

# THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En Biologie des Interactions

École doctorale GAÏA

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

## Caractérisation et diversité des mécanismes du syndrome de mortalité affectant les juvéniles de *Crassostrea gigas*.

Présentée par Aude Lucasson  
Le Jeudi 22 novembre 2018

Sous la direction de M. Guillaume Mitta

Devant le jury composé de

Mme Christine Paillard, Directrice de recherche CNRS, Brest

M. Sébastien Duperron, Professeur MNHM, Paris

Mme Natacha Kremer, Chargée de recherche CNRS, Lyon

Mme Frédérique Le Roux, Directrice de recherche Ifremer, Roscoff

M. Alain Givaudan, Directeur de recherche INRA, Montpellier

M. Guillaume Mitta, Professeur Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Président du jury

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



*Je tiens à remercier tout d'abord Madame Christine Paillard et Monsieur Sébastien Duperron d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit.*

*J'adresse mes remerciements à Monsieur Alain Givaudan, Madame Frédérique Le Roux et Madame Natacha Kremer pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.*

*Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Monsieur Guillaume Mitta pour la rigueur qu'il a su m'apporter et surtout le dépassement de soi qu'il m'a inculqué. Un grand merci à toi pour la confiance que tu m'as accordée. J'ai grandi grâce à toi.*

*Merci à mes encadrants de thèse : Monsieur Julien de Lorgeril et Madame Eve Toulza. Julien, merci d'avoir été présent dès le premier jour de ma thèse, de m'avoir accompagnée et soutenue et de m'avoir fait partager tout ton savoir. Eve, ta gentillesse couplée à tes compétences et à ta disponibilité de jour comme de nuit font de toi une personne irremplaçable pour moi.*

*Je remercie également Camille Clerissi sans qui je n'aurais pas acquis autant de compétences sur le microbiote. Camille, sincèrement merci, j'aimais déjà le microbiote avant d'attaquer la thèse et c'est devenu une vraie passion depuis que tu m'as formée.*

*Un merci particulier et chaleureux à Monsieur Marc Bouvy, directeur de l'école doctorale GAIA, qui a su être présent dans les bons comme dans les moments les plus difficiles de cette thèse. Ton aide m'a permis de rebondir et je t'en remercie sincèrement.*

*Je remercie Benjamin Adroit pour sa présence bienveillante tout au long de cette thèse.*

*Je remercie également Delphine Destoumieux-Garzon pour sa passion de la recherche et pour son investissement au quotidien. Merci également à Agnès Vergnes pour son implication auprès de moi, dans ce projet et sa disponibilité sans faille.*

*Mes remerciements à l'équipe de choc féminine : Anne Modat, Diane Merceron et Sylvie Cabal qui font en sorte que tout soit parfait au quotidien. Merci les filles!*

*Je n'oublie pas celles et ceux qui ont contribué, à un moment donné, au bon déroulement de la thèse : Jean-Michel Escoubas, Marc Leroy, Philippe Haffner, Caroline Montagnani, Cristian Chaparro, Richard Galinier et Céline Cosseau. Merci Céline pour ta présence et ton amitié.*

*J'aimerais remercier certains de mes professeurs de licence et de master qui m'ont donné l'envie de me lancer dans la recherche : Madame Hélène Boyer, Monsieur Jean-Luc Aymeric, Madame Christine Paillard et Monsieur Denis Saulnier.*

*Enfin mes derniers remerciements vont aux personnes qui m'ont apporté tout leur amour et leurs conseils durant cette thèse.*

*A Yann, merci d'être là auprès de moi et de partager toutes mes émotions.*

*A ma maman, merci pour tout ton amour, ta confiance et ton soutien quel que soit le moment. Merci de m'avoir poussée jusque-là, je ne l'aurais pas fait sans ta présence.*

*A mon grand frère, Laurent, tu n'imagines pas à quel point ta présence est importante dans ma vie.*





*« Il faut de temps en temps réécrire l'histoire non pas parce qu'on découvre des faits nouveaux mais parce qu'on aperçoit des aspects différents, parce que le progrès amène à des points de vue qui laissent apercevoir et juger le passé sous des angles neufs. »*

*Johann Wolfgang von Goethe*



## Table des matières

Sommaire des illustrations .....	9
Introduction générale et problématique de la thèse .....	11
Etat de l'art.....	13
I. Les maladies infectieuses : les limites des postulats de Koch.....	13
A. Des postulats à leur remise en cause .....	13
B. Les facteurs écologiques et leurs rôles dans les maladies infectieuses .....	15
C. Les facteurs intrinsèques à l'hôte : développementaux et physiologiques.....	19
D. Les maladies polymicrobiennes .....	23
E. Les facteurs évolutifs.....	27
F. Les interactions au sein des maladies multifactorielles .....	31
II. Les nouvelles méthodes pour appréhender les maladies d'étiologies complexes.....	36
III. Mon modèle d'étude l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .....	39
A. Biologie et écologie de l'huître .....	39
B. Des espèces exploitées et soumises aux épizooties.....	41
C. L'huître creuse <i>C. gigas</i> touchée par différents types de mortalité.....	43
1. Facteurs biotiques associés aux mortalités de <i>C. gigas</i> et potentiellement impliqués dans la pathogénèse.....	45
a. L'OsHV-1 et ses variants .....	45
b. Les bactéries du genre <i>Vibrio</i> .....	48
i. <i>Vibrio tasmaniensis</i> .....	50
ii. <i>Vibrio crassostreae</i> .....	51
iii. Coopération des vibrios .....	51
c. Implication conjointe d'OsHV-1 et des vibrios .....	52
d. Implication du microbiote dans le syndrome de mortalité.....	54
2. Facteurs abiotiques associés aux mortalités de <i>C. gigas</i> et potentiellement impliqués dans la pathogénèse.....	56
a. La température .....	57
b. La pluviométrie et la salinité.....	58
3. Facteurs de l'hôte .....	58
a. Le statut reproducteur .....	58
b. Les déterminismes génétiques et les déterminants génomiques de la résistance... ..	59
c. L'histoire de vie .....	59
4. Les pratiques culturelles.....	60
5. Les polluants chimiques et biologiques .....	61

D. Réponse immunitaire de <i>C. gigas</i> .....	61
1. Les données de génomique et l'immunité innée.....	61
a. Les molécules de reconnaissance du non soi .....	62
b. Les voies de signalisation cellulaire et les mécanismes associés .....	63
c. Les peptides antimicrobiens (AMPs).....	66
d. Les protéines plasmatiques .....	66
e. Les espèces réactives de l'oxygène.....	67
2. Une potentielle « réponse adaptative » mise en évidence chez <i>C. gigas</i> et le priming immunitaire antiviral.....	67
3. Un priming immunitaire antibactérien.....	69
Objectifs de la thèse .....	71
<u>Chapitre 1</u> : Caractérisation du mécanisme de pathogénèse des juvéniles d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> .....	72
Introduction et principaux résultats .....	72
Article 1: « Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in Pacific oysters, Nature Communications (in press) ».....	74
<u>Chapitre 2</u> : Diversité du mécanisme de pathogénèse des juvéniles d'huîtres creuses <i>Crassostrea gigas</i> .....	109
Introduction et principaux résultats .....	109
Article 2: « The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments ».....	110
Discussion et Perspectives .....	130
I. Synthèse des résultats .....	130
II. Les acteurs impliqués dans la maladie .....	134
a. Le virus, facteur déclencheur du processus de pathogénèse .....	134
b. Les bactéries opportunistes responsables de la septicémie.....	138
c. Le microbiote et son influence sur le pathosystème .....	141
III. L'environnement, la physiologie de l'huître, le développement et la maladie.....	143
IV. Pistes ouvertes pour l'aquaculture durable .....	145
Conclusion générale.....	149
Références bibliographiques.....	151
Annexes.....	166

## Sommaire des illustrations

<i>Figure 1 : Pourcentage de mortalité cumulée chez les juvéniles et les naissains d'huîtres de C. gigas entre 1993 et 2016.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 2 : Evolution des postulats de Koch au court du temps. ....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 3 : Dynamique et association temporelle entre les bactéries et le virus dans les pandémies de grippes.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 4 : Le scénario co-évolutif de la course aux armements.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 5 : Exposition des abeilles à différents facteurs de stress en interaction. ....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 6 : Schéma d'interactions des facteurs dans le développement des maladies infectieuses.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 7 : Rôle des facteurs biotiques, abiotiques et intrinsèques à l'hôte dans les maladies infectieuses.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 8 : Représentation schématique des différents organes (valve inférieure) de C. gigas.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 9 : Pays producteurs de C. gigas dans le monde. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 10 : Le rôle des hémocytes dans les mécanismes de défense chez l'huître C. gigas. ....</i>	<i>62</i>
<i>Figure 11: Voies de signalisation immunitaires antivirales conservées chez C. gigas.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure 12 : Cycle de réplication hypothétique d'OsHV-1.....</i>	<i>136</i>



## Introduction générale et problématique de la thèse

L'étude des maladies infectieuses a longtemps été simplifiée par l'équation suivante : un agent pathogène = une maladie. En 1882, le médecin allemand Robert Koch établit quatre postulats permettant d'établir un lien entre l'agent pathogène et la maladie qu'il provoque (Koch Robert 1882). Les quatre postulats de Koch sont les suivants :

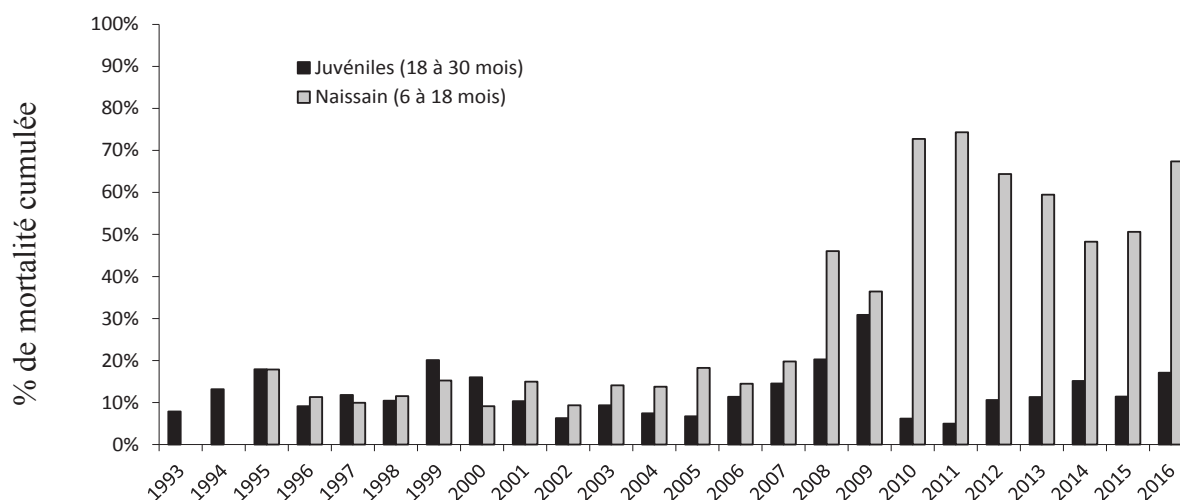
1. L'agent pathogène soupçonné doit être présent chez les individus atteints et absent des individus sains.
2. L'agent pathogène doit pouvoir être isolé et cultivé en culture pure.
3. L'agent pathogène inoculé à un individu sain doit pouvoir déclencher la maladie.
4. Une fois inoculé, il doit pouvoir être isolé de l'individu atteint.

Les postulats de Koch ont façonné notre façon de considérer et d'aborder expérimentalement les maladies. Or les progrès techniques réalisés ces dix dernières années dans le domaine de la biologie nous ont permis d'élargir notre vision et ainsi de prendre conscience qu'une évolution de ces postulats était nécessaire pour déchiffrer les maladies infectieuses. En effet, nous savons que les maladies peuvent être influencées par un grand nombre de facteurs comme les facteurs écologiques, évolutifs, intrinsèques à l'hôte ou être dues à plusieurs agents pathogènes. Tel est le cas des maladies polymicrobiennes qui impliquent des interactions complexes entre deux agents étiologiques ou plus, conduisant à des synergies responsables de pathologies (Almand et al. 2017). D'autres maladies sont quant à elles le résultat de l'interaction entre plusieurs facteurs conduisant à des maladies d'origines multifactorielles. Ainsi, les mécanismes de nombreuses maladies ne peuvent être compris par des approches réductionnistes et nécessitent l'application d'approches holistiques au travers desquelles l'ensemble du pathosystème et des influences environnementales sont prises en compte (Vonaesch et al. 2018).

La mise en place de ces approches intégratives semble capitale au vu de l'apparition de mortalités massives et récurrentes chez des espèces non-modèles d'intérêt écologique et / ou économique, telles que les pollinisateurs, les coraux et les mollusques marins (Goulson et al. 2015; Guo & Ford 2016; Bourne et al. 2009).

Mon modèle d'étude, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est un modèle d'intérêt économique puisque chaque année 4,7 millions de tonnes d'huîtres sont produites pour être consommées dans le monde (FAO 2014), avec la France comme 1<sup>er</sup> producteur européen. Cette espèce est confrontée à une pathologie d'étiologie complexe touchant l'ensemble des côtes françaises avec un pourcentage de mortalité atteignant près de 80 % chez les juvéniles d'huîtres selon les années (**Figure 1**). De nombreux efforts de recherche ont été entrepris et ont permis d'avancer dans la compréhension de la pathologie (Azéma et al. 2017; Lemire et al. 2015; Bruto et al. 2017; Lokmer, et al. 2016b; Lokmer and Mathias Wegner 2015a; Wendling and Mathias Wegner 2015; Segarra et al. 2010; Rosani and Venier 2017; Y. He et al. 2015b; T J Green et al. 2015). Cependant, à ce jour, ce syndrome n'est toujours pas caractérisé notamment parce que les différents acteurs de la maladie (hôte-microbiote et environnement) n'ont jamais été étudiés dans un même cadre expérimental.

Dans ce contexte, la problématique de mon projet de thèse vise à la compréhension du syndrome multifactoriel de mortalité des juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* en développant une approche holistique. L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse ont permis de révéler les mécanismes de la pathogénèse ainsi que leur diversité.



**Figure 1 : Pourcentage de mortalité cumulée chez les juvéniles et les naissains d'huîtres de *C. gigas* entre 1993 et 2016.**

Figure extraite d'après REPAMO et ECOSCOPA.



## Etat de l'art

### I. Les maladies infectieuses : les limites des postulats de Koch

#### A. Des postulats à leur remise en cause

Robert Koch, médecin allemand né en 1843, est considéré comme le précurseur en matière d'études des maladies infectieuses. En effet, après de longues études transdisciplinaires, Koch s'est tourné vers l'étude de l'agent responsable de la maladie du charbon. Cette maladie est causée par l'agent pathogène : *Bacillus anthracis*. La maladie du charbon est une zoonose qui se caractérise par différentes formes en fonction du type d'infection. En effet, la contamination peut se faire par 3 voies : de façon cutanée, par inhalation ou ingestion. En 1873, Robert Koch observe au microscope des organismes en forme de bâtonnet issus du sang de moutons charbonneux. Il constate que la maladie du charbon se déclarait chez les souris uniquement si la substance qui était injectée contenait des bacilles. Trois ans plus tard, il réussit à cultiver le bacille du charbon et à caractériser son cycle de développement. A cette occasion, Koch est le premier à développer des techniques de microbiologie telles que des techniques de coloration et d'identification des germes. Sa découverte du cycle du charbon est publiée dans : Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis : L'étiologie du charbon, fondée sur le cycle de vie de *Bacillus anthracis* (Koch 1876). En 1882, le bacille de la tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, connu sous le nom de bacille de Koch, est isolé par Koch. La tuberculose est une maladie pulmonaire touchant principalement les poumons mais pouvant également toucher l'ensemble des organes du corps. Koch parvient à isoler le bacille, à le cultiver *in vitro*. Lorsqu'il l'injecta à des individus sains, ces derniers développaient la tuberculose.

Les travaux de Robert Koch sur la compréhension et la caractérisation des maladies infectieuses ont permis pour la première fois de faire un lien entre un microorganisme donné et une maladie donnée. Ainsi, l'ensemble du travail réalisé sur ces maladies infectieuses a permis à Koch d'énoncer 4 postulats qui permettent d'établir un lien entre l'agent pathogène et la maladie qu'il provoque (Koch Robert 1882).

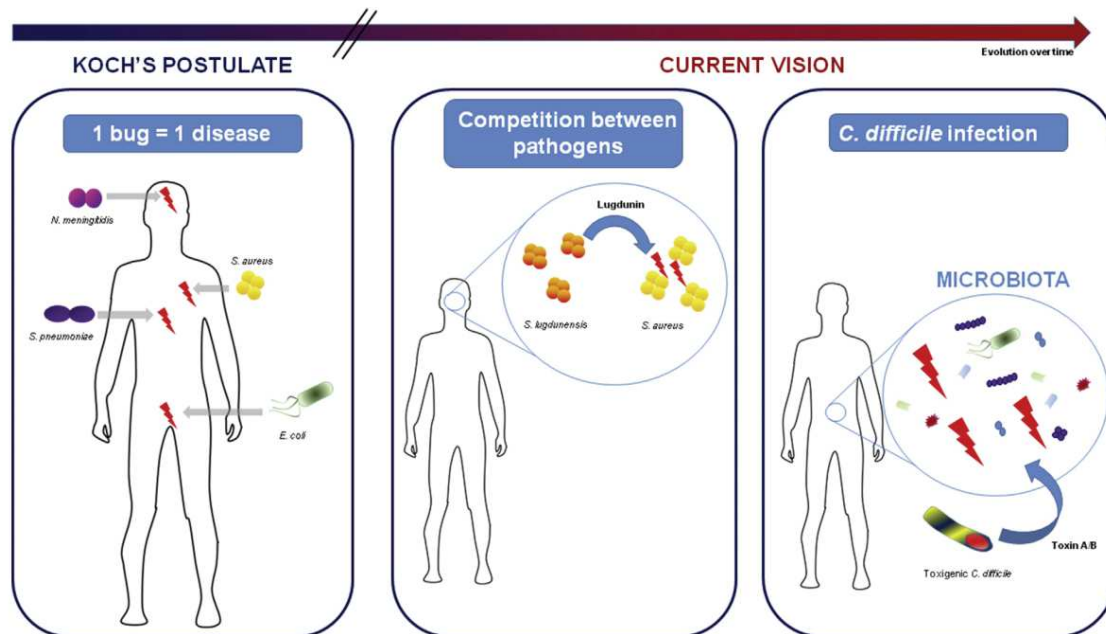
Cependant, certaines limitations ont été mises en évidence par la communauté scientifique et par Koch lui-même. Elles résultent du fait que les postulats ont été décrits suite à la caractérisation de la maladie du charbon et à la tuberculose et qu'ils ne peuvent donc pas être généralisés à l'ensemble des maladies infectieuses, (Evans 1976; Falkow 1988; Jindal 2018). Voici quelques limitations :

1. L'agent pathogène peut être présent chez le sujet asymptomatique.
2. Il ne peut pas toujours être cultivé en culture pure.
3. L'inoculation du microorganisme ne provoque pas toujours la maladie.
4. L'agent pathogène inoculé à un individu sain n'est pas nécessairement ré-isolé et cultivé.

