salmonella. **101**: 1–6.

Wu, H., Li, Y., Zhang, W., Wang, C., Wang, P., Niu, L., et al. (2019) Bacterial community composition and function shift with the aggravation of water quality in a heavily polluted river. *J Environ Manage* **237**: 433–441.

-X-

Xinyao, L., Miao, S., Yonghong, L., Yin, G., Zhongkai, Z., Donghui, W., et al. (2006) Feeding characteristics of an amoeba (Lobosea: Naegleria) grazing upon cyanobacteria: Food selection, ingestion and digestion progress. *Microb Ecol* **51**: 315–325.

Xu, D., Jiao, N., Ren, R., and Warren, A. (2017) Distribution and Diversity of Microbial Eukaryotes in Bathypelagic Waters of the South China Sea. *J Eukaryot Microbiol* **64**: 370–382.

Xu, K., Choi, J.K., Lei, Y., and Yang, E.J. (2011) Marine ciliate community in relation to eutrophication of coastal waters in the Yellow Sea. *Chinese J Oceanol Limnol* **29**: 118–127.

Xu, Q., Dziejman, M., and Mekalanos, J.J. (2003) Determination of the transcriptome of Vibrio cholerae during intraintestinal growth and midexponential phase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1286–1291.

-Y-

Yan, L., Cerny, R.L., and Cirillo, J.D. (2004) Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of Acanthamoeba castellanii variants with bacteria. *Eukaryot Cell* **3**: 567–578.

Yasukawa, H. (2009) Growth and development of Dictyostelium discoideum overexpressing manganese superoxide dismutase. *Japanese J Protozool* **42**: 5–11.

Young, N.D., Crosbie, P.B.B., Adams, M.B., Nowak, B.F., and Morrison, R.N. (2007) Neoparamoeba perurans n. sp., an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (Salmo salar). *Int J Parasitol* **37**: 1469–1481.

Young, N.D., Dyková, I., Crosbie, P.B.B., Wolf, M., Morrison, R.N., Bridle, A.R., and Nowak, B.F. (2014) Support for the coevolution of Neoparamoeba and their endosymbionts, Perkinsela amoebae-like organisms. *Eur J Protistol* **50**: 509–523.

-Z-

Zhang, L. and Gallo, R.L. (2016) Antimicrobial peptides. *Curr Biol* **26**: R14–R19.

Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzael, H., Gilpin, C.J., and Orth, K. (2012) Type III Effector VopC Mediates Invasion for Vibrio Species. *Cell Rep* **1**: 453–460.

Zhang, X., Krause, K.H., Xenarios, I., Soldati, T., and Boeckmann, B. (2013) Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional Diversification, and Signature Motifs. *PLoS One* **8**:.

Zheng, J., Ho, B., and Mekalanos, J.J. (2011) Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type vi secretion system in vibrio cholerae. *PLoS One* **6**:.

Zheng, W., Tian, C., and Chen, X. (2007) Molecular characterization of goose-type lysozyme homologue of large yellow croaker and its involvement in immune response induced by trivalent bacterial vaccine as an acute-phase protein. *Immunol Lett* **113**: 107–116.

Zhou, X., Elmose, J., and Call, D.R. (2007) Interactions between the environmental pathogen Listeria monocytogenes and a free-living protozoan (Acanthamoeba castellanii). *Environ Microbiol* **9**: 913–922.

Zhou, X., Gewurz, B.E., Ritchie, J.M., Takasaki, K., Greenfeld, H., Kieff, E., et al. (2013) A Vibrio parahaemolyticus T3SS Effector Mediates Pathogenesis by Independently Enabling Intestinal Colonization and Inhibiting TAK1 Activation. *Cell Rep* **3**: 1690–1702.

Vulgarisation scientifique

Lors de ma thèse j'ai eu la chance de pouvoir vulgariser mon sujet au travers d'une bande dessinée dont voici la planche. Je tiens à remercier le Collège doctoral de l'Université de Montpellier et l'association Cosciences d'avoir organisé cette formation. Je remercie également Guillaume Bagnolini et Morgane Ganault qui ont su retranscrire ma thèse avec beaucoup d'humour et de pertinence.

CHAQUE ANNÉE C'EST LA MÊME CHOSE... AU PRINTEMPS ET À L'AUTOMNE, PAF ! TOUJOURS CETTE MÊME HÉCATOMBE !