Les progrès techniques réalisés notamment dans le domaine du séquençage ont alimenté ces limitations amenant les chercheurs à faire évoluer leur vision sur l'étude des maladies infectieuses.

Depuis, les postulats de Koch ont été reformulés (Lagier et al. 2017; Vonaesch et al. 2018). Un exemple de cette évolution dans l'étude des maladies infectieuses chez l'Homme est présenté en **Figure 2**.

A ces limitations s'est ajouté la prise de conscience que certaines maladies peuvent être influencées par un grand nombre de facteurs. En effet, certains facteurs écologiques, biotiques ou abiotiques participent de manière directe ou indirecte au développement des maladies. D'autres sont dépendantes de facteurs associés à l'hôte, tel qu'un état physiologique particulier, rendant l'hôte plus sensible à certaines maladies infectieuses. Certaines impliquent des agents polymicrobiens alors que d'autres ont des effets qui agissent sur une échelle temporelle plus longue emmenant ainsi les hôtes à développer ou non des mécanismes de résistance face aux pathologies, on parle dans ce cas de facteurs évolutifs. Enfin, certaines maladies peuvent être le résultat d'une combinaison de facteurs et il devient ainsi difficile d'évaluer le poids relatif de chacun des facteurs dans l'expression de la maladie. C'est ce qui est observé dans certaines maladies multifactorielles. L'ensemble de ces facteurs et de leur rôle dans les maladies infectieuses sont développés dans les sections suivantes.



**Figure 2 : Evolution des postulats de Koch au court du temps.**

Les travaux de Koch ont conduit à un premier lien entre l'agent pathogène et la maladie qu'il provoque (encadré 1). Des études récentes dans les maladies infectieuses humaines montrent toutefois qu'il existe une compétition entre les agents pathogènes, notamment par la sécrétion de molécules antimicrobiennes (encadré 2). D'autres ont démontré que certains microorganismes sont capables de perturber un écosystème entier, comme le montrent les infections impliquant des souches de *Clostridium difficile* (encadré 3 ; Figure extraite d'après Lagier et al., 2018. Ainsi, l'hypothèse initiale de Koch « 1 pathogène + 1 hôte = 1 maladie » peut être reformulée comme «  $X$  (pathogènes) +  $Y$  (milieu local) +  $Z$  (sensibilité individuelle de l'hôte) = maladie ». Modifié d'après Vonaesch et al., 2018.

## B. Les facteurs écologiques et leurs rôles dans les maladies infectieuses

Nous parlons de facteurs écologiques lorsque l'on s'intéresse aux facteurs environnementaux de l'hôte et pouvant agir sur lui pour influencer la pathogénèse. Parmi eux, nous distinguons les facteurs biotiques et les facteurs abiotiques. Les facteurs biotiques se caractérisent par des interactions entre le vivant et les facteurs abiotiques correspondent aux facteurs physico-chimiques agissant sur le vivant.

Parmi les facteurs abiotiques, des études ont rapporté l'influence des facteurs climatiques dans la transmission de parasites. Par exemple, il a été mis en évidence que « l'humidité relative minimale » et la pluviométrie avaient un effet sur la transmission du paludisme, en favorisant l'émergence des larves de moustique (Hamidou et al. 2018). Le paludisme est une maladie infectieuse causée par le parasite *Plasmodium sp* et transmise par piqûre de moustiques infectés.

Les auteurs ont récolté au Niger, sur une période de 10 ans, des données climatologiques et palustres. Ainsi, ils ont observé une corrélation positive entre la mortalité, la morbidité et « l'humidité relative minimale », ( $r=0.719$  et  $r=0.674$ , respectivement). De même une corrélation positive a été observée avec la pluviométrie ( $r=0.607$  pour les décès et  $r=0.5145$  pour les cas). Les mois de juillet, août et septembre sont les mois pour lesquels les plus grandes « humidités relatives minimales » ont été observées. Les mois de juillet et août constituent les mois de précipitations les plus élevés. D'autres études ont également mis en évidence l'influence des fortes précipitations dans l'incidence du paludisme (Adu-Prah & Kofi Tetteh 2015; Kipruto et al. 2017).

D'une manière générale, les cycles de développement des parasites dans les maladies infectieuses sont sous la dépendance de facteurs écologiques tels que la température ou la lumière. Par exemple, dans la fasciolose, maladie parasitaire des bovins due à *Fasciola hepatica*, un ver plat (Moazeni & Khademolhoseini 2016), le développement de l'œuf chez la limnée (son hôte intermédiaire) a lieu à une température comprise entre 10°C et 30°C. A l'inverse, l'éclosion de l'œuf nécessite une chute de la température et la présence de lumière (Sanchez et al. 2018). De même le développement de *Plasmodium falciparum*, agent responsable du paludisme est sous le contrôle de la température. Il a été démontré que le développement du parasite s'effectue dans un gradient de température allant de 18°C à 33°C avec un développement optimum à 25°C (Mordecai et al. 2013). En dessous ou au-dessus de ce seuil, le développement du parasite *Plasmodium falciparum* est impossible (Kwiatkowski 1989; Lingnau et al. 1993; Bertrand 2001).

Ainsi, toutes les maladies à transmission vectorielle comme la dengue, la bilharziose, la filariose lymphatique, le chikungunya, l'onchocercose, la maladie de Chagas, la leishmaniose, le Zika, la fièvre jaune ou l'encéphalite japonaise implique différents vecteurs dont les cycles de développement sont sous la dépendance de facteurs écologiques (de la Rocque & Rioux 2008).

En milieu aquatique, certains facteurs abiotiques interviennent également dans le développement de maladies de façon directe ou indirecte. Tel est le cas d'une pathologie affectant les herbiers marins de *Zostera marina* dont les populations sont régulièrement en déclin au niveau mondial. Cette pathologie a été associée à la présence d'un parasite hétéroconte (*Labyrinthula zosterae*)

qui induit des lésions au niveau des feuilles, entraînant la mort par diminution de la photosynthèse. Récemment, des influences de la température de l'eau environnante et de la profondeur ont été mises en évidence, avec des mortalités qui augmentent avec la salinité et diminuent avec la profondeur (Jakobsson-Thor et al. 2018).

Cependant, l'ensemble des expérimentations a été réalisé en conditions *in situ*, induisant des effets confondus ce qui rend difficile les interprétations claires. Bien qu'aucun mécanisme ne soit encore identifié, les auteurs émettent l'hypothèse que les faibles taux de salinité limiteraient les capacités d'engendrer des lésions de *Labyrinthula zosterae*. En ce qui concerne l'effet de la profondeur, l'augmentation de mortalité à de faibles profondeurs a été retrouvée dans des études similaires sur *Labyrinthula zosterae* ainsi que chez l'algue brune *Laminaria hyperborea* (Ellertsdóttir & Peters 1997) et certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'une irradiance plus élevée en eau peu profonde pouvait accroître la réplication des agents pathogènes. Les mécanismes de la lumière liés à la virulence sont parfois difficiles à dissocier car la lumière n'est pas toujours la cause directe. En effet, d'autres facteurs indirects impliquant la lumière comme par exemple les changements de température peuvent également jouer un rôle dans l'effet observé (Roberts & Paul 2006).

Dans un autre contexte, des études ont montré que les mycoses chez l'être humain se développent dans des milieux humides (Havlickova B et al. 2008; Tosti et al. 2015). Des variations de pH peuvent également entraîner l'apparition de mycoses (Wilson 2004). Tel est le cas des mycoses vaginales qui sont causées par un changement de pH normal à 4,5 à un pH supérieur (Nyirjesy 2001). Le champignon est présent dans la flore vaginale de façon naturelle mais la modification du pH peut entraîner la pullulation des champignons et donner des symptômes de mycose (French et al. 2004).

Des exemples de facteurs abiotiques associés aux mortalités de l'huître *C. gigas* sont exposés dans le chapitre IV, section 2.

Des facteurs biotiques peuvent également influencer de manières positives (en favorisant l'infection) ou négatives (en défavorisant l'infection) les maladies infectieuses. En effet, de nombreux exemples ont été rapportés sur le rôle protecteur du microbiote dans les maladies infectieuses humaines.

Déjà à la fin des années 1970, des travaux ont montré que la colonisation de souris axéniques par *Escherichia coli* avant infection pourrait inhiber la colonisation de la bactérie *Shigella flexneri*, responsable de gastro-entérites (Ducluzeau et al. 1977). Aujourd'hui le microbiote est grandement étudié et de plus en plus d'études confirment son rôle important dans les maladies.

Par exemple, il a été démontré que, la sensibilité aux rotavirus et aux norovirus dépendait de la composition du microbiote procaryote de l'hôte (Rodríguez-Díaz et al. 2017). De même, la sensibilité à certains virus dans les maladies infectieuses sexuellement transmissibles, comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Nunn et al. 2015), le virus du papillome humain cervical (VPH) (Shannon, Yi, et al. 2017) ou le virus de l'herpès simplex (Shannon, Gajer, et al. 2017) est influencée par la composition du microbiote vaginal dans un contexte d'une flore vaginale altérée.

Dans les infections à *Staphylococcus aureus*, il a été démontré que la colonisation nasale humaine par *Staphylococcus lugdunensis* était associée à une réduction significative du portage de *S. aureus* qui sécrète la lugdunine, un composant bactéricide (Zipperer et al. 2016).

Chez le moustique, *Anopheles arabiensis*, il a été mis en évidence l'importance des bactéries résidentes de l'intestin des anophèles dans la transmission du parasite du Paludisme. Le parasite est transmis par la piqure d'un moustique du genre *Anopheles* qui a préalablement piqué un individu atteint du paludisme. Dans ce type d'interaction, il a été mis en évidence l'importance des bactéries résidentes de l'intestin des anophèles dans la transmission du parasite. Plus précisément, cette étude a permis d'identifier une bactérie du genre *Enterobacter*, isolée de populations de moustiques, qui rend le moustique résistant à l'infection par le parasite du paludisme humain, *Plasmodium falciparum* (Cirimotich et al. 2011). En effet, les auteurs ont identifié par séquençage de l'ARN ribosomique 16S des bactéries, 16 souches bactériennes issus d'isolats bactériens de populations de *A. arabiensis*. Parmi ces souches, les bactéries à Gram négatif, inhibaient la formation des oocystes (œuf encapsulé) de *Plasmodium falciparum* chez *A. gambiae* et *A. stephensi*. Les auteurs ont mis en évidence que la bactérie *Enterobacter sp* inhibait à 98 % le développement des ookinètes et à 99 % le développement des oocystes et des sporozoïtes d'une souche de *Plasmodium*. Les auteurs ont montré que l'effet de la bactérie était médié par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Cette étude montre ainsi que le microbiote peut être impliqué dans le contrôle de la transmission du paludisme, en interférant avec le développement du parasite avant son invasion dans l'épithélium de l'intestin du moustique.

A l'inverse, un exemple de l'influence positive d'un facteur biotique sur une maladie infectieuse multifactorielle est l'amélioration de l'infestation, induite par une souche de *Wolbachia*, du moustique *Culex tarsalis* par le virus du Nil occidental (VNO) (Dodson et al. 2014). En effet, les auteurs ont étudié les effets d'une souche de *Wolbachia* sur l'infection, la dissémination et la transmission du virus du Nil occidental chez le moustique *Culex tarsalis*. Après inoculation chez des moustiques femelles adultes, la bactérie *Wolbachia* a atteint des concentrations importantes et s'est largement disséminée dans de nombreux tissus du moustique. Les auteurs ont identifié une diminution d'un activateur de la voie immunitaire antivirale Toll, suggérant ainsi que *Wolbachia* peut atténuer l'immunité antivirale permettant ainsi au virus de se répliquer et donc de se disséminer. Cette étude est la première observation de l'amélioration du développement du VNO dans son hôte intermédiaire *C. tarsalis* induite par une souche de *Wolbachia*.

Cet engouement pour le microbiote résulte principalement des résultats du projet MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) (Qin et al. 2010). Dans ce projet l'objectif a été de réaliser le premier séquençage des gènes bactériens du tube digestif humain pour établir des liens entre les gènes microbiens et les Maladies Intestinales Chroniques de l'Intestin (MICI). L'un des principaux résultats du projet est l'identification d'espèces bactériennes différentes entre des individus sains et des individus atteints de MICI suggérant le rôle du microbiote dans l'établissement des maladies intestinales. Ce projet a ouvert la porte au rôle du microbiote à l'ensemble des maladies. L'ensemble de ces études démontre l'importance du microbiote dans les interactions entre l'hôte et les agents pathogènes.

### C. Les facteurs intrinsèques à l'hôte : développementaux et physiologiques

Chez l'humain un certain nombre de maladies infectieuses dépendantes de l'âge a été rapporté. Tel est le cas de la coqueluche dont les complications sont différentes entre le nourrisson et l'adulte (Grimprel & Bassinet 2006). Chez les nourrissons âgés de moins de 2 mois, la coqueluche maligne est la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité infectieuse (Berthomieu et al. 2010). Elle se



caractérise par une infection respiratoire causée par la bactérie *Bordetella pertussis*. La virulence de la bactérie repose sur la production de toxines et d'adhésines responsables principalement de la destruction de l'épithélium respiratoire et de l'hyperlymphocytose (Hegerle & Guiso 2013). L'adulte qui développera la coqueluche aura des quintes de toux fréquentes sur deux semaines environs. En revanche, chez le nourrisson, les crises de toux pourront conduire à un arrêt de la respiration et à la mort du nourrisson dans les cas les plus graves (De Jongste & Shields 2003).

De même, la bactérie streptocoque du groupe B peut être responsable d'une méningite chez le nouveau-né alors que chez l'adulte elle s'exprimera sous la forme d'une simple infection urinaire. Les streptocoques du groupe B sont des bactéries commensales de l'intestin et du vagin (Gibbs et al. 2004). La transmission du streptocoque peut se faire lors de l'accouchement par voie basse et entraîner des infections graves telles que des méningites en raison d'une baisse de l'immunité chez la femme enceinte (Creti et al. 2017). D'une manière générale, la majorité des enfants exposés à la bactérie avant ou pendant l'accouchement ne déclarent pas de signes cliniques et la mort par méningite reste un cas rare avec des causes non expliquées à ce jour.

La méningite à pneumocoque est également sous l'influence de l'âge puisqu'elle n'est présente que chez l'enfant (Kim 2010; Neijens et al. 2012). Elle est provoquée par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* et est responsable de complications graves chez l'enfant pouvant conduire au décès.

De même, l'impétigo qui est une infection bactérienne à streptocoque ou staphylocoque est présente chez l'enfant de moins de 5 ans alors qu'elle ne se déclare pas chez l'adulte sauf chez les sujets immunodéprimés (Mazereeuw-Hautier 2006). L'impétigo se caractérise par des lésions cutanées suite à une infection de la peau par *Streptococcus pyrogenes* et/ou *Staphylococcus aureus*. L'enfant au système immunitaire en développement sera plus sensible aux infections bactériennes.

D'une manière générale, les infections de certains virus, tels que les herpès-virus ou le virus responsable de la laryngite constituent des formes cliniques plus graves chez l'enfant que chez l'adulte du fait d'un système immunitaire pas encore totalement développé (Freymuth 2004).



Dans l'autre sens, la varicelle constitue une affection bénigne chez l'enfant alors qu'elle peut entraîner des complications neurologiques et pulmonaires graves chez l'adulte. La varicelle est causée par le Virus Varicelle Zona (VZV). Elle se caractérise par une éruption cutanée à l'ensemble du corps. La vaccination d'un enfant permet une réponse immédiate avec la production d'anticorps. Par contre, chez un adulte non immunisé et immunodéprimé, la varicelle pourra se déclarer et entraîner certaines complications (Duchet Niedziolka et al. 2008). Par exemple, des surinfections, des atteintes pulmonaires, des complications neurologiques ou hématologiques dans les cas les plus graves.

Le statut physiologique de l'hôte peut également intervenir dans le développement des maladies infectieuses. Le cas le plus connu concerne les personnes immunodéprimées, pour lesquelles le système immunitaire est affaibli. Ces personnes sont donc plus fragiles aux infections virales, bactériennes et parasitaires. Par exemple, les personnes atteintes du SIDA qui correspondent à la dernière phase de l'infection par le VIH ne mourront pas du VIH mais des complications associées aux infections secondaires. Parmi elles, nous pouvons citer la pneumocystose pulmonaire, la toxoplasmose, des infections au cytomégalovirus (CMV) et des infections à *Mycobacterium avium* dans l'appareil gastro-intestinal. De même les personnes âgées sont plus sensibles aux infections en raison de l'affaiblissement de leurs défenses immunitaires avec l'âge.

L'état physiologique associé à la grossesse peut également entraîner certaines maladies infectieuses chez le fœtus. En effet, lors de la grossesse le fœtus peut être plus sensible à certaines maladies en raison d'une baisse de l'immunité chez la femme enceinte. Par exemple, la toxoplasmose est généralement bénigne mais chez la femme enceinte, elle est dangereuse car elle peut provoquer des malformations du fœtus (Paquet & Yudin 2016). La toxoplasmose est une maladie parasitaire due à *Toxoplasma gondii*. Elle est transmise à l'homme par le contact avec les animaux domestiques ou par l'ingestion de viande pas assez cuite. De même la transmission du cytomégalovirus (CMV) au fœtus par la maman, peut entraîner une fausse couche ou la mort du nourrisson (Yinon et al. 2010).

L'enfant atteint d'eczéma peut développer le syndrome de Kaposi Juliusberg. Ce syndrome résulte d'une complication suite à l'infection par un virus de type herpès (Duchet Niedziolka et

al. 2008). Il se caractérise par des pustules hémorragiques au niveau du visage et du corps suite à un eczéma.

De même, au cours du cycle menstruel, de nombreux changements hormonaux sont observés et sont susceptibles de favoriser les infections. Une étude a montré que les changements hormonaux observés au cours du cycle menstruel peuvent affecter la sensibilité à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Wira & Fahey 2009). Les chercheurs ont émis l'hypothèse d'une fenêtre d'infectiosité de 7 à 10 jours à l'infection par le VIH au cours du cycle menstruel. Cette hypothèse a été proposée suite à l'observation de la suppression des composants de l'immunité innée et adaptative par les hormones sexuelles sécrétées durant le cycle. Plus précisément, les auteurs ont observé que les hormones sexuelles sont capables de supprimer certains composants du système immunitaire pour favoriser les conditions de procréation. En effet, les conditions dans l'utérus sont dépendantes des phases du cycle menstruel. Au cours de la phase folliculaire, l'ovule n'est pas encore mature, le risque de grossesse absent ce qui se caractérise par des défenses immunitaires élevées, limitant les risques d'infections. Par contre, lors de l'ovulation, durant la phase lutéale, l'immunité est régulée à la baisse pour permettre la tolérance des antigènes paternels pouvant conduire à une transmission du VIH.

Pour les espèces marines, il a été démontré chez un invertébré d'intérêt aquacole que son stade de développement est un facteur important pour expliquer la sensibilité à des vibrioses. En effet, les chercheurs ont démontré que l'acquisition de la sensibilité des crevettes à une bactérie, *Vibrio penaeicida*, est corrélée à la forme rostrale acquise au stade juvénile (Goarant et al. 1998). *V. penaeicida* est responsable chez la crevette *Litopenaeus stylirostris* d'une maladie saisonnière appelée « Syndrome 93 ». Ce syndrome est une vibriose juvénile causée par *V. penaeicida* ; elle affecte les crevettes dans les bassins de grossissement et les réservoirs de géniteurs en Nouvelle-Calédonie. Les vibrioses se produisent à tous les stades d'élevage, toutefois des différences entre les souches de vibrios ont été observées en fonction du stade de développement considéré : larvaire ou juvénile (Mohney et al. 1994). Les auteurs ont analysé les pourcentages de survie suite à l'infection.

Ils ont observé qu'à partir du stade post-larvaire PL9, la survie a été significativement diminuée par l'infection. Les stades post-larvaires avant PL9 correspondaient aux crevettes pour lesquelles

la plupart des post-larves n'avaient pas de forme rostrale définitive. Les auteurs ont donc conclu que l'acquisition de la sensibilité à l'infection par *V. penaeicida* pourrait être corrélée à l'acquisition de cette forme rostrale définitive. Ils émettent l'hypothèse que la dernière mue post-larvaire correspondant à une métamorphose incluant certaines modifications physiologiques et / ou immunologiques pourrait être responsable de l'acquisition de cette sensibilité à *V. penaeicida*. Une autre hypothèse pourrait être que le changement de stade de développement associé à un changement de sensibilité serait lié à l'apparition de récepteurs spécifiques au niveau des cellules de crevettes qui pourraient être impliqués dans un ou plusieurs mécanismes de virulence de *V. penaeicida* vis-à-vis de *P. stylirostris* (Goarant et al. 1998).

#### D. Les maladies polymicrobiennes

D'autres maladies, peuvent quant à elles, être dues à plusieurs agents pathogènes. Tel est le cas des maladies polymicrobiennes qui impliquent des interactions complexes entre deux agents étiologiques ou plus, conduisant à des symptômes synergiques et des pathologies (Almand et al. 2017). Les maladies polymicrobiennes peuvent être subdivisées en maladies polyvirales, maladies polybactériennes, maladies virales et bactériennes combinées, maladies polymycotiques et parasitaires.

De nombreuses maladies polymicrobiennes impliquant des interactions entre virus et bactéries ont été identifiées chez les vertébrés et certaines ont été caractérisées (Brogden & Guthmiller 2002). Dans ce genre d'interactions virus-bactéries, une coopération entre les deux agents pathogènes peut s'établir afin de favoriser et ou d'accélérer l'infection (Almand et al. 2017). Cette coopération peut être établie soit de manière directe soit de manière indirecte. Les interactions directes favorisent les virus alors que les interactions indirectes facilitent les infections bactériennes. Les interactions directes favorisant les virus se produisent lorsque le virus exploite un composant bactérien pour faciliter sa pénétration dans la cellule cible. Inversement, les interactions indirectes provoquent une infection bactérienne à la suite de l'entrée du virus dans la cellule hôte.

Deux mécanismes sont sous-jacents aux coopérations directes : i) la liaison du virus à une cellule bactérienne ou ii) l'utilisation par le virus d'un produit bactérien favorisant sa pénétration. Ces interactions favorisent la réplication virale sans bénéfice connu pour les bactéries.

Lors des coopérations indirectes, il existe quatre mécanismes : (i) une augmentation induite par le virus des concentrations en récepteurs bactériens ; (ii) une atteinte du virus aux cellules épithéliales sous-jacentes ; (iii) le déplacement de bactéries commensales par le virus ; et (iv) l'altération du système immunitaire de l'hôte par le virus. Dans ces cas, il n'y a pas d'interaction physique directe entre le virus et la bactérie. En effet, l'infection virale rend les cellules hôtes davantage sensibles à la colonisation bactérienne (Almand et al. 2017).

Un exemple d'interaction directe est observé dans le cadre du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le VIH est un rétrovirus pouvant entraîner le développement d'une maladie appelée SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Le VIH se réplique dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui sont des intermédiaires de la réponse immunitaire. Cette infection conduit à un affaiblissement du système immunitaire de l'hôte, le rendant ainsi sensible aux maladies opportunistes.

Des études ont mis en évidence que les individus infectés par le VIH sont plus enclins à développer une infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Dans ce cas, *M. tuberculosis* peut favoriser la progression vers le dernier stade du VIH. Différentes stratégies ont été décrites. Par exemple, *M. tuberculosis* est capable d'augmenter la production du facteur de nécrose tumorale (TNF), une cytokine du système immunitaire qui contrôle les infections bactériennes, ce qui active la réplication du VIH dans les macrophages (Pawlowski et al. 2012). De même, lors de l'infection par le VIH, le système immunitaire de l'hôte produit une interleukine, l'IL-6 qui associée au TNF permet d'activer la transcription du VIH (Collins et al. 2002).

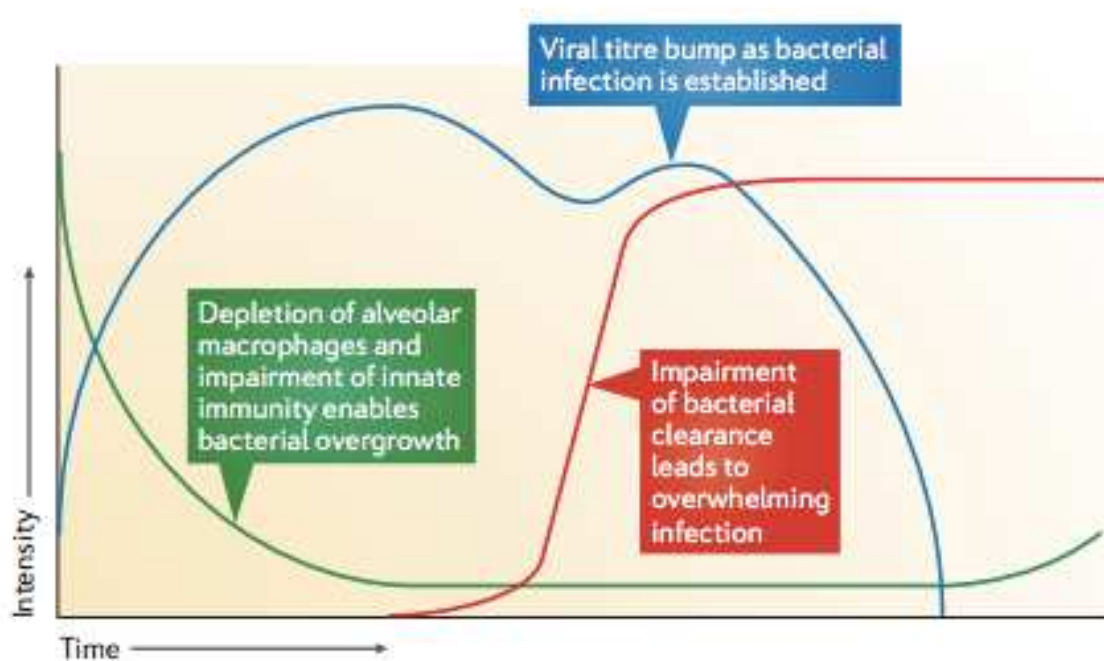
Les virus entériques sont également capables d'utiliser un composant bactérien pour favoriser leur dissémination. Il a été démontré que des souris infectées par le poliovirus et non traitées aux antibiotiques présentaient des titres viraux plus élevés que chez les souris au microbiote intact. Ceci suggère que les composants bactériens tels que le lipopolysaccharide (LPS) ou le peptidoglycane favorisent la liaison des récepteurs viraux et donc l'infection virale (Kuss et al. 2011).

Dans les interactions indirectes la caractérisation du mécanisme reste souvent incomplète. En effet, souvent les contours généraux de ces interactions sont clairs mais les détails restent à déterminer. Les pandémies de grippe qui ont sévi durant le 19<sup>ème</sup> siècle en sont un bon exemple (McCullers 2014). Trois pandémies grippales ont eu lieu. La première a eu lieu en 1918 causant 50 millions de morts. Durant cette pandémie, dans 95 % des cas de maladies et de décès graves, il y a eu surinfection bactérienne par *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenza* et *Streptococcus pyogenes*. Durant la seconde pandémie de grippe, en 1957, 2 millions de décès ont été recensés et seul *S. aureus* a été associé à la surinfection bactérienne. En effet, la découverte des antibiotiques, après la seconde guerre mondiale, a permis d'éliminer les germes de *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* and *H. influenza*. En revanche *S. aureus* présentait des caractères de résistance aux antibiotiques utilisés. Enfin la dernière pandémie eu lieu en 1968 avec comme bactérie pathogène prédominante *S. pneumoniae* causant 1 million de décès.

Il est difficile de comprendre si les décès observés lors des pandémies de grippe sont dus à la grippe elle-même ou aux complications de la grippe car lors d'infections séquentielles comme dans le cas de la grippe (virus puis bactéries), il y a un changement temporel d'agents pathogènes, l'agent pathogène précédent laisse place au suivant. De plus, l'accès aux voies respiratoires inférieures des patients est difficile. Toutefois, un mécanisme reposant sur une interaction indirecte a été proposé pour expliquer ces pandémies de grippe (McCullers 2014).

La première étape repose sur une interaction entre le virus et l'hôte. Plusieurs facteurs de virulence exprimés par les virus grippaux peuvent interagir directement avec les poumons. En effet, l'hémagglutinine présente à la surface du virus lui permet d'initier son endocytose au travers des récepteurs cellulaires et de pénétrer dans les cellules. Une fois dans les cellules pulmonaires, la deuxième étape consiste en la fabrication de protéines par le virus qui provoquent une cytotoxicité et favorisent ainsi les réponses inflammatoires de l'hôte. Ainsi des lésions épithéliales et la disponibilité des récepteurs permettent aux bactéries d'adhérer et de se développer. Les bactéries qui expriment des facteurs de virulence spécifiques peuvent tirer parti de ces changements avant de se développer. Par exemple, des facteurs tels que les MSCRAMM staphylococciques (composants de surface microbiens reconnaissant des molécules de matrice adhésives) permettent aux bactéries de se fixer à des récepteurs nouvellement découverts. Les cytotoxines bactériennes se combinent avec leurs homologues viraux pour favoriser les dommages physiques et immunitaires dans les poumons. Certaines souches bactériennes qui

possèdent des caractéristiques spécifiques, telles qu'une capsule épaisse résistante au complément, ont la capacité de persister chez les hôtes infectés par le virus. Ces mécanismes de coopérations entre virus et bactéries lors des pandémies de grippes ont permis de proposer un modèle dans les dynamiques virales et bactériennes chez l'hôte (**Figure 3**). Ce modèle suggère que les dynamiques des agents pathogènes ne doivent pas être appréhendées de façon séquentielle mais comme un continuum.



**Figure 3 : Dynamique et association temporelle entre les bactéries et le virus dans les pandémies de grippes.**

*La réplication du virus est accélérée lorsqu'une infection primaire est établie, avec un titre viral atteint dans les poumons 2 à 3 jours après l'inoculation (courbe bleue). Une altération des défenses de l'hôte, dont l'altération des macrophages alvéolaires (courbes vertes) au cours des 3 premiers jours de l'infection, permet aux bactéries de se multiplier (courbe rouge) et de provoquer une pneumonie. La croissance rapide des bactéries est associée à un rebond du titre viral via des mécanismes peu clairs (peut être une disponibilité en récepteurs). L'absence d'immunité secondaire pour contrôler la co-infection peut entraîner une croissance bactérienne non contrôlée et la mort par pneumonie du sujet atteint. Figure extraite du papier McCullers 2014.*

Il peut également exister des interactions entre plusieurs types de virus et des bactéries, comme dans le cas de la parodontite. Cette maladie infectieuse résulte de l'interaction entre trois herpès virus (virus Epstein-Barr type 1 (EBV-1), cytomégalo virus humain (HCMV) et herpès

simplex virus (HSV)) et des bactéries parodontales *Porphyromonas gingivalis* et *Dialister pneumosintes*. Les herpès virus infectent les cellules immunitaires de l'hôte ce qui provoque une inflammation des tissus conduisant à des lésions parodontales favorisant les infections secondaires par *Porphyromonas gingivalis* et *Dialister pneumosintes* (Kamma et al. 2001; Rodrigues et al. 2015).

Chez les invertébrés, les exemples de coopérations entre agents pathogènes sont plus rares et moins décrits dans la littérature. Par exemple, la Black Band Disease (BBD) est une maladie affectant les coraux qui se caractérise par une nécrose des tissus à cause de l'accumulation d'une cyanobactérie filamenteuse : *Roseofilum reptotaenium*. En 2014, Zimmer et ses collaborateurs ont identifié en analysant des tissus de coraux nécrosés une homoserine lactone AI-2 impliquée dans le quorum sensing (Zimmer et al. 2014). Le quorum sensing (QS) est un mode de communication entre les bactéries, densité dépendante et régulant l'expression de certains gènes bactériens impliqués dans diverses fonctions physiologiques tels que la luminescence, la formation de biofilms, la conjugaison, la sporulation, la virulence : toxines, enzymes lytiques, sidérophores et molécules d'adhésion (Miller & Bassler 2001). Meyer et ses collaborateurs ont identifié un métabolite secondaire de la cyanobactérie, l'acide lyngbique capable d'inhiber le QS de *Vibrio harveyi*. Les effets de cet inhibiteur naturel du QS sur les réseaux de régulation bactériens peuvent contribuer à la structuration des interactions au sein des communautés bactériennes impliquées dans la BBD (Meyer et al. 2016).

## E. Les facteurs évolutifs

Contrairement aux facteurs détaillés ci-dessus, les facteurs évolutifs agissent à une échelle temporelle plus longue et emmènent les hôtes à développer des mécanismes de résistance pour faire face aux pressions de sélection exercées par les agents pathogènes. En effet, dans les infections parasitaires, l'acquisition de nouveaux mécanismes de virulence par le parasite conduit à l'acquisition de mécanismes de résistance par l'hôte. Il s'agit d'une évolution réciproque de l'hôte et de son parasite (co-évolution) caractéristique de la « course aux armements » (Bataillon 2010) (**Figure 4**). Ainsi certains pathogènes réussissent à infecter leur hôte alors que d'autres échouent.



Par exemple chez l'invertébré *Biomphalaria glabrata*, certaines souches de *Shistosomia mansoni*, l'un des agents responsables de la schistosomiase humaine, parviennent à infecter les gastéropodes *B. glabrata* alors que d'autres n'y parviennent pas. Ce phénomène est appelé le « polymorphisme de compatibilité ». Il repose sur les interactions moléculaires entre les capacités d'infectivité du parasite et la résistance/sensibilité de son hôte. Une interaction est compatible lorsque le parasite est capable d'infecter son hôte. A l'inverse, une interaction est incompatible lorsque le parasite est incapable d'infecter son hôte, il sera alors reconnu par le système immunitaire de l'hôte pour être *in fine* éliminé (Langand & Morand 1998). Certains résultats indiquent que la résistance de l'escargot explique l'incompatibilité, c'est à dire que l'échec de l'infection par le parasite résulte de la mise en place de mécanismes de résistance par l'escargot alors que le succès parasitaire est dû à un statut sensible de l'hôte, on parle de la « resistance hypothesis » (Webster & Davies 2001).

D'autres soutiennent que le succès ou l'échec de l'infection ne dépendent pas de la sensibilité ou de la résistance de l'hôte mais plutôt du statut apparié ou inadéquat du phénotype de l'hôte et de son parasite, entre les récepteurs immunitaires de l'escargot et les antigènes du schistosome, on parle dans ce cas de la « matching hypothesis » (Théron & Coustau 2005). Cette hypothèse suggère ainsi que tous les escargots sont sensibles à l'infection s'ils sont exposés à un parasite de phénotype compatible (Theron et al. 2008).

Dans une récente étude, les auteurs proposent que les deux hypothèses ne soient pas exclusives l'une de l'autre et que le statut compatible / incompatible d'un couple hôte / parasite résulte d'un équilibre entre matching and resistance hypothesis (Mitta et al. 2017).

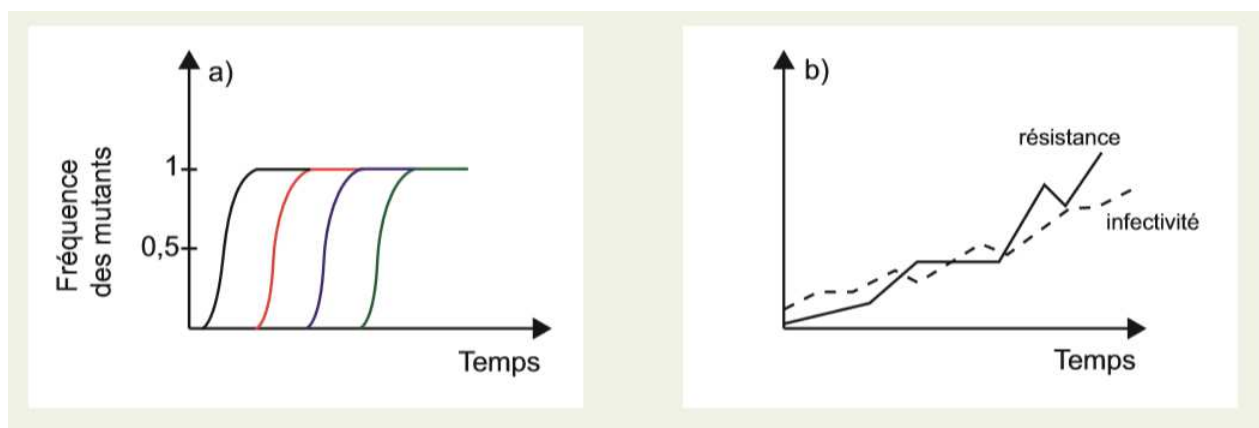
En effet, lors d'une infection par *S. mansoni*, le système immunitaire de l'hôte est capable de reconnaître le parasite grâce au FREP (Fibrinogens-Related Proteins). En parallèle, le parasite est capable de produire des mucines appelées SmPoMuc (*Schistosoma mansoni* Polymorphic Mucins) (Roger et al. 2008). Il a été mis en évidence une grande diversité de mucines chez le parasite à l'échelle individuelle et au niveau de la souche suggérant leur rôle dans le processus de compatibilité (Roger et al. 2008). De plus, Moné et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence d'un complexe immun entre les FREP de *B. glabatra* et les SmPoMuc du parasite (Moné et al. 2010). Dans les interactions incompatibles, la réponse immunitaire du mollusque se caractérise par l'encapsulation du parasite (Loker et al. 1982), et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les hémocytes (Hahn et al. 2000). Quant aux



parasites, ils ont développé des systèmes antioxydants pour contrer le stress oxydatif tel que les ROS-scavenger. Les ROS-scavenger permettent aux parasites de lutter contre les dommages provoqués par les ROS (Moné et al. 2010).

Enfin, il a été démontré que le mollusque est capable de produire une toxine, la biomphalysine, qui associée à d'autres protéines permettra la formation d'un pore transmembranaire responsable de l'élimination du parasite par lyse (Galinier et al. 2013).

Ces résultats suggèrent une réponse mutuelle, à la base des phénomènes de compatibilité, entre les molécules immunitaires du mollusque et d'infectivité du parasite et mettent en évidence des mécanismes d'adaptation locale.



**Figure 4 : Le scénario co-éolutif de la course aux armements.**

Ce scénario repose sur une évolution réciproque de l'hôte et de son parasite avec l'apparition de parasites de plus en plus offensifs et d'hôtes de plus en plus résistants. Ainsi, on peut observer (a) une « succession de balayages sélectifs » couplée à (b) une augmentation de la résistance de l'hôte et à une augmentation de la virulence du parasite (infectivité). Figure extraite d'après Bataillon et al., 2010.