POURQUOI UN TEL MASSACRE ?

AAAARGH

IL Y A DIFFÉRENTES CAUSES DÉJÀ IDENTIFIÉES : EN PARTICULIER UN VIRUS,...

... ET DES BACTÉRIES, COMME LES VIBRIOS, QUI SONT MON OBJET D'ÉTUDE.

ON A COLLECTÉ CETTE BACTÉRIE DANS UNE HUÎTRE CONTAMINÉE ET MOURANTE AFIN DE COMPRENDRE COMMENT LES VIBRIOS RÉSISTENT AU SYSTÈME IMMUNITAIRE DE SON HÔTE, AUQUEL ILS ÉCHAPPENT.

ADIEU MONDE CRUEL, JE DONNE MON CORPS À LA SCIENCE ! ARGH !

POUR ÉLIMINER LES ENVAHISSEURS POTENTIELLEMENT DANGEREUX, L'HUÎTRE POSSÈDE UNE ARMÉE D'AGENTS PROTECTEURS, LES HÉMOCYTES. CES DERNIERS PHAGOCYTENT L'INTRUS : ILS L'ENSERRENT ET L'ABSORBENT TOTALEMENT, LUI ADMINISTRANT DES SUBSTANCES TOXIQUES COMME DES ANTIMICROBIENS ET DU CUIVRE.

HHHHHH !!! 'PEUX P'U RESPIRER !!

L'ADVERSAIRE NE SURVIT EN GÉNÉRAL PAS LONGTEMPS À CETTE ***ÉTREINTE DE LA MORT***.

POURTANT, CERTAINS VIBRIOS RÉSISTENT ET DÉTRUISENT, MÊME, CES DÉFENSES IMMUNITAIRES.

ALORS GROS LARD, ON FAIT MOINS LE MALIN MAINTENANT !

OUILLE !

CELA IMPLIQUE DIFFÉRENTS MÉCANISMES DE RÉSISTANCE À LA PHAGOCYTOSE ET DE TOXICITÉ ! LES BACTÉRIES PEUVENT CHANGER DE TAILLE, DE FORME, ET CERTAINES RÉSISTERAIENT AU CUIVRE !

UN SOUCI, PETIT ?

EUUUUH ...

CES CHANGEMENTS SONT DIRECTEMENT LIÉS AUX GÈNES DES VIBRIOS.

COMMENT CES GÈNES ONT-ILS ÉTÉ SÉLECTIONNÉS DANS L'HISTOIRE ÉVOLUTIVE DE LA BACTÉRIE ?

J'AI UNE PETITE HYPOTHÈSE QUI IMPLIQUERAIT UN TROISIÈME PROTAGONISTE DANS L'AFFAIRE...

OUI, MESDAMES ET MESSIEURS, JE PARLE BIEN DES ***AMIBES*** ! CE SONT DES ÊTRES MICROSCOPIQUES OMNIPRÉSENTS DANS NOTRE ENVIRONNEMENT.

CRUNCH !! Miam! Miam!

ILS MANGENT DE TOUT, TOUT LE TEMPS...

NAN ! JE NE SUIS PAS COMESTIBLE !!!

... Y COMPRIS LES VIBRIOS, UN PEU COMME LES HÉMOCYTES DE L'HUÎTRE !

ABSORBÉES PAR LES AMIBES, CERTAINES DE CES BACTÉRIES, NE MOURRAIENT PAS ET RÉSISTERAIENT À LA DÉGRADATION À L'INTÉRIEUR DE LA CELLULE.

BURP! Oups Pardon

EN D'AUTRES TERMES

LES AMIBES POURRAIENT FAIRE UN TRI TRÈS SÉLECTIF DES VIBRIOS LES MIEUX ARMÉS !

CE QUI EST INTÉRESSANT ICI, C'EST DE VOIR COMMENT LA RÉALITÉ EST BIEN PLUS SUBTILE QU'ON NE LE CROIT. LES ÊTRES QUI SE NOURRISSENT DE LA BACTÉRIE SÉLECTIONNENT INDIRECTEMENT LES PLUS RÉSISTANTES...

CE QUI NE TUE PAS LE VIBRIO LE REND PLUS FORT !

... ET IL N'Y A PAS DE « BONS » OU DE « MAUVAIS » DANS LA NATURE, MAIS JUSTE DES ÊTRES QUI INTERAGISSENT ET VEULENT SURVIVRE.