Chez l'être humain, la co-évolution avec le parasite *Plasmodium*, responsable du paludisme, est expliquée par la persistance des maladies génétiques qui affectent les globules rouges. Parmi ces maladies, la plus connue est la drépanocytose, aussi appelée anémie falciforme. Elle se caractérise par une modification de la forme des hémoglobines, qui se présentent alors en forme de S ou de faucille. La drépanocytose est causée par une mutation du gène codant l'hémoglobine au niveau du chromosome 11. La maladie se déclare à l'état homozygote en présence des deux allèles mutés HbS du gène. La persistance de l'allèle HbS au sein des populations, alors que le paludisme est responsable d'environ 1 million de décès chaque année (Sachs & Malaney 2002), s'explique par le fait qu'elle réduit de moitié les épisodes d'anémies sévères (Cserti & Dzik

2015). La drépanocytose offre ainsi un avantage hétérozygote envers les formes les plus graves du paludisme. Ainsi la prévalence de la drépanocytose est élevée dans les populations d'Afrique soumises à de fortes pressions du paludisme.

Le cycle de vie du parasite *Plasmodium* commence dans le foie puis les parasites infectent les globules rouges avant de les détruire. L'éclatement des globules rouges provoque les symptômes caractéristiques du paludisme tels que l'anémie, la fièvre, la paralysie et les complications neurologiques. Ces symptômes résultent plus précisément de la production d'adhésines par le parasite au niveau de la surface cellulaire du globule rouge infecté. La présence des adhésines provoque l'adhésion des globules rouges au niveau des parois des vaisseaux sanguins, les empêchant d'être reconnus par le système immunitaire, ce qui conduit à une insuffisance en oxygène. De plus, chez les personnes infectées le parasite utilise le réseau d'actine du cytosquelette des globules rouges pour créer un réseau d'adressage des adhésines à la membrane. Chez les personnes présentant la mutation de l'hémoglobine, le réseau d'actine n'est pas présent, ce qui empêche le transport des adhésines et donc la dissémination du parasite (Cyrklaff et al. 2012).

Un autre exemple de co-évolution est celui de l'oiseau *Haemorrhous mexicanus* et de sa bactérie *Mycoplasma gallisepticum*. Grâce à l'existence de populations d'oiseaux exposées et non exposées à *Mycoplasma gallisepticum*, une étude a montré que les injections d'isolats bactériens présents lors d'épidémies ont provoqués des symptômes (gonflement des yeux) comparables chez des oiseaux provenant de populations exposées (adaptées par la suite) et non exposées (ancestrales). En revanche, ils ont montré que la probabilité de provoquer des symptômes mortels chez les oiseaux de populations ancestrales après injection d'isolats bactériens prélevés après la propagation de la résistance était trois fois plus forte (Bonneaud et al. 2018).

Enfin, dans d'autres maladies les explications sous-jacentes à la co-évolution restent à éclaircir. Dans le cas du VIH, il a été mis en évidence que la délétion d'un allèle du gène CCR5, conduit à une résistance au VIH (Elsa et al. 2018; Baba et al. 1999). Cette délétion (CCR5-32) code une version tronquée de la protéine membranaire du VIH impliquée dans son entrée dans la cellule cible. La résistance au VIH est conférée par l'état d'homozygotie pour l'allèle CCR5-32. Il a été démontré que la prévalence de la mutation était plus forte en Europe qu'en Afrique. Ainsi,

certaines soutiennent que cette délétion semble avoir été sélectionnée sous la pression d'épidémies de pestes noires (*Yersinia pestis*) durant le Moyen Âge en Europe, alors que d'autres soutiennent « l'hypothèse variole » (*Variola major*) car l'Europe aurait été davantage touchée que l'Afrique par les épidémies de variole (Janvier & Heveker 2005).

## F. Les interactions au sein des maladies multifactorielles

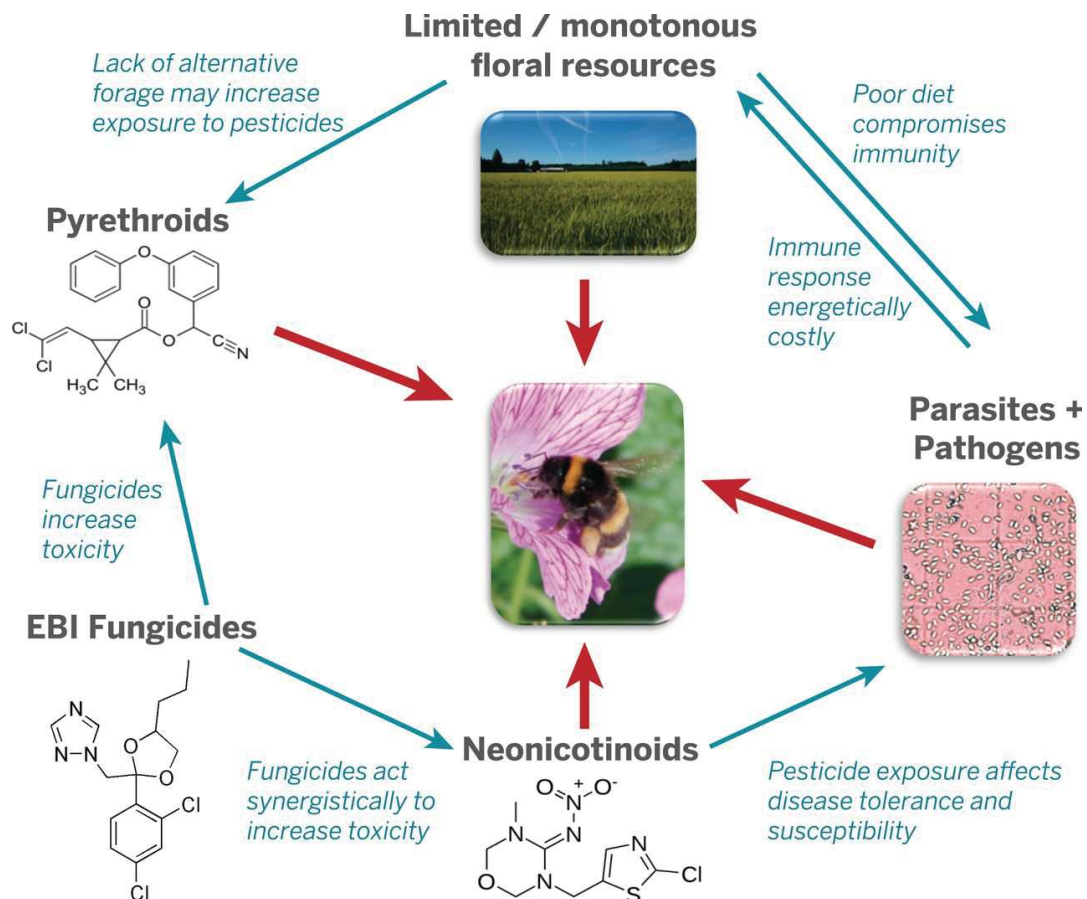
Certaines maladies peuvent être le résultat d'une combinaison de facteurs et il devient ainsi difficile d'évaluer le poids relatif de chacun des facteurs dans l'expression de la maladie. C'est ce qui est observé dans certaines maladies multifactorielles provoquant des mortalités massives et récurrentes chez des espèces non modèles d'intérêt écologique et / ou économique, telles que les pollinisateurs, les coraux et les mollusques marins (Goulson et al. 2015; Guo & Ford 2016; Bourne et al. 2009).

Il a été rapporté que le déclin des abeilles est la conséquence de plusieurs facteurs (Goulson et al. 2015; Vanbergen et al. 2013; Klein et al. 2017; Henry et al. 2017). Parmi eux, la perte de leur habitat est la cause première du déclin avec notamment la transformation des habitats naturels, riches en fleurs, en terres agricoles (Brown & Paxton 2009; Potts et al. 2010; Vanbergen et al. 2013) . Parmi les agents pathogènes les plus connus de l'abeille, le virus des ailes déformés (VWD) et le parasite *Nosema apis* responsable de la nosébose favorisent le déclin des abeilles (Graystock et al. 2013; Genersch et al. 2006; Genersch 2010). Aussi des agents pathogènes non indigènes participent à ce déclin en raison des transferts d'abeilles sur de longues distances. C'est le cas pour l'acarien *Varroa* qui favorise la mort des abeilles en agissant comme vecteur pour d'autres agents pathogènes comme le DWN (Nazzi et al. 2012; Rosenkranz et al. 2010). La présence de pesticides a été évaluée dans les habitats d'abeilles et trois néonicotinoïdes (thiaméthoxame, imidaclopride et clothianidine) et organophosphorés ont été classés dangereux pour les abeilles par rapport à leur toxicité, leur fréquence et leur concentration dans l'environnement (Sanchez-Bayo & Goka 2014). Enfin, les conséquences dues à des changements climatiques ne sont encore que des hypothèses mais doivent être prises au sérieux. Elles résulteraient des changements de l'aire de répartition en réponse au climat, il a ainsi été démontré

pour le bourdon que la limite altitudinale a augmenté en Espagne avec un déclin envisagé à cause d'une mauvaise adaptation aux températures élevées (Ploquin et al. 2013).

En général, l'effet combiné de plusieurs facteurs de stress est susceptible d'être plus nocif qu'un seul facteur de stress (Sih et al. 2004; Koh 2008; Gill et al. 2012), **(Figure 5)**. Dans le pire des cas, des facteurs n'entraînant pas d'effets nocifs significatifs isolés pourraient en combinaison entraîner des effets délétères. Les abeilles sont exposées à des mélanges de pesticides. Les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol (EBI), ont une toxicité très faible mais peuvent augmenter la toxicité de certains néonicotinoïdes et pyréthroïdes jusqu'à 1 000 fois (Pilling & Jepson 1993; Iwasa et al. 2004; Schmuck et al. 2003). Le butoxyde de pipéronyle est souvent ajouté aux formulations de pesticides et agit également en synergie avec certains néonicotinoïdes en augmentant sa toxicité (Iwasa et al. 2004).

Dans les maladies multifactorielles, la difficulté majeure est que le nombre de combinaisons d'agents stressants devient rapidement important. De plus, dans le cas des abeilles, l'exposition aux facteurs de stress est difficile ou impossible à contrôler en raison de leur capacité à voler. Néanmoins, l'interaction entre les parasites, les pesticides et l'alimentation est au cœur des problèmes actuels de la santé des abeilles (Goulson et al. 2015).



**Figure 5 : Exposition des abeilles à différents facteurs de stress en interaction.**

Les différents stress agissant sur les abeilles sont responsables de leurs déclin. Par exemple, l'exposition des abeilles à certains fongicides peut augmenter la toxicité des insecticides. Cette exposition réduit la résistance aux maladies. De plus, les stress alimentaires sont susceptibles de réduire la capacité des abeilles à faire face à la fois aux toxines et aux agents pathogènes. Figure extraite d'après Goulson et al., 2015.

Chez les mollusques marins, un certain nombre de maladies infectieuses a été rapporté tels que la dermo de l'huître orientale affectée par le parasite *Perkinsus marinus*, la maladie liée au parasite QPX des palourdes (Quahog Parasite Unknown), les maladies bactériennes des palourdes et de l'huître *C. virginica* et les infections par l'ostreid herpes virus de type 1 (OsHV-1) (Guo & Ford 2016).

Par exemple, chez l'huître orientale *Crassostrea virginica*, il a été mis en évidence que la transmission de *Perkinsus marinus* n'était pas automatiquement dépendante de la densité des huîtres (Mccollough et al. 2007). Le développement de l'infection dépend de la température et suit un cycle saisonnier avec des infections qui se développaient à des températures supérieures ou égales à 20°C et des mortalités maximales à des températures supérieures à 25°C (Chu & La

Peyre 1993). De même *C. virginica* a été atteinte dans les années 1950 d'importantes mortalités dues au parasite *Haplosporidium nelsoni*. Des études ont démontré que la densité des huîtres n'était pas le seul facteur dans le développement de l'infection. En effet, les infections pouvaient avoir lieu en l'absence d'huîtres infectées à proximité. De plus, des analyses de modélisation mathématique ont permis de prédire que les changements globaux, tels que le réchauffement climatique, avaient des conséquences sur la répartition du parasite, qui aurait tendance à se déplacer vers le Nord (Barber et al. 2016).

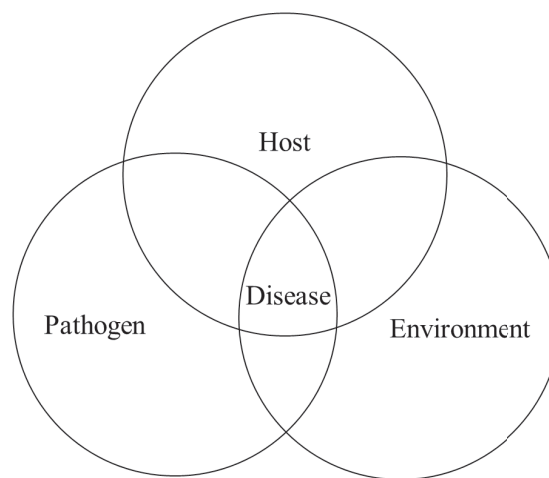
La palourde *Mercenaria Mercenaria* est également atteinte au Nord des Etats-Unis d'un parasite sans nom appelé QPX (Ford 2001; Lyons et al. 2007). L'ADN du parasite a été détecté dans des zones où des épisodes de mortalité associés au parasite ont été enregistrés (Gast et al. 2008). De plus, des études ont mis en évidence que des températures froides favorisaient le développement du parasite (Dahl et al. 2011). Enfin, les fortes densités de palourdes tendent à favoriser la prévalence du parasite (Ford et al. 2002).

Des maladies bactériennes ont également été identifiées chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (la maladie de l'anneau brun (BRD)) et chez *C. virginica* (la maladie de l'huître juvénile (JOD)), en Nouvelle-Angleterre, aux Etats-Unis à la fin des années 80. L'agent étiologique de BRD est *Vibrio tapetis* (Paillard 2004) et celui de la JOD est une bactérie *roseovarius crassos* (Maloy et al. 2007). La BRD affecte les juvéniles et les adultes, et peut tuer jusqu'à 100 % des palourdes si la bactérie est capable de pénétrer dans les tissus mous (Allam et al. 2002). Les deux maladies ont eu l'effet le plus désastreux dans les milieux de culture. Cependant des signes de BRD ont été observés à de faibles niveaux chez les palourdes en dehors des zones de culture (Paillard et al. 2014; Bricelj et al. 1992). La maladie des juvéniles (JOD) se déclare à des températures de plus de 21°C (Bricelj et al. 1992) alors que la maladie des palourdes (BRD) semble dépendre d'un gradient de température compris entre 14°C et 21°C (Paillard 2004; Paillard et al. 2014).

Les infections par l'ostreid herpès virus de type 1 (OsHV-1) sont capables de toucher une gamme d'hôtes importantes tels que l'huître plate européenne *O. edulis*, l'huître *T. chilensis*, l'huître creuse *C. gigas*, les palourdes *V. decussatus*, *M. mercenaria*, *V. philippinarum* et les coquilles Saint-Jacques (Farley 1978; Renault et al. 2000; Arzul et al. 2001). OsHV-1 a également été détecté chez *Crassostrea sikamea*, *C. virginica*, *O. edulis*, *Mytilus*

*galloprovincialis* et *V. philippinarum* en Californie (Burge et al. 2011). Il est également détecté dans divers mollusques bivalves en Chine, y compris *C. gigas*, *C. hongkongensis*, *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis*, *Meretrix meretrix*, *V. philippinarum* et *Scapharca broughtonii* (Bai et al. 2015). Un résumé de l'OsHV-1 et de son interaction avec *C. gigas* est détaillé dans le chapitre IV section 1-b.

Actuellement les mécanismes de transmission entre les agents pathogènes et les mollusques marins ne sont pas clairs. De plus, les activités humaines et les changements environnementaux peuvent constituer des causes majeures du développement des maladies. Ainsi certains soutiennent que les infections peuvent être causées par l'association de l'augmentation de la température de l'eau et des pratiques culturelles à fortes densités. Ces facteurs augmentent le stress des animaux et par conséquent les infections (Guo & Ford 2016). Comme déjà décrit par Snieszko, la maladie et la mortalité sont le résultat d'interactions complexes hôte-agents pathogènes influencées par l'environnement (Snieszko 1974), (**Figure 6**).



**Figure 6 : Schéma d'interactions des facteurs dans le développement des maladies infectieuses.**

Une susceptibilité de l'hôte couplée à l'exposition à des agents pathogènes sous l'influence de conditions environnementale sont la cause du développement de maladies. D'après Snieszko 1974.



- ⇒ L'ensemble de ces études impliquant des facteurs écologiques, évolutifs, intrinsèques à l'hôte et des agents pathogènes multiples, met en lumière la nécessité d'aborder les maladies infectieuses par des approches holistiques, de manière à prendre en compte, dans un même cadre expérimental, l'ensemble des acteurs impliqués, de façon directe et / ou indirecte, dans le mécanisme de pathogénèse. Cette nouvelle approche est aujourd'hui rendue possible par le développement de nouvelles technologies.

## II. Les nouvelles méthodes pour appréhender les maladies d'étiologies complexes

Une des grandes révolutions dans le domaine de la biologie moléculaire a été le développement du séquençage de nouvelle génération aussi appelé NGS, pour « next generation sequencing ». Le NGS permet de séquencer l'ADN ou l'ARN de n'importe quel organisme avec une plus grande profondeur et beaucoup plus rapidement que les anciennes techniques, telles que le séquençage de Sanger (Metzker 2010). Ces analyses constituent des moyens pertinents pour aider à la compréhension des mécanismes infectieux. En effet, des études de dual transcriptome permettent aujourd'hui d'avoir accès à la réponse transcriptomique induite chez l'hôte mais également au transcriptome de l'agent pathogène considéré. Des études ont ainsi permis d'affiner les mécanismes d'interaction entre l'hôte et ses agents pathogènes dans des pathologies (Bai et al. 2018; Zhou et al. 2016; Juranic Lisnic et al. 2013). Par exemple, un dual transcriptome réalisé sur le cytomégalovirus murin (MCMV) et ses cellules hôtes au cours d'une infection a permis (i) de démontrer que l'infection par le virus induit une réponse cellulaire dans les fibroblastes avec un certain nombre de gènes exprimés par la souris, associés à l'inflammation et l'immunité, (ii) d'identifier un transcrit viral abondant codant pour une nouvelle protéine. L'ensemble de ces résultats permet aujourd'hui d'approfondir les connaissances sur la pathogénèse du cytomégalovirus (Juranic Lisnic et al. 2013). De même, chez la palourde *Scapharca broughtonii* infectée par un herpès virus de type 1 (OsHV-1), Bai et ses collaborateurs ont montré par un double séquençage, une induction des inhibiteurs de l'apoptose chez l'hôte. De plus, l'analyse des transcrits viraux a permis d'identifier deux ORFs (ORF99 and ORF42) qui codent pour des inhibiteurs d'apoptose viraux. Ces deux mécanismes permettent au virus de se répliquer dans les cellules hôtes. Enfin, l'analyse des peroxydases et des hémoglobines de la palourde a permis de



mettre en évidence la mise en place d'une réponse oxydative des cellules hôtes face à l'infection par le virus (Bai et al. 2018).

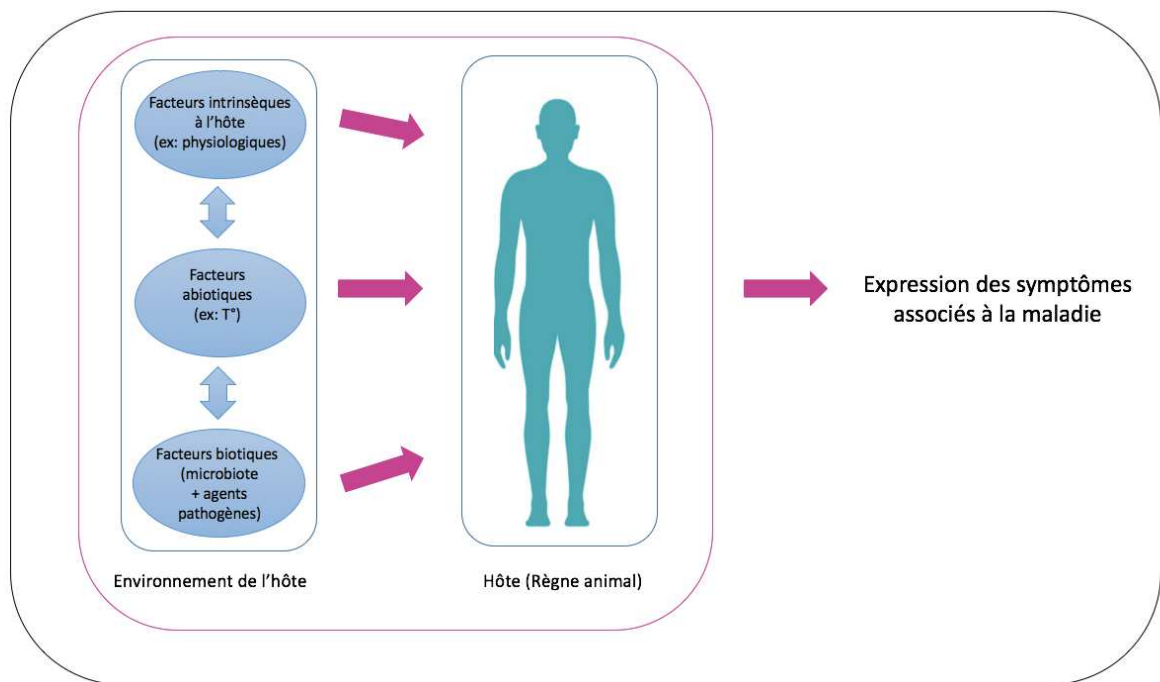
De même des études de métagénomique ou metabarcoding par séquençage de l'ADN permettent d'avoir accès à la structure et à la diversité des communautés bactériennes, virales ou eucaryotes dans les systèmes d'étude (Villegas et al. 2018; Wamaitha et al. 2018; Gill et al. 2006). Ces nouvelles approches sont exhaustives et permettent de ne plus se cantonner uniquement sur les microorganismes cultivables, qui étaient communément utilisés pour identifier les agents pathogènes responsables des maladies. Ces analyses du microbiote ouvrent la porte à une plus grande diversité de microorganismes qui peuvent potentiellement avoir des implications dans les mécanismes de pathogénèse.

La progression dans la conception des systèmes d'études a également grandement participé à l'amélioration de la compréhension des maladies d'étiologie complexe. En effet, les notions de microcosme ont laissé place aux notions de mésocosme. Les mésocosmes sont des dispositifs expérimentaux qui ont pour but de retranscrire au mieux les conditions naturelles du système étudié. Dans ces structures, il est ainsi possible de contrôler différents paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité, le pH ou d'autres facteurs impliqués dans le pathosystème. Les études dans lesquelles des structures en mésocosme ont été effectuées ont permis par exemple d'évaluer l'effet seul de la variation de température sur la pathogénicité de nématodes entomopathogènes parasites obligatoires d'insectes (différentes espèces de parasite testées sur la teigne *Galleria mellonella*) (El Khoury et al. In prep) La possibilité de faire varier en milieu contrôlé uniquement la température a permis de montrer que la pathogénicité des nématodes est fortement favorisée dans une fenêtre thermique située entre 15°C et 20°C. D'autres ont permis de dissocier l'effet de facteurs confondus. Un exemple est le découplage des effets de l'ammoniac, de la température et de la salinité sur le pouvoir infectieux du White Spot Syndrome Virus (genre *Whispovirus*) qui est l'un des agents pathogènes de crevette causant le plus de mortalité dans les élevages à travers le monde avec une perte de production de 300 000 tonnes soit environ 1 milliard de dollars US par an (Xue et al. 2017; Haryadi et al. 2015). Ce virus a été pour la première fois détecté à Taiwan en 1992 (Chou Hsin-Yiu et al. 1995), puis s'est répandu dans la quasi-totalité des pays producteurs. L'utilisation d'une approche en mésocosme a permis de montrer que les mortalités ainsi que la réplication virale étaient significativement

diminuées à une basse température (18°C) ainsi qu'à une faible salinité (20 ‰). En revanche, le taux d'ammoniac n'a pas eu d'effet aux concentrations testées (de 0,34 à 14 mg/L).

Néanmoins, ces données corrélatives apportées par l'utilisation de modèles expérimentaux contrôlés demandent à être approfondies par l'identification des mécanismes sous-jacents.

Ces progrès techniques couplés aux efforts de recherche sur la compréhension des pathologies ont amenés à élargir les connaissances sur les mécanismes de certaines pathologies. Par conséquent, depuis quelques années, une nouvelle vision, plus complète, des postulats de Koch émerge dans le domaine scientifique. Cette vision ne se concentre plus uniquement sur l'étude d'un seul agent pathogène mais sur les interactions entre l(es) agent(s) pathogène(s), le microbiote, l'hôte et son environnement. Elle prend ainsi en compte l'ensemble des acteurs susceptibles d'être impliqués dans le développement d'une maladie en ayant un rôle direct et/ou indirect dans la pathogénèse. Nous proposons en **figure 7**, un schéma explicatif de cette nouvelle vision à partir des facteurs identifiés précédemment dans l'état de l'art.



**Figure 7 : Rôle des facteurs biotiques, abiotiques et intrinsèques à l'hôte dans les maladies infectieuses.**

L'hypothèse que nous suggérons est qu'il existe des interactions potentielles entre les différents facteurs conduisant l'hôte à développer des maladies. Ainsi la présence d'agents pathogènes peut être influencée par ces différents facteurs de manière indirecte (l'agent pathogène perturbe le microbiote, qui a son tour provoque la prolifération de bactéries pathogènes responsable d'une infection) ou directe (effet par exemple de la température sur la transmission d'un parasite). Par conséquent il semble nécessaire d'étudier l'ensemble des facteurs susceptibles d'agir sur l'hôte et de provoquer la maladie. L'effet de ces facteurs doit ensuite être évalué de manière individuelle puis en interaction pour valider leurs effets. Les facteurs évolutifs sont également impliqués dans les maladies ils agissent sur des échelles plus longues et conduisent les hôtes à développer des mécanismes ou non de résistance.

L'huître creuse *Crassostrea gigas* souffre depuis de nombreuses années de mortalités récurrentes qui se sont intensifiées depuis 2008. Malheureusement les mécanismes associés à la pathogénèse n'ont pu être intégralement déchiffrés en raison de l'absence de la mise en place d'approches holistiques pour caractériser cette pathologie d'étiologie complexe.

### III. Mon modèle d'étude l'huître creuse *Crassostrea gigas*

#### A. Biologie et écologie de l'huître

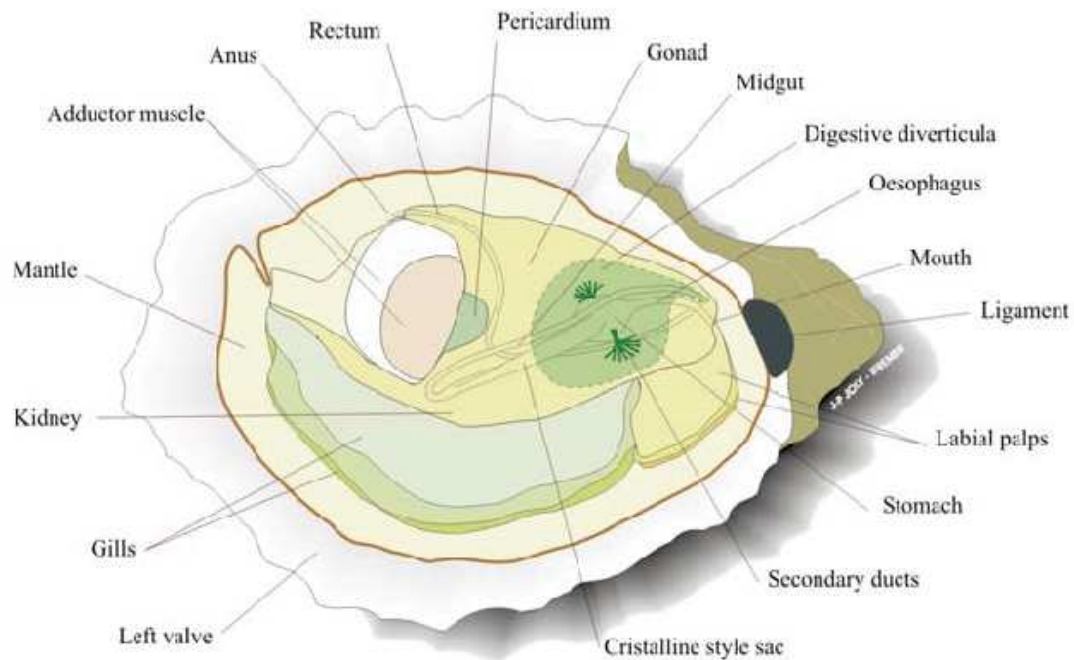
Les huîtres creuses aussi appelées huîtres Japonaises ou huîtres du Pacifique sont de l'espèce *Crassostrea gigas*. Ce sont des mollusques bivalves de la famille des *Ostreidae*. Il s'agit de

filtreurs sessiles vivant dans les eaux peu profondes des zones intertidales des baies, des lagunes et des estuaires (Harris 2008). L'huître est constituée d'un corps mou recouvert par une coquille de carbonate de calcium constituée de 2 valves. Elle possède différents organes qui sont impliqués dans différentes fonctions. La bouche est entourée par les palpes labiaux qui assurent le tri et l'assimilation des particules. Les particules sont acheminées jusqu'au tube digestif et l'excrétion des produits de la digestion est réalisée par la production de fèces au niveau de l'anus. Le manteau permet la calcification de la coquille, les branchies ont un double rôle, elles assurent la respiration et permettent la filtration des particules (Bougier et al. 1995). Le muscle adducteur a un rôle important car il permet la fermeture des valves. Enfin, la gonade qui assure la reproduction des gamètes peut atteindre en période de gamétogénèse jusqu'à 70 % du poids total sec de l'huître adulte (Miossec et al. 2009). L'anatomie de *C. gigas* est illustrée en **Figure 8**.

L'huître est un organisme hermaphrodite successif à tendance protandre, c'est-à-dire que son sexe change chaque saison en étant d'abord mâle, la première année, puis femelle (Guo et al. 1998). La gamétogénèse est thermo-dépendante, elle a lieu à une température comprise entre 18°C et 22°C (Fabioux et al. 2005; Enríquez-Díaz et al. 2008). Une huître est capable de produire un nombre élevé de gamètes de 20 à 100 millions de gamètes. La fécondation entre les gamètes mâles et femelles est externe, elle a lieu dans la colonne d'eau. Les larves produites sont totalement planctoniques pendant 2 à 3 semaines puis se métamorphosent lorsqu'elles rencontrent un substrat sur lequel elles peuvent se fixer. Ainsi, le cycle de vie de l'huître comporte 2 phases, une phase pélagique totalement larvaire et une phase benthique qui commence à la fixation du naissain et qui persiste durant toute la vie de l'huître.

Son immunité est assurée par les cellules immunocompétentes appelées hémocytes. En effet, l'huître *C. gigas* possède un système circulatoire semi ouvert dans lequel circule l'hémolymph, le sang de l'huître (Bachere et al. 2004). L'hémolymph contient les hémocytes, qui sont les principaux médiateurs cellulaires du système de défense des bivalves (Schmitt et al. 2012). Ils jouent également un rôle dans les fonctions vitales de l'huître comme la recalcification de la coquille, le transport des nutriments, la digestion et l'excrétion. Les mécanismes de défense chez l'huître sont exposés dans la section D. Du fait de son incapacité à se mouvoir, les huîtres subissent les variations de leur environnement et sont soumises à de nombreux facteurs biotiques et

abiotiques potentiellement néfastes pour l'huître (virus et bactéries pathogènes, toxines algales, pesticides, variation de température et de salinité, ...) sans pouvoir s'y soustraire. L'effet de certains de ces facteurs pouvant contribuer à des phénomènes de mortalité massive comme observées chez les juvéniles d'huître.

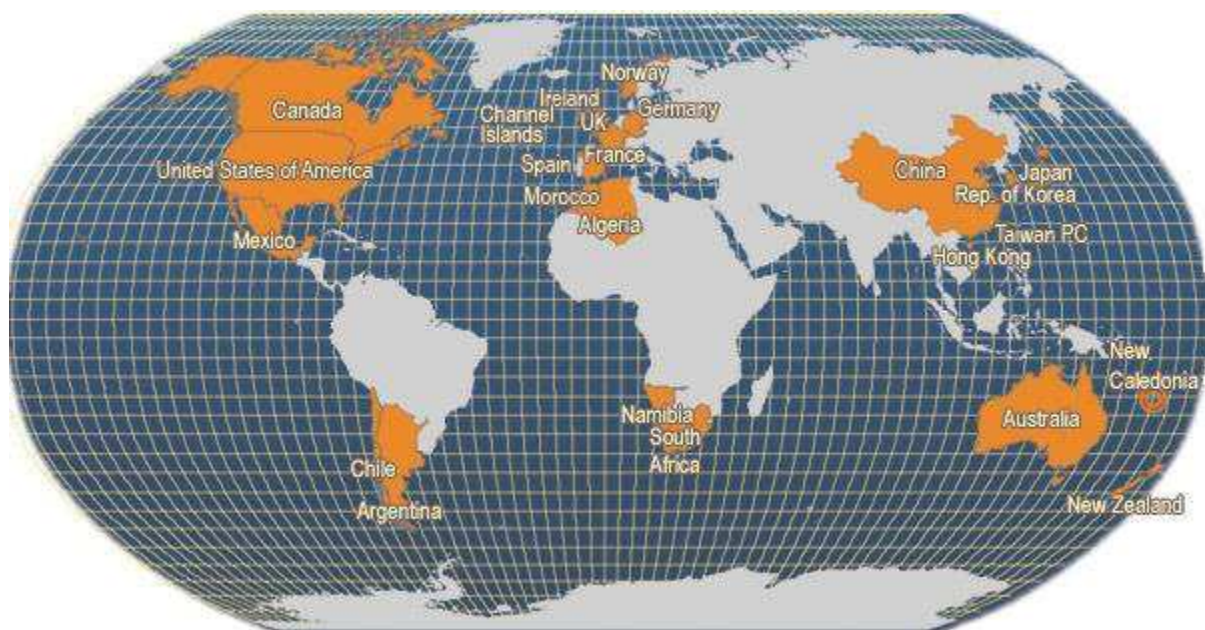


**Figure 8 : Représentation schématique des différents organes (valve inférieure) de *C. gigas*.**  
Figure extraite d'après Miossec et al., 2009.

## B. Des espèces exploitées et soumises aux épizooties

La première épizootie a été décrite chez l'huître plate (*Ostrea edulis*) et remontent à l'année 1877 dans le bassin d'Arcachon. Cette maladie a été nommée « la maladie du pied ». Les observations de l'époque ont fait état d'une huître amaigrie avec un muscle adducteur ayant perdu son adhérence à la coquille. « Une tache noire » et « des points gris foncé » étaient observés au centre du muscle adducteur. Les observations microscopiques réalisées ont permis d'identifier la présence de parasites. L'hypothèse développée à cette époque était que le parasite détériorait le muscle de l'huître, l'empêchant ainsi de fermer correctement ses valves. Il en résultait une exposition de l'huître à « de nombreuses causes de destruction » (Dollfus 1921).

Depuis cette première description, l'ostréiculture française a été émaillée de crises graves qui ont régulièrement obligé les ostréiculteurs à adapter leurs pratiques culturales. C'est le cas pour l'huître plate endémique *Ostrea edulis* dont les élevages ont subi un premier épisode de mortalité dans les années 1920. Les causes de cette épizootie restent inconnues et la maladie n'a pu être caractérisée (Dollfus 1921). Deux autres événements de mortalité ont touché l'huître plate en 1968 et 1980. Les efforts de recherche ont abouti à l'identification de deux parasites associés à ces mortalités : *Marteilia refringens* et *Bonamia ostreae* (Comps 1970; Pichot et al. 1980). Mais le plus grave de ces événements de mortalité s'est produit entre 1966 et 1972, période durant laquelle la principale espèce d'huître cultivée en France, l'huître portugaise *Crassostrea angulata*, a été totalement éradiquée par un pathogène viral, un iridovirus (Comps et al. 1976). Pour faire face à l'effondrement des productions, l'introduction et la culture d'une nouvelle espèce, l'huître japonaise *Crassostrea gigas* a été initiée en France dès le début des années 1970. L'utilisation de cette nouvelle espèce d'huître a relancé l'ostréiculture française qui repose aujourd'hui, comme dans de nombreux pays, très largement sur cette espèce (**Figure 9**).



**Figure 9 : Pays producteurs de *C. gigas* dans le monde.**  
D'après (FAO 2006).



## C. L'huître creuse *C. gigas* touchée par différents types de mortalité

Suite à son introduction en France, *C. gigas* a subi à son tour des mortalités récurrentes et massives. La gravité du phénomène n'a cessé d'augmenter depuis 2008 et décime jusqu'à 90 % des cheptels selon les zones et les années, ce qui entraîne des pertes économiques considérables. En effet, depuis son introduction, plusieurs maladies de l'huître *C. gigas* ont été observées en fonction des agents pathogènes associés aux mortalités et ceci à différentes échelles temporelles. Jusqu'en 2008, les huîtres ont été affectés par ce qui a été appelé : le syndrome des « mortalités estivales », caractérisé par des mortalités lorsque les huîtres étaient en fin de maturation sexuelle quand la température de l'eau atteignait 19°C (Samain & Mc Combie 2008; Gay et al. 2004). L'ensemble des travaux de recherche réalisés a permis de mettre en évidence que des bactéries du genre *Vibrio* et un herpes virus, dénommé, Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1) étaient quasi-systématiquement retrouvés au sein des huîtres (Samain & Mc Combie 2008). L'hypothèse développée alors était qu'en période estivale, les huîtres en gamétogénèse seraient davantage sujettes à des infections par des agents pathogènes par un mécanisme de trade-off immunité/reproduction (Samain & Mc Combie 2008).