BON VIBRIO, JE SAIS QUE TU NE VEUX PAS ME TUER ET JUSTE MENER TA PETITE VIE MAIS ON POURRAIT TENTER UNE COLLOCATION PLUS PACIFIQUE, NON ?

AH OUI ? TU VEUX BIEN EN PARLER À TES HÉMOCYTES ?

CRUNCH! MiOM MiOM MiiOOOM

Résumé

Les amibes libres dans les environnements aquatiques utilisent la phagocytose des bactéries pour leur nutrition. Selon l'hypothèse de la sélection concomitante de la virulence, les mécanismes cellulaires et moléculaires de la phagocytose étant conservés des amibes aux cellules immunitaires des animaux, la prédation exercée par les amibes pourraient favoriser l'émergence de bactéries pathogènes résistantes à la phagocytose. Depuis 2008, les huîtres creuses *Crassostrea gigas* sont victimes d'épisodes de surmortalités en France. Cette pathologie poly-microbienne implique le virus *Herpes* OsHV-1 µvar qui provoque une immunosuppression des huîtres qui sont alors colonisées par divers bactéries pathogènes opportunistes dont des vibrios induisant la mort de l'animal. *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes d'huître qui résiste à la phagocytose et détruit les hémocytes en utilisant un certain nombre de facteurs de virulence. Nous avons donc entrepris d'étudier les interactions entre les amibes libres de l'environnement ostréicole et les vibrios afin de vérifier si certains mécanismes de virulence pouvaient aussi jouer un rôle dans ce type d'interactions. En réalisant des échantillonnages sur le terrain, nous avons mis en évidence que l'interaction entre vibrios et amibes est écologiquement réaliste, et observé une faible diversité de protistes hétérotrophes près des tables ostréicoles de la lagune de Thau par rapport à d'autres environnements moins anthropisés. Des études fonctionnelles entre LGP32 et l'amibe *Vannella* sp. AP1411 ont montré que LGP32 est capable de résister à la prédation par les amibes impliquant certains facteurs de virulence comme la métalloprotéase Vsm et la pompe d'efflux du cuivre de type P-ATPase CopA qui sont aussi impliqués dans l'interaction de LGP32 avec les huîtres. En revanche, d'autres facteurs de virulence impliqués chez l'huître ne le sont pas dans la résistance à la prédation par les amibes indiquant que certains facteurs sont impliqués dans des interactions avec divers hôtes tandis que d'autres seraient impliqués dans des interactions plus spécifiques.

Mots clés : Amibes libres, vibrios pathogènes, phagocytose, sélection concomitante, diversité

Abstract

Free living amoebae inhabit aquatic environments and use phagocytosis of bacteria for their nutrition. According to the hypothesis of coincidental evolution of virulence, the cellular and molecular mechanisms of phagocytosis being preserved from amoebae to the immune cells of animals, the predation exerted by amoebae could favor the emergence of pathogenic bacteria resistant to phagocytosis. Since 2008, *Crassostrea gigas* oysters have suffered from over-mortality in France. This poly-microbial disease involves the Herpes OsHV-1 µvar virus which causes an immunosuppression of oysters that are then colonized by various opportunistic pathogenic bacteria including vibrios inducing the death of the animal. *V. tasmaniensis* LGP32 is a facultative intracellular pathogen of oyster hemocytes that resists phagocytosis and destroys hemocytes using different virulence factors. We have therefore undertaken to study the interactions between marine amoebae of the oyster environment and the vibrios in order to verify if some mechanisms of virulence could also play a role in this type of interactions. By performing field sampling, we demonstrated that the interaction between vibrios and amoebae is ecologically realistic and observed a low diversity of heterotrophic protists near the oyster tables of the Thau Lagoon compared to other less anthropogenic environments. Functional studies between LGP32 and the amoeba *Vannella* sp. AP1411 showed that LGP32 is able to resist amoeba predation involving certain virulence factors such as Vsm metalloprotease and CopA P-ATPase copper efflux pump which are also involved in the interaction of LGP32 with oysters. In contrast, other virulence factors implicated in the oyster are not involved in amoeba-predation resistance indicating that some factors are involved in interactions with various hosts while others would be involved in more specific interactions.

Key words: Free-living amoebae, pathogenic vibrios, phagocytosis, coincidental evolution, diversity