Depuis 2008, des mortalités plus importantes, comprises entre 60 % et 90 % du cheptel selon les sites et les années (Bulletin de surveillance ECOSCOPA) ont été observées au niveau des stades juvéniles (avant gamétogénèse). Les premières mortalités apparaissent généralement dans le bassin méditerranéen en avril, puis le long de la côte atlantique en se prolongeant durant l'été. Contrairement aux mortalités observées précédemment, celles observées depuis 2008 surviennent lorsque la température de l'eau dépasse 16°C (les mortalités s'arrêtent lorsque les températures dépassent 24°C). La cause de cette « nouvelle maladie », semble complexe et les efforts de recherche ont révélé une série de facteurs contributeurs : des facteurs environnementaux et anthropiques, la génétique de l'huître ainsi que les agents pathogènes (Azéma et al. 2017; Le Roux, Wegner, and Polz 2016; Petton et al. 2015; Barbosa Solomieu, Renault, and Travers 2015). Depuis 2008, l'augmentation des mortalités d'huîtres coïncide avec la détection d'un nouveau variant d'OsHV-1 (OsHV-1  $\mu$ Var) dans les huîtres moribondes (Segarra et al. 2010; Martenot et al. 2016).

Ces dernières années, ce syndrome de mortalité, appelé syndrome de mortalité des huîtres du Pacifique (POMS), (Paul-pont et al. 2013), est devenu panzootique et est observé dans toutes les régions côtières de France et dans d'autres pays d'Europe et d'autres continents (Barbosa Solomieu et al. 2015).

Les efforts de recherche se sont concentrés principalement sur l'hypothèse virale. Cependant, la participation d'autres agents étiologiques ne peut être rejetée. En effet, l'apparition de la maladie a été associée à un remplacement progressif de bactéries commensales par une population virulente de vibrions du clade *Splendidus* (Lemire et al. 2014) et les mécanismes de leur virulence sont en grande partie élucidés (Bruto et al. 2017; Bruto et al. 2018). Des travaux récents ont également suggéré que l'influence du microbiote semblait devoir être également prise en compte (Le Roux et al. 2016). En effet, l'hémolymph des huîtres saines est peuplée d'un microbiote riche et la stabilité de ces associations a été proposée pour influencer la résistance des huîtres au stress ou à l'invasion par des agents pathogènes (Wegner et al. 2013; Lokmer and Wegner 2015; Lokmer et al. 2016).

Outre ces mortalités impliquant le virus OsHV-1 et potentiellement des souches bactériennes de clade *Splendidus*, des mortalités de *C. gigas* au stade adulte associées à un unique vibrio (*V. aestuarianus*) sont régulièrement rapportées par le réseau Ifremer ECOSCOPA. Des souches de *V. aestuarianus* ont été initialement isolées au cours d'épisodes de mortalité sur des huîtres moribondes entre 2001 et 2003 sur différents sites français (Garnier et al. 2008). Depuis ces premières identifications, de nombreuses autres souches de *V. aestuarianus* ont été isolées dans d'autres épisodes de mortalité et en particulier en 2012 où il y a eu des questionnements sur la réémergence de souches anciennes ou l'émergence de nouvelles souches plus virulentes. Des travaux basés sur des infections expérimentales ont démontré que les différentes souches induisent les mêmes taux de mortalité suggérant qu'il s'agit de la même maladie qui impacte les huîtres de façon plus ou moins intense en fonction des années et des sites (Travers et al. 2017). Des bases génétiques de la susceptibilité des huîtres à *V. aestuarianus* ont pu être mises en évidence mais avec néanmoins une faible héritabilité (Azéma et al. 2017). De plus, aucune corrélation entre la résistance à *V. aestuarianus* et la résistance à OsHV-1 n'a été trouvée. Ceci est appuyé par le fait que les éléments de la réponse immunitaire induient par ces deux types de pathogènes sont différents (Green et al. 2016). Un élément intéressant est l'effet de l'âge/taille des huîtres sur la sensibilité à *V. aestuarianus*, avec une sensibilité qui augmente avec l'âge



contrairement à OsHV-1 avec une sensibilité qui diminue avec l'âge (Azéma et al. 2017). Néanmoins aucune base moléculaire n'a pu être identifiée à ce jour. Les mécanismes de virulence de *V. aestuarianus* ont été recherchés par des analyses de génomique comparative et fonctionnelle ce qui a permis d'identifier et de valider l'implication du gène varS dans la virulence (Goudenège et al. 2015). VarS est un gène qui code pour une « signal transduction histidine-protein kinase » impliquée dans la sécrétion et/ou l'activité et/ou la production d'une metalloproteinase (Vam) possédant un effet létal pour *C. gigas* (Goudenège et al. 2015; Labreuche et al. 2010). Récemment un modèle écologiquement réaliste en mésocosme a été mis au point, montrant l'importance d'un passage dans l'hôte pour induire la virulence (*versus* culture *in vitro*) (Parizadeh et al. 2018) et apportant ainsi un outil d'intérêt pour aller plus loin dans la caractérisation de la pathogénèse et des bases moléculaires de la résistance/susceptibilité. Ainsi, cet outil associé à des analyses histologiques ont permis de montrer que l'hémolymph était un site important pour la colonisation initiale suivie d'une infiltration dans les tissus induisant une septicémie (Parizadeh et al. 2018).

### 1. Facteurs biotiques associés aux mortalités de *C. gigas* et potentiellement impliqués dans la pathogénèse

Dans cette partie nous discuterons principalement des facteurs biotiques associés aux mortalités des juvéniles d'huîtres *C. gigas*. Toutefois, lorsque nous introduirons d'autres stades de développement (adultes ou larves) de *C. gigas* ou d'autres espèces de bivalves cela sera spécifié.

#### a. L'OsHV-1 et ses variants

L'Ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) est un virus de type herpès de la famille des *Malacoherpesviridae* appartenant au genre *Ostreavirus*. C'est un virus à ADN double brin de 207 439 paires de bases comportant au total 124 ORFs (open reading frames). Son séquençage complet a eu lieu en 2005, après sa purification à partir de larves de *C. gigas* infectées (Le Deuff & Renault 1999).

L'OsHV-1 a été régulièrement détecté en France durant les phénomènes de mortalité observés chez *C. gigas* depuis les années 1990. Cependant d'autres cas de détection de ce virus ont été

rapportés dans d'autres pays où l'huître est cultivée tels que la Nouvelle Zélande (Hine et al. 1992), les Etats-Unis (Friedman et al. 2005), l'Irlande et le Royaume-Uni (EFSA 2010) ainsi que l'Australie. Ce virus a également été détecté chez d'autres mollusques bivalves tels que l'huître plate française (Comps & Cochenne 1993), l'huître plate de Nouvelle Zélande (Hine et al. 1998), l'huître plate Australienne (Hine & Thorne 1997), la palourde japonaise (Renault et al. 2001) et la coquille Saint-Jacques (Arzul et al. 2001) ;

Un premier variant de OsHV-1, nommé OsHV-1 var, a été caractérisé en 1997 dans des échantillons de *C. gigas* et *Ruditapes philippinarum* lors d'un épisode de mortalité en Normandie (Martenot 2013).

Depuis 2008, un nouveau variant de l'OsHV-1, nommé OsHV-1  $\mu$ Var, a été caractérisé au sein d'échantillons de *C. gigas* prélevés sur les côtes françaises. De même que pour OsHV-1, l'OsHV-1  $\mu$ Var a été détecté chez d'autres espèces de mollusques bivalves telles que les moules *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et la telline *Donax trunculus* (Cochenne-Laureau et al. 2010; Pernet et al. 2011). Bien que OsHV-1, OsHV-1 Var et OsHV-1  $\mu$ Var aient été retrouvés dans d'autres organismes que *C. gigas*, aucune mortalité associée n'a été mise en évidence sur ces organismes.

L'ensemble des travaux de recherche réalisés a permis d'émettre l'hypothèse que les épisodes de surmortalités observés chez les juvéniles de *C. gigas* étaient associés à l'émergence d'un variant de l'OsHV-1 appelé OsHV-1  $\mu$ Var (Segarra et al. 2010). En effet, en 2009, la forme  $\mu$ Var du virus a été détectée dans 96 % des échantillons de *C. gigas* issus d'épisodes de mortalité en France (Martenot 2013). Cependant, bien que l'OsHV-1  $\mu$ Var soit détecté en France depuis 2008, cet agent pathogène avait déjà été détecté sur des échantillonnages de juvéniles dès 2004 en Normandie (Martenot 2013). Ainsi, l'origine du virus OsHV-1 et l'émergence de l'OsHV-1  $\mu$ Var demeurent actuellement inconnues. Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer l'apparition du variant OsHV-1  $\mu$ Var. La première repose sur la possible importation de ce variant suite aux échanges de mollusques entre la France, les Etats-Unis et le Pacifique. La seconde concerne une possible modification évolutive du virus due à des changements des conditions du milieu extérieur tels que la température. Ainsi l'OsHV-1  $\mu$ Var posséderait un avantage infectieux ce qui expliquerait sa forte détection dans les échantillons depuis 2008.

Les variants de l'OsHV-1 se caractérisent par des modifications dans leurs séquences nucléotidiques par rapport au génome de référence de l'OsHV-1. L'OsHV-1  $\mu$ Var présente la

suppression de 3 ORF (ORF36, ORF37 et une partie de l'ORF38), la délétion d'adénosine en amont de l'ORF43 et une délétion de 12 nt dans le locus microsatellite H10.

Quoi qu'il y en soit, à ce jour les différences fonctionnelles entre OsHV-1 et ses variants sont inconnues. En effet, le problème pour l'étude de ce virus est qu'il n'y a pas de lignées cellulaires de mollusques marins pour le cultiver ce qui rend sa purification problématique. Ainsi, les connaissances à son sujet reposent principalement sur l'analyse d'images obtenues en microscopie électronique à transmission (MET). Il a été proposé sur la base de ces images, un cycle de réplication hypothétique qui est discuté au chapitre II/a de la discussion (Renault et Segarra., in prep).

D'autres moyens sont également utilisés pour approfondir les connaissances sur l'OsHV-1. En effet, des études moléculaires à partir de la PCR quantitative en temps réel (qPCR) et du séquençage ADN/ARN ont été réalisées. Récemment il a été mis en évidence une réplication virale de OsHV-1 dans les hémocytes d'huîtres au cours d'une cinétique d'infection (Martenot et al. 2017). Une augmentation des transcrits viraux a été observée dans les hémocytes d'huîtres 2h, 24h et 48h post-infection pour 3 gènes qui codent des protéines membranaires et 1 gène qui code un inhibiteur d'apoptose. Cette étude a été réalisée par injection du filtrat viral dans le muscle adducteur puis récolte des hémocytes. Une autre étude s'est intéressée à l'interaction virus-hémocytes dans un système *in vitro* (Morga et al. 2017). Les hémocytes d'huîtres saines de *C. gigas* ont été collectés et exposés *in vitro* à une suspension virale. Les résultats montrent que l'ARN viral est détectable 1 heure après le contact avec une augmentation de l'ARN viral au cours du temps, jusqu'à 24h. L'ensemble de ces résultats montre que le virus est capable d'infecter les hémocytes et de se répliquer rapidement (dans les premières heures qui suivent l'exposition). Aucune de ces études n'a cependant pu montrer les particules virales enveloppées dans les hémocytes suggérant ainsi que les hémocytes ne seraient pas un emplacement privilégié pour la production de particules virales infectieuses. En effet, la détection de l'ADN d'OsHV-1, de l'ARN et la détection de protéines dans les hémocytes semblent indiquer que le virus pourrait initier son cycle de réplication dans ces cellules sans atteindre la production de particules enveloppées (Martenot et al. 2017).

Bien que de nouveaux variants aient été caractérisés, nous ignorons la virulence de ces différents variants chez les mollusques mais également leurs interactions potentielles au cours d'un épisode

infectieux. Des études de virulence semblent donc nécessaires pour approfondir les connaissances sur OsHV-1 au cours d'épisodes infectieux chez *C. gigas*.

#### b. Les bactéries du genre *Vibrio*

Des bactéries du genre *Vibrio* sont régulièrement associées à des mortalités d'huîtres aux stades juvénile et adulte. Les bactéries du genre *Vibrio* appartiennent à la famille des *Vibrionaceae* et à la classe des *Gamma proteobacteria*. Ce sont des bactéries à Gram négatif qui mesurent 0,5 à 1 µm de diamètre et de 1,2 à 3,5 µm de long. Ces bactéries sont le plus souvent mobiles du fait de la présence de flagelles polaires et ou latéraux (Thomspon et al. 2004). Les bactéries du genre *Vibrio* sont très abondantes dans les milieux aquatiques tels que les mers et océans, les estuaires et les sédiments marins côtiers. Elles peuvent se présenter sous différentes formes de vie, planctoniques libres, sous forme de biofilms ou être associées à des organismes hôtes. Dans ce dernier cas différents types d'interactions *Vibrio*-hôte peuvent être observés. Ces bactéries peuvent être i) commensales, les deux organismes cohabitant dans un même environnement sans qu'aucun des deux n'interagisse sur l'autre ; ii) endosymbiotiques, une interaction caractérisée par une relation à bénéfices réciproques ou encore iii) pathogènes, bien que ce type d'interaction soit le moins fréquemment rencontré (Austin 2010). Des associations avec des microparticules ont aussi été décrites (Foulon et al. 2016).

D'après la liste de la société de bactériologie systématique et vétérinaire, le genre *Vibrio* comporte 117 espèces (Bactério.net.2014), et le nombre de nouvelles espèces est en perpétuelle augmentation. De nombreuses maladies associées aux vibrios appelées vibrioses sont connues pour être responsables de mortalité dans les élevages aquacoles d'huîtres. Par exemple, *Vibrio tubiashii* est un agent pathogène associé aux larves de bivalves marin (Sawabe et al. 2013). Des souches de *V. tubiashii* ont été isolées chez des larves de *C. gigas*. La virulence de ce vibrio repose sur les produits de sécrétion (ECP extracellular products) dont une métalloprotéase et une hémolysine (Hasegawa et al. 2008). Il a été démontré que les ECP inhibent la phagocytose des hémocytes de l'huître (Travers et al. 2014). Chez les huîtres adultes, nous l'avons vu précédemment *Vibrio aestuarianus* est impliqué dans des épisodes de mortalité depuis 2001 avec une augmentation depuis 2012 (Travers et al. 2017).

Il est important de signaler que les huîtres *C. gigas* ne sont pas les seules espèces touchées par les vibrioses. Les vibrios sont notamment connus pour être responsables de mortalités dans les élevages aquacoles de poissons chauve-souris (*Platax orbicularis*) avec *V. harveyi* (Saulnier et al, in prep) et d'huîtres perlières (*Pinctada margaritifera*) avec *V. harveyi* (Saulnier et al, in prep) en Polynésie française et de crevettes (*Litopenaeus stylirostris*) avec *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida* (Costa et al. 1998) en Nouvelle Calédonie. Les vibrios sont responsables de vibrioses dont les signes cliniques varient selon les espèces. L'espèce *V. harveyi* est responsable chez le poisson chauve-souris de septicémies. Chez la crevette *L. stylirostris*, *V. penaeicida* est associé à l'apparition d'une maladie saisonnière appelée « Syndrome 93 » qui touche les élevages durant la saison fraîche en Nouvelle-Calédonie (Mermoud et al. 1998). Les crevettes apparaissent affaiblies avec un comportement de nage anormal, irrégulier (Goarant et al. 1998). *V. nigripulchritudo* est responsable d'une autre maladie saisonnière appelée « Syndrome d'été » caractérisée par des mortalités massives durant la saison chaude. Les crevettes malades sont également affaiblies, le muscle présente une couleur opaque et leur exosquelette apparaît de couleur noire (Costa et al. 1998). Chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera*, des anomalies de minéralisation de la perle ont été observées suite à des infections par le genre *Vibrio* (Ogimura et al. 2012).

Chez les palourdes, *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus*, *V. tapetis* a été associé à la maladie de l'anneau brun (BRD), (Paillard 2004). La mortalité des palourdes était associée à la présence d'un dépôt brun sur la surface interne des valves (Paillard & Maes 1994). Des études ont permis d'identifier des facteurs d'adhérences et cytotoxiques associés à la virulence de *V. tapetis* (Lane & Birkbeck 2000). Enfin, depuis 1998, des mortalités massives sont observées chez l'ormeau, *Haliotis tuberculata* et ont été attribuées à *V. harveyi* (Travers et al. 2009; Travers et al. 2008). Ces mortalités apparaissent au cours de la période de la reproduction des ormeaux, en présence de températures élevées. Il a ainsi été démontré expérimentalement que cette maladie est le résultat d'une combinaison de facteurs : l'exposition bactérienne, la température de l'eau et l'état de reproduction qui influe sur la sensibilité à la maladie des ormeaux (Travers et al. 2008).

Contrairement à l'OshV-1, les mécanismes de virulence des vibrios chez les juvéniles d'huîtres *C. gigas* ont pu être caractérisés. Il a été mis en évidence que les vibrios associés aux mortalités de juvéniles d'huîtres en atlantique sont du clade *Splendidus*. Au sein de ce clade, les populations

virulentes associées positivement aux huîtres sont essentiellement des *Vibrio crassostreae* et *Vibrio tasmaniensis* (Bruto et al. 2017; Bruto et al. 2018). Il existe d'autres populations virulentes mais elles ont des associations neutres écologiquement avec les huîtres. Différents mécanismes de virulence ont été caractérisés chez ces deux populations (Thèse de Doctorat de Tristan Rubio, 2014-2017) et sont résumés dans les paragraphes suivants.

#### *i. Vibrio tasmaniensis*

Il a été mis en évidence que *V. tasmaniensis* LGP32 est un pathogène bactérien intracellulaire des hémocytes des juvéniles d'huîtres *C. gigas* (Vanhove et al. 2015). Cette bactérie est capable d'échapper à la réponse immunitaire engendrée par les hémocytes de l'huître grâce à la porine OmpU présente au niveau de sa membrane. Pour cela, un mécanisme moléculaire a été décrit par Duperthuy et ses collaborateurs (Duperthuy et al. 2010; Duperthuy et al. 2011). La phagocytose de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 par les hémocytes requiert 3 protéines : (i) Cg-SOD qui est une protéine du plasma de l'huître ayant un rôle d'opsonine (aide à la phagocytose), (ii) des bêta intégrines et (iii) la porine OmpU. La reconnaissance bactérie-hémocyte est possible par les bêta intégrines présentes au niveau de la membrane des hémocytes. La Cg-SOD va reconnaître la porine OmpU, présente au niveau de la bactérie, et la recouvrir pour faciliter son internalisation. Une fois internalisé dans l'hémocyte, *Vibrio tasmaniensis* LGP32, est en mesure d'inhiber la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) mais également la fusion phagosome-lysosome nécessaire à la destruction du microorganisme. Ainsi, la porine OmpU est un effecteur essentiel au sein des interactions *V. tasmaniensis* et *C. gigas*.

Par une étude par RNAseq, dans laquelle le transcriptome de LGP32 intracellulaire a été comparé à son transcriptome en extracellulaire, Vanhove et ses collaborateurs ont établi qu'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme, la réponse au stress et l'homéostasie des métaux sont fortement induits dans la condition intracellulaire (Vanhove et al. 2015). En approfondissant ces résultats, par l'analyse de mutants, le même groupe a montré que la perte du gène *copA* diminue significativement la virulence de LGP32 et donc le taux de mortalité lors de tests d'injection à des juvéniles d'huîtres. L'ensemble des études a permis de conclure que l'efflux de cuivre est nécessaire à l'activité cytotoxique de *V. tasmaniensis* LGP32 (Vanhove et al. 2016).

## ii. *Vibrio crassostreae*

*V. crassostreae* a été retrouvé associé aux épisodes de mortalité des jeunes huîtres (Lemire et al. 2014). Contrairement à *V. tasmaniensis*, les mécanismes de virulence de *V. crassostreae* sont moins bien caractérisés. Toutefois, deux déterminants génétiques ont été caractérisés comme étant impliqués dans les mécanismes de virulence. Le premier est un gène, le gène R-5.7 qui est nécessaire à la virulence de *V. crassostreae* (Lemire et al. 2014). Ce gène n'est cependant pas suffisant pour expliquer la virulence car son expression dans une souche avirulente, n'est pas suffisante pour la rendre pathogène. Le second est un plasmide pGV1512 qui code des facteurs de virulence. Il a été montré que ce plasmide ancestral est nécessaire à la virulence de *V. crassostreae* mais pas nécessaire à la colonisation de l'huître (Bruto et al. 2017; Bruto et al. 2018).

Alors que la cytotoxicité de *V. tasmaniensis* LGP32 dépend de la phagocytose, Rubio et ses collaborateurs ont rapporté que la cytotoxicité d'une souche de *V. crassostreae* (J2-9) ne dépend pas de la phagocytose mais de son contact avec les hémocytes. Ces résultats ont été confirmés sur 3 autres souches de *V. tasmaniensis* et de *V. crassostreae*, signifiant ainsi que les populations de *V. tasmaniensis* et de *V. crassostreae* utilisent des mécanismes de cytotoxicité différents lors de leur interaction avec les hémocytes (Thèse de Doctorat de Tristan Rubio, 2014-2017).

## iii. Coopération des vibrios

Les analyses en laboratoire ont permis de caractériser les mécanismes de virulence associés au vibrio du clade *Splendidus* grâce à des tests d'injection d'une seule souche bactérienne. Cependant, ces analyses ne tiennent pas compte de la complexité de l'infection dans l'environnement naturel. En effet, les huîtres peuvent être colonisées par un assemblage de vibrios pathogènes (Gay et al. 2004; Wendling et al. 2014) pouvant contribuer au mécanisme de virulence. Des infections expérimentales ont démontré que certaines souches de vibrios sont modérément virulentes lorsqu'elles sont injectées seules dans des animaux, mais que la virulence est augmentée dans le cadre d'infections expérimentales avec un mélange de souches (Gay et al. 2004). Une autre étude suggère que l'apparition de la maladie chez les juvéniles peut être



facilitée par la présence de souches non virulentes (Lemire et al. 2014). Par conséquent, bien que les souches non virulentes ne soient pas suffisantes pour l'expression de la pathogénèse, elles jouent certainement un rôle, direct ou indirect, dans les mécanismes de pathogénicité. Ces travaux montrent l'importance de suivre l'ensemble des communautés microbiennes symbiontes (pathogènes, opportunistes, commensaux et mutualistes) afin de comprendre leurs rôles respectifs lors du développement de la maladie des juvéniles d'huître.

Contrairement à la caractérisation des vibrios en atlantique, leur identification et leur mécanisme de virulence dans les épisodes de mortalité en méditerranée sont encore peu avancés. En effet, il a été détecté la présence de *Vibrio harveyi* au sein d'huîtres moribondes. Toutefois, cette espèce n'est pas systématiquement associée aux huîtres et sa présence semble dépendante de la période d'échantillonnage. Des travaux de recherche sont actuellement en cours au sein du laboratoire afin de caractériser le rôle des vibrios dans les mortalités de juvéniles en méditerranée. Des résultats obtenus sur le génotypage d'isolats pathogènes ont démontré que 38 % des souches induisent des mortalités supérieures ou égales à 75 %. Un séquençage barcoding hsp60 a révélé une grande proportion de *V. harveyi* et une très faible proportion de *V. crassostreae*.

### c. Implication conjointe d'OsHV-1 et des vibrios

Malgré les résultats accumulés cette dernière décennie, la quasi-totalité des études a analysé de manière indépendante soit l'implication du virus OsHV-1 (Segarra et al. 2016; Petton, Boudry, et al. 2015) soit les vibrios pathogènes (Lemire et al. 2014; Petton, Boudry, et al. 2015; Bruto et al. 2017), ou encore le microbiote (Lokmer & Wegner 2015a; Lokmer et al. 2016) ou la réponse de l'huître (Rosani et al. 2015; He et al. 2015) dans le processus infectieux.

A notre connaissance, deux études se sont intéressées à l'implication conjointe et à l'éventuelle synergie des vibrios et d'OsHV-1 dans le développement de la maladie. En effet, Petton et al. (2015) ont suivi la quantité de bactéries cultivables totales, de vibrios ainsi que la charge virale d'OsHV-1 suite à une exposition de juvéniles lors d'un épisode de mortalités dans l'environnement naturel. Dans le cadre de cette étude, les mortalités ont débuté le 5<sup>ème</sup> jour avec une augmentation importante jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour et une stabilisation à partir du 25<sup>ème</sup> jour. Le



pourcentage de mortalités à la fin du suivi (jour 55) s'élève à 36 %. La concentration de bactéries totales cultivables n'est pas significativement différente avant et après exposition en milieu naturel infectieux. Concernant la concentration des vibrios, elle augmente significativement suite à l'exposition des huîtres le 1<sup>er</sup> jour pour atteindre un maximum le 5<sup>ème</sup> jour. Après 15 jours d'exposition, la concentration de vibrios est stabilisée. Le virus a été détecté après 3 jours. Le 15<sup>ème</sup> jour OsHV-1 n'est plus détecté puis à nouveau détecté entre le 20<sup>ème</sup> jour et le 55<sup>ème</sup> jour avec une charge virale stabilisée. Aucune corrélation n'a été identifiée entre la concentration de vibrios et la charge virale. Les auteurs ont conclu que la présence du virus ne semble pas influencer la présence des vibrios lors d'un épisode de mortalités et vice versa. Par contre, les mortalités des huîtres sont corrélées avec la présence d'une plus importante charge virale. Cependant, dans le cadre d'une EMP (modèle de pathogénèse expérimentale) et en limitant la présence de bactéries par des traitements antibiotiques (sur les huîtres donneuses et receveuses), ces mêmes auteurs ont montré (1) qu'une forte charge virale n'était pas suffisante pour induire l'expression de la maladie et (2) que des vibrios seuls pouvaient induire des mortalités (Petton, Bruto, et al. 2015).

Compte tenu que les juvéniles étaient naturellement co-infectés par les vibrios et l'herpès virus, deux scénarios ont été proposés par les auteurs afin de comprendre le rôle de ces deux agents pathogènes sur les mortalités observées. Le 1<sup>er</sup> scénario serait que des huîtres infectées par OsHV-1 seraient plus sensibles à une seconde infection par des vibrios. Cependant l'absence de corrélation entre la concentration en virus et en vibrios ne permet pas de valider ce scénario. Le 2<sup>ème</sup> scénario serait que des huîtres infectées par des vibrios seraient davantage sensibles à la réplication du virus. Cependant, suite au traitement antibiotique les charges virales sont tout aussi importantes que sans traitement. Cette première étude sur la co-infection selon un modèle « écologiquement réaliste » n'a pas permis de comprendre la synergie potentielle entre OsHV-1 et vibrios.

Par ailleurs, cette étude n'intègre pas la notion d'holobionte alors que (Lokmer & Wegner 2015a) ont montré l'importance de la rupture de la structure des communautés bactériennes associée à l'hôte dans la maladie.

Dans une autre étude, de Lorgeril et ses collaborateurs ont démontré suite à une expérience sur le terrain que des huîtres sensibles aux épisodes de mortalités étaient incapables de mettre en place

une réponse immunitaire efficace entraînant ainsi une colonisation bactérienne dans les tissus. En effet, contrairement aux huîtres adultes résistantes (ayant survécu à un épisode de mortalité antérieur), les huîtres juvéniles sensibles (jamais exposées à des épisodes infectieux) sont mortes à plus de 90 % sur le terrain. Il a été mis en évidence par qPCR que les huîtres sensibles étaient fortement colonisées par le virus de l'herpès OsHV-1 ainsi que par les bactéries, dont les vibrios pathogènes des huîtres. Les auteurs ont également mis en évidence une surexpression des voies de signalisation immunitaire chez les huîtres sensibles, suggérant la mise en place d'une réponse immunitaire, suite à l'infection. Toutefois, les gènes de l'apoptose et les gènes impliqués dans l'immunité antimicrobienne étaient réprimés chez ces huîtres sensibles. Ainsi, l'absence de l'induction de certaines fonctions immunitaires est responsable de la colonisation bactérienne et de la mort des huîtres sensibles (de Lorgeril et al. 2018).

#### d. Implication du microbiote dans le syndrome de mortalité

En utilisant une approche de metabarcoding chez l'huître, Lokmer et Wegner (2015) ont montré que les communautés microbiennes sont stables dans le temps. Cependant, un changement dans l'environnement, tel qu'un stress thermique, peut perturber ces associations et entraîner le développement de bactéries opportunistes pathogènes (Lokmer & Wegner 2015b). En effet, ils ont évalué l'effet d'un stress thermique sur la diversité, la composition et la dynamique du microbiote de l'hémolymphe d'huîtres après infection par une souche de vibrio pathogène. Pour cela, les huîtres ont été laissées acclimatées à 22°C pour les huîtres provenant du sud et à 8°C pour celles du Nord ou stressées à la température opposée. Les 4 traitements thermiques suivants ont été utilisés : acclimaté au froid, acclimaté au chaud, stressé par le froid et stressé par le chaud. La moitié des huîtres dans chacun des quatre groupes a été injectée par une souche de vibrio pathogène (vibrio sp. D29w affilié au clade *Vibrio orientalis* / *tubiashi*.). Les auteurs ont observé que la mortalité des huîtres stressées à chaud était significativement plus élevée et que les mortalités se déclenchaient plus tôt au cours des 3 premiers jours de l'expérience par comparaison aux autres conditions. Par une analyse NMDS (Non Metric Multidimensional Scaling), ces auteurs ont montré que les huîtres moribondes (M) et mortes (D) avaient des microbiotes différents des huîtres saines. Les communautés M et D se caractérisaient par une faible diversité bactérienne et la prolifération d'un petit nombre d'OTUs. De plus, à 8°C, les

microbiotes des huîtres mortes ressemblaient à ceux des moribonds. En revanche, à 22°C, les auteurs ont observé une augmentation de la composition des communautés bactériennes et le développement de bactéries anaérobies. Enfin, les microbiotes des huîtres moribondes étaient dominés par le genre *Arcobacter* et non par le genre *Vibrio*. D'autres genres contenant des espèces pathogènes potentielles ont été retrouvés chez les huîtres infectées, tels que *Photobacterium* et *Shewanella*.

Lokmer et ses collaborateurs ont cherché à étudier quel était l'effet d'une transplantation dans un nouvel environnement sur le microbiote de différents tissus de l'huître (Lokmer, Goedknecht, et al. 2016). Pour cela, ils ont transplanté les huîtres du sud de la mer des Wadden (Allemagne) au nord et administré un traitement antibiotique à la moitié des huîtres. Ils ont ensuite analysé la composition du microbiote de l'hémolymphe, du manteau, des branchies et du microbiote intestinal dans des huîtres locales et transplantées. Ils ont observé une mortalité élevée uniquement chez les huîtres transplantées et non traitées aux antibiotiques, avec des titres élevés de vibrios dans les tissus (manteau, branchies et microbiote intestinal) signifiant une infection bactérienne dans ces tissus.

De plus, les communautés bactériennes de l'hémolymphe étaient différentes du reste des tissus avec une plus grande abondance relative des  $\epsilon$ -protéobactéries (*Arcobacter*), Flavobacteria, Fusobacteria (*Psychrilyobacter*) et  $\gamma$ -Protéobactéries (*Oceanospirillaceae*, *Vibrionaceae*) et moins de Spirochaetes. Parmi les tissus, une différence dans l'abondance des Mollicutes (*Mycoplasma*) a été observée dans l'intestin alors que les microbiotes du manteau et des branchies étaient semblables. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la déstabilisation des communautés bactériennes chez les huîtres transférées non traitées pourrait être due aux interactions entre le microbiote résident et externe. Plus précisément, le développement des vibrios dans les tissus des huîtres pourrait dépendre de la stabilité du microbiote de l'hémolymphe en réponse à un nouvel environnement microbien.

Dans une autre étude de transplantation, le microbiote de 5 familles biparentales d'huîtres aux phénotypes sensibles ou résistants a été analysé (Clerissi et al., 2018, submitted). Par une approche de metabarcoding 16S, la composition des communautés microbiennes de ces 5 familles a été étudiée en condition contrôlée et après transplantation pendant des épisodes de mortalité (avec présence d'OsHV-1) ou hors épisodes de mortalité en atlantique et en

méditerranée. Il a été mis en évidence des différences significatives entre le microbiote des familles sensibles et résistantes en atlantique. Chez les huîtres résistantes, il a été observé une plus grande variabilité des communautés bactériennes à l'échelle des OTUs et une plus grande stabilité à l'échelle des genres et des classes que chez les huîtres sensibles. De plus, en période de mortalité, l'abondance relative des cyanobactéries était en augmentation chez les familles résistantes. Ces dernières présentaient une plus grande stabilité des ordres Rhodospiralles et Rhodobacterales, ainsi que des familles d'Erythrobacteraceae et Flavobacteriaceae. En revanche aucune différence significative entre le microbiote des huîtres sensibles et des huîtres résistantes n'a pu être observée en méditerranée pour ces mêmes familles. Il est possible que le développement de la maladie soit plus avancé en atlantique au moment de l'échantillonnage qu'en méditerranée, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence significative dans les communautés microbiennes entre les huîtres sensibles et résistantes en méditerranée. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication dont je suis co-auteur, elle est présentée en annexe.

L'ensemble de ces études souligne l'importance d'analyser le microbiote des huîtres en prenant en compte si possible des analyses spécifiques pour chaque tissu de l'huître afin de comprendre comment le microbiote affecte son hôte. Dans ces études, les communautés bactériennes sont analysées comme la conséquence d'un stress et nous ignorons si les changements observés dans le microbiote sont la cause ou la conséquence des mortalités observées.

## 2. Facteurs abiotiques associés aux mortalités de *C. gigas* et potentiellement impliqués dans la pathogénèse

Dans cette partie nous allons discuter du rôle des facteurs abiotiques dans les mortalités de *C. gigas*. Nous l'avons vu précédemment, différentes maladies ont touché *C. gigas*. Les adultes en période de gamétogénèse ont été atteints jusqu'en 2008, d'une maladie appelée le syndrome des « mortalités estivales ». Les mortalités se sont fortement intensifiées chez les juvéniles après 2008 et ont été rapportées sous le nom « d'épisodes de surmortalité ». Enfin, les adultes ont également été touchés par la maladie bactérienne à *V. aestuarianus*. Ainsi, comme précédemment, nous discuterons principalement des facteurs abiotiques associés aux mortalités

des juvéniles d'huîtres. Toutefois, lorsque nous discuterons des facteurs associés à d'autres maladies cela sera spécifié.

#### a. La température

Les études entreprises dans le cadre des mortalités qui ont sévi avant 2008 ont permis de démontrer qu'une température de 19°C est nécessaire pour déclencher les mortalités d'huîtres. En effet, 3 sites ostréicoles de la façade atlantique ont été suivis durant 5 ans et pour chaque site le déclenchement des mortalités s'observait pour une température de 19°C. Toutefois, en 2005, aucune mortalité n'a été observée sur un des 3 sites, signifiant que la température seule ne conduit pas forcément au déclenchement des mortalités. Aussi, il a été démontré que la température moyenne et la température maximale ne constituaient pas des facteurs nécessaires et suffisants pour déclencher les mortalités (Samain & Mc Combie 2008).

Après 2008, lors de l'augmentation des mortalités des juvéniles d'huîtres, il a été mis en évidence que la température constitue le facteur déclencheur des mortalités. En effet, les mortalités ont été observées sur l'ensemble des zones de production des côtes françaises dès que le seuil de 16°C était atteint (Pernet et al. 2012; Dégremont et al. 2013; Pernet et al. 2014; Tristan Renault et al. 2014; Petton et al. 2015). Sur la côte méditerranéenne (étang de Thau), les mortalités ont commencé début mai jusqu'à fin septembre, avec une interruption en juillet et en août lorsque la température de l'eau de mer dépassait le seuil de 24°C (Pernet et al. 2012). De plus Petton et ses collaborateurs ont démontré de façon expérimentale que la transmission du virus est réalisée entre 16°C et 22°C. En revanche aucune transmission virale n'a lieu à 13°C (Petton et al. 2013). De même, Pernet et ses collaborateurs ont démontré que le virus persiste dans les huîtres à basse température (10°C et 13°C) et qu'il est réactivé lors d'une augmentation de la température à 21°C (Pernet et al. 2015). Enfin, en injection virale, il a été mis en évidence une augmentation des mortalités d'huîtres en lien avec une augmentation de la température (de Kantzow et al. 2016). Néanmoins, les mécanismes moléculaires de l'huître et / ou des pathogènes responsables de ces différences de survie en fonction de la température restent à être identifiés.

## b. La pluviométrie et la salinité

Le risque lié à la pluviométrie concerne les apports d'eau douce et les contaminants associés. En effet, les zones d'activités ostréicoles situées au niveau des estuaires ou des baies sont soumises à des contaminants provenant des activités agricoles, domestiques et industrielles (Menesguen 1992). Ces zones requièrent un équilibre particulier, en effet, un apport excessif en nutriments peut provoquer un risque d'eutrophisation et le développement d'efflorescence d'algues toxiques (Guillaud 1992). A l'inverse, un déficit en nutriment est un facteur nuisant à la productivité du site. Outre ce risque lié à l'eutrophisation, il est possible d'analyser le risque d'apport d'eau douce en suivant l'intensité des précipitations, le débit des rivières et la salinité. Des analyses corrélatives entre les mortalités des huîtres d'avant 2008 et chacun de ces 3 paramètres ont été effectuées et les conclusions sont variables en fonction des sites d'études et de l'âge des huîtres. Par exemple, la corrélation entre l'intensité des précipitations et les mortalités ont été significatives uniquement en baie des Veys (Normandie) et pour des huîtres âgées de 2 ans mais pas pour les juvéniles (Samain & Helen 2007). Il a été mis en évidence que La survie des huîtres exposées à OsHV-1 et acclimatées à une salinité de 10 ‰ était supérieure à 95 %, contre seulement 43 % et 73 % de survie chez les huîtres acclimatées à des salinités plus élevées (Fuhrmann et al. 2016). Comme pour l'effet de la température, les bases moléculaires de ces variations de mortalité en fonction de la salinité n'ont pas encore été caractérisées.

## 3. Facteurs de l'hôte

### a. Le statut reproducteur

Dans le cadre des mortalités qui ont sévi avant 2008, les recherches ont permis de démontrer qu'un état reproducteur (gamétogénèse et ponte) provoquait un affaiblissement énergétique contribuant aux épisodes de mortalités. Quatre paramètres ont été suivis : (i) le métabolisme général, (ii) l'activité de nutrition, (ii) les réserves énergétiques et (iv) l'évolution des paramètres hématocytaires. Toutefois, au cours de certaines années, peu de mortalités ont été enregistrées malgré une température de 19°C et un état de reproduction dans certaines zones, signifiant que d'autres facteurs sont susceptibles d'interagir ensemble pour aboutir à des phénomènes de mortalité (Samain & Mc Combie 2008).

## b. Les déterminismes génétiques et les déterminants génomiques de la résistance

Pour faire face aux pertes que subissent les ostréiculteurs, des études basées sur la sélection génétique associée à la résistance ont été entreprises. Des travaux réalisés par Degremont et ses collaborateurs ont permis de démontrer que la reproduction d'huîtres, sur 4 générations, ayant passé des épisodes de mortalité permet d'améliorer les taux de survie de la descendance en comparaison d'huîtres n'ayant pas passé ces 4 filtres de sélection (Degremont et al. 2015). Un travail complémentaire combinant le virus et les bactéries a permis de mettre en évidence que la sélection génétique améliore la résistance à OsHV-1 sans pour autant jouer sur la résistance à un autre pathogène de l'huître, *V. aestuarianus* (Azéma et al. 2017). De plus, ces mêmes auteurs ont observé que la sensibilité à l'infection par *V. aestuarianus* était faible au stade naissain et augmentait avec les stades de vie ultérieurs. En revanche la résistance à l'infection par OsHV-1 était forte et maintenue au cours des stades de la vie de l'huître.

Dans une autre étude, les auteurs ont tenté d'identifier des régions génomiques associées à la résistance (Gutierrez et al. 2018). Pour cela, 1000 huîtres ont été confrontées en balnéation à une forme virulente d'OsHV-1, isolé d'un épisode de mortalité. Les huîtres survivantes ont été génotypées et la charge virale quantifiée. Les analyses de génotypage ont permis d'identifier un QTL (quantitative trait loci) important affectant la résistance de l'hôte. L'ensemble de ces résultats suggère une base génétique solide pour la survie des huîtres. Cependant, actuellement la sélection de masse basée sur la résistance à OsHV-1 sur le terrain constitue la seule méthode pour limiter les pertes ostréicoles. Ainsi des efforts de recherches sont nécessaires pour identifier les gènes associés à la résistance des huîtres et développer éventuellement des approches de sélection assistées par marqueurs. En effet, même si des identifications de zones génomiques ont été mises en évidence. Actuellement, il y a peu de données sur la relation entre la fonction des gènes de ces zones et la survie des huîtres (Gutierrez et al. 2018; Sauvage et al. 2010).

## c. L'histoire de vie

L'histoire de vie de l'huître peut se définir par sa rencontre et son interaction avec des agents pathogènes précédemment rencontrés durant sa vie. En effet, il est actuellement difficile d'estimer l'âge d'une huître et donc d'évaluer le nombre approximatif d'épisodes de mortalité

qu'elle a subi. Toutefois, on peut supposer qu'au cours de sa vie l'huître est en perpétuelle interaction avec les microorganismes de son environnement. Par conséquent certaines, ayant eu des interactions avec un type de microorganisme, peuvent lors d'une future rencontre avec des agents infectieux développer une résistance, lui permettant de survivre à cette perturbation. Cette notion rejoint les notions de priming immunitaire qui seront développées dans le chapitre D/2.

De même, des membres de notre laboratoire ont entrepris des études afin d'évaluer l'impact d'une exposition des larves d'huîtres à une microflore environnementale sur les taux de survie des générations futures (thèse de M. Fallet). Il a été démontré par une expérience d'infection écologiquement réaliste, une amélioration des taux de survie chez des huîtres issues de deux familles biparentales aux phénotypes sensibles (F11) et intermédiaires (F32). L'amélioration du taux de survie sur le terrain à la génération F1 a été de 3,2 % pour les huîtres issues de la famille F11 et de 2,4 % pour les huîtres issues de la famille F32. Cette amélioration est maintenue jusqu'à la génération F3, avec une amélioration de 2,99 % pour les huîtres issues de la famille sensible et de 6,72 % pour les huîtres de la famille intermédiaire. Les bases moléculaires de ce mécanisme sont en cours d'étude.

L'ensemble de ces éléments suggère que les interactions passées de l'huître avec son environnement ont un impact sur les mécanismes de survie à un épisode infectieux. L'évaluation de l'intervention potentielle de mécanismes épigénétiques est en cours dans le cadre de cette thèse.

#### 4. Les pratiques culturelles

Des suivis des mortalités d'huîtres ont été entrepris au sein et en dehors des zones ostréicoles afin d'évaluer si les pressions d'élevage avaient un impact sur les mortalités d'huîtres. Aucune mortalité n'a été observée pour les huîtres maintenues en pleine mer et OsHV-1 n'était détecté qu'occasionnellement à des charges virales basses. En revanche, des mortalités ont été observées au sein des parcs ostréicoles. De plus, les mortalités des huîtres maintenues dans l'étang de Thau mais à l'extérieur de la zone ostréicole étaient sporadiques et elles coïncidaient avec les courants provenant de la zone ostréicole dans laquelle de nombreux épisodes de mortalité ont pu être observés (Pernet et al. 2012).



Pernet et ses collaborateurs ont également mis en évidence qu'élever des huîtres avec des moules semble diminuer le développement de maladies chez les huîtres (Pernet et al. 2014).

## 5. Les polluants chimiques et biologiques

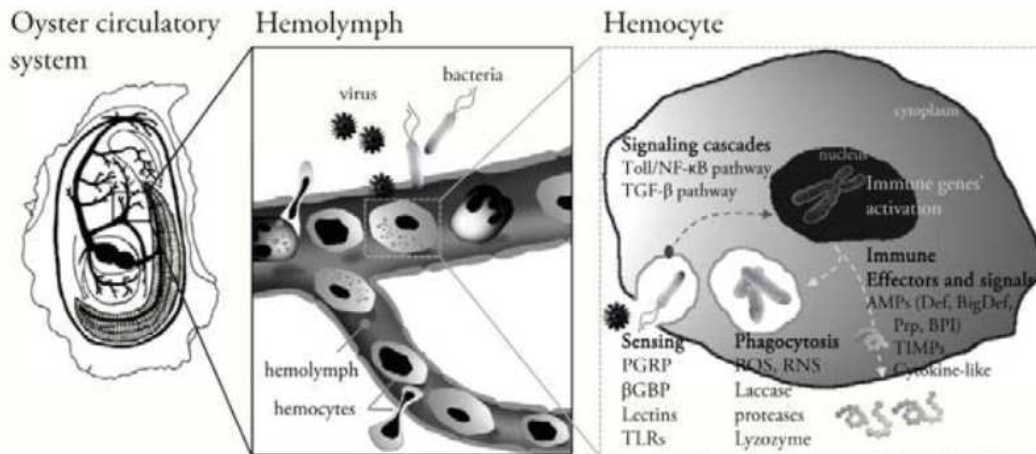
Au vu du nombre croissant d'efflorescences algales ces dernières années, des membres du laboratoire ont entrepris des études pour évaluer le rôle de ces efflorescences dans le syndrome de mortalité des juvéniles d'huître. Ils ont étudié l'effet de l'algue toxique *Alexandrium catenella* sur la survie des huîtres après exposition à *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Ils ont pu mettre en évidence une augmentation des mortalités de 53 % en comparaison à la condition contrôle (exposition à une algue non toxique) dans laquelle aucune mortalité n'a été enregistrée. En approfondissant ces interactions algues-bactéries-huîtres, les auteurs ont démontré que *A. catenella* est capable d'induire l'apoptose des hémocytes par libération d'une toxine (Abi-Khalil et al. 2017; Abi-Khalil et al. 2016).

## D. Réponse immunitaire de *C. gigas*

### 1. Les données de génomique et l'immunité innée

Le génome de l'huître *C. gigas* a été récemment séquencé (637 Mb, 10 chromosomes) (Zhang et al. 2012) et de nombreuses bases de données de transcriptomique sont disponibles. Les analyses montrent que le génome de l'huître est très polymorphe et complexe, ce qui pourrait être la clé de la résilience de l'animal (Guo et al. 2015). Le polymorphisme de séquence élevé ainsi que le polymorphisme d'expression (Rosa et al. 2012) indiquent une importante diversité génétique qui est un matériel sur lequel la sélection naturelle peut s'appuyer pour permettre les adaptations aux environnements difficiles, variables et sélectifs. Le génome de l'huître possède aussi un grand répertoire de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse immunitaire et dans la réponse au stress (Zhang et al. 2012; Zhang et al. 2015). Par ailleurs, la grande diversité des récepteurs et effecteurs immunitaires procure à l'animal une spécificité accrue dans la reconnaissance et la réponse immunitaire. L'ensemble de ces données montrent que l'huître possède un système immunitaire complexe comportant des effecteurs fortement polymorphes et/ou spécifiques aux huîtres (Guo et al. 2015).

L'huître possède un système circulatoire semi ouvert dans lequel circule l'hémolymphe. L'hémolymphe contient les hémocytes, qui sont les principaux médiateurs cellulaires du système de défense des bivalves (**Figure 10**) (Schmitt et al. 2012). Les hémocytes peuvent être à la fois circulants et migrer dans les différents organes de l'huître.



**Figure 10 : Le rôle des hémocytes dans les mécanismes de défense chez l'huître *C. gigas*.**

L'huître possède un système circulatoire semi ouvert dans lequel circule l'hémolymphe. L'hémolymphe contient les hémocytes, qui sont les principaux médiateurs cellulaires du système de défense des bivalves. En effet, lors de la reconnaissance du non soi, les hémocytes sont capables de répondre à la présence d'agents pathogènes en activant une série de réactions immunitaires allant de la phagocytose (avec la production par exemple d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de l'azote (RNS) et de protéases) à l'activation des voies de signalisation telles que la voie NF- $\kappa$ B et la production d'effecteurs et de signaux immunitaires tels que les peptides antimicrobiens, les inhibiteurs de protéase, des analogues aux cytokines).

Figure extraite d'après Schmitt et al., 2012.

#### a. Les molécules de reconnaissance du non soi

Comme pour tous les invertébrés, les mécanismes de défense de l'huître reposent sur un système immunitaire inné. Il est basé sur la présence de protéines solubles de l'huître (PRPs : pattern recognition proteins) et de récepteurs associés aux membranes cellulaires (PRRs : pattern recognition receptors). Ces derniers peuvent reconnaître des motifs moléculaires caractéristiques des microorganismes (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns) et activer les mécanismes de défense (Guo et al. 2015). Les microorganismes peuvent présenter différents

motifs tels que le peptidoglycane, les acides lipotechoïques des bactéries à Gram positif ou les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif. Chez les virus, ce sera essentiellement, des acides nucléiques de type ADN ou ARN ainsi que des glycoprotéines virales (Mogensen 2009).

Un certain nombre de récepteurs associés aux membranes cellulaires ont été identifiés chez *C. gigas*. Les récepteurs Toll (TLRs) (Toll-like receptors) sont les mieux caractérisés avec l'identification de 6 TLR (CgToll-1, CgTLR1, CgTLR2, CgTLR3, CgTLR4, CgTLR6) et un total de 83 gènes de TLR codés par le génome de *C. gigas* (Zhang et al. 2013; Zhang et al. 2011a; Wang et al. 2016). Ces TLRs ont été localisés au niveau de la membrane et de l'endosome. Des travaux ont permis de mettre évidence l'induction de 19 transcrits codant des TLRs suite à l'infection par des vibrios ou par OsHV-1 (Zhang et al. 2015).

Les intégrines ont été identifiées comme récepteur important dans le processus de phagocytose chez l'huître (Terahara et al. 2006). Par exemple, il a été mis en évidence que la phagocytose de *Vibrio tasmaniensis* LGP32, par les hémocytes requiert 3 protéines dont une  $\beta$  intégrine (Duperthuy et al. 2010).

Les membres de la famille des C1q sont associés à la voie du complément chez les vertébrés. Chez l'huître 321 gènes codant les protéines contenant un domaine C1q ont été identifiés. Il a été mis en évidence que les protéines contenant un domaine C1q ont un rôle d'opsonine en favorisant la phagocytose de *Vibrio splendidus* (He et al. 2011; Jia et al. 2015).

Enfin, les RLR (Rig-like receptors) constituent des senseurs contre les virus. Zhang et ses collaborateurs ont identifié que le génome de l'huître code pour 12 RLRs (Zhang et al. 2015), avec l'identification d'un RLR, CgRIGI dont l'expression est augmentée suite à l'injection d'un ARN synthétique virale (poly(I:C)).

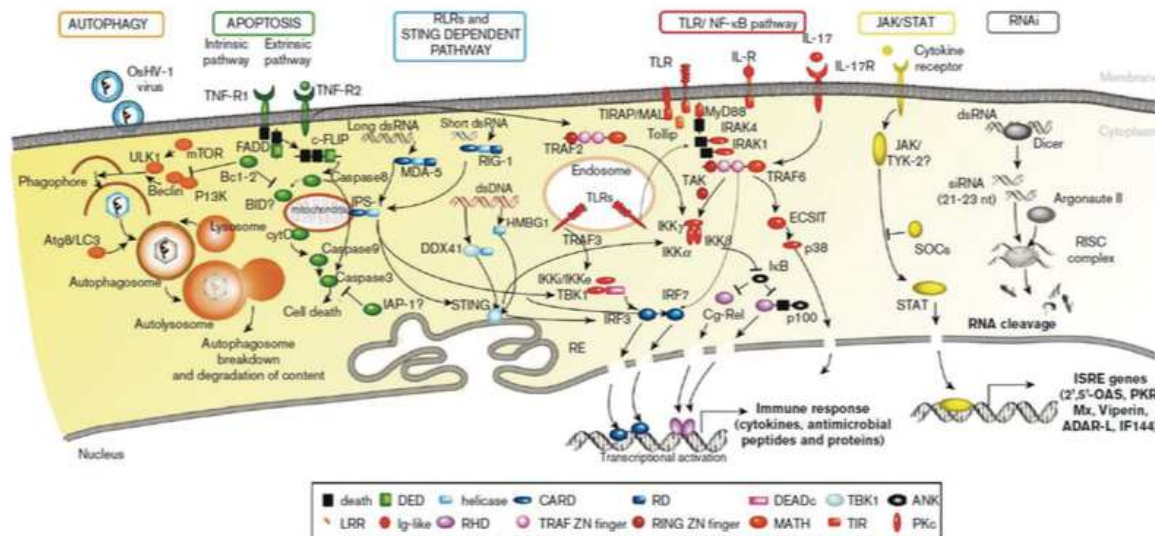
#### b. Les voies de signalisation cellulaire et les mécanismes associés

Les voies de signalisation cellulaire sont activées à la suite de la reconnaissance des éléments du non soi. Cette reconnaissance va permettre l'activation d'une réponse immunitaire adéquate qui permettra *in fine* le maintien de l'homéostasie. Des voies de signalisations associées à la réponse antivirale ont été identifiées chez l'huître grâce à la comparaison des séquences avec celles des vertébrés (Zhang et al. 2012; Green et al. 2015). La comparaison des séquences a permis d'identifier un système de type interféron comparable à celui des vertébrés (**Figure 11**), (Green

et al. 2015). Chez les vertébrés, le système d'interféron est essentiel pour la résistance aux infections virales (Randall & Goodbourn 2008). La reconnaissance des acides nucléiques viraux (ARN db par exemple) par les cellules des vertébrées produit des interférons (Randall & Goodbourn 2008). La reconnaissance du récepteur avec les composants viraux active la transduction du signal *via* la voie Jak/STAT, conduisant à la transcription de certains gènes stimulés par l'interféron (ISG) (Darnell et al. 1994). Les produits de ces ISG exercent de nombreuses fonctions effectrices antivirales. Chez l'huître des Toll-like receptors (TLR), des récepteurs RIG-like (RLR) et des facteurs de régulation de l'interféron (IRF) ont été identifiés dans le génome. Green et Montagnani ont mis en évidence que plusieurs gènes associés à la réponse antivirale sont induits après injection d'un analogue synthétique d'ARN viral (poly I :C) (Green & Montagnani 2013).

De même, des voies de signalisation associées à l'immunité antibactérienne ont été identifiées chez *C. gigas* dont la voie NF- $\kappa$ B. Le séquençage du génome de *C. gigas* a permis d'identifier que le génome code 20 éléments de cette voie (Zhang et al. 2012) dont un homologue du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (CgREL/ NF- $\kappa$ B) et deux inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (CgI $\kappa$ B1, CgI $\kappa$ B2). De plus, un certain nombre de protéines dont MyD88, TRAF et ECSIT a été identifié dans le génome de *C. gigas* (Montagnani et al. 2008; Montagnani et al. 2004; Escoubas et al. 1999; Zhang et al. 2011a).

Des voies associées aux mécanismes apoptotiques, tels que l'autophagie et l'apoptose ont également été identifiés chez *C. gigas* (Green et al. 2015), avec l'identification d'inhibiteurs d'apoptose et de caspases (Zhang et al. 2011b; Qu et al. 2015).



**Figure 11: Voies de signalisation immunitaires antivirales conservées chez *C. gigas*.**

Comme décrit précédemment, cette figure a été construite à partir de l'identification de séquences conservées identifiées dans le génome de *C. gigas* (Zhang et al., 2012). D'après Green et Montagnani 2015.

La phagocytose constitue un autre mécanisme immunitaire à médiation cellulaire. Ce mécanisme a été décrit chez l'huître *C. gigas* suite à l'observation d'une production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) après la phagocytose par les hémocytes de particules de zymosan (Bachère et al. 1991). La phagocytose est initiée afin de permettre l'élimination d'éléments étrangers de taille réduite telles que des bactéries, des virus ou encore des parasites protozoaires. Elle se déroule en plusieurs étapes : la reconnaissance des particules étrangères, l'adhésion et l'ingestion qui entraîne la formation du phagosome et l'acidification du milieu intra-vacuolaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNS), l'accumulation de métaux et l'apport d'activités enzymatiques et antimicrobiennes, après fusion avec le lysosome. L'ensemble de ces étapes aboutira à la dégradation du matériel ingéré. Des travaux réalisés sur les interactions hémocytes-bactéries ont permis de montrer que la phagocytose est un mécanisme clef dans l'immunité de l'huître *C. gigas*. En effet, il a été démontré que *Vibrio tasmaniensis* est capable d'échapper à la phagocytose et donc à la réponse immunitaire engendrée par les hémocytes de l'huître grâce à la porine OmpU présente au niveau de sa membrane (Duperthuy et al. 2010; Duperthuy et al. 2011).

D'autres mécanismes d'une grande diversité permettent à l'huître de faire face aux agressions de son milieu. Parmi eux nous discuterons du rôle des peptides antimicrobiens, des protéines plasmatiques SODs et des espèces réactives de l'oxygène.

#### c. Les peptides antimicrobiens (AMPs)

Les AMPs sont des effecteurs de la réponse immunitaire avec une action microbicide ou bactériostatique. Le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens repose sur l'interaction entre leur charge électropositive (peptides cationiques) et les membranes des bactéries chargées négativement. Suite à cette interaction, plusieurs mécanismes ont été identifiés (Bulet et al. 2004; Brogden 2005) ; Par exemple, ils peuvent provoquer la lyse de la cellule bactérienne par la formation de pores au niveau de la membrane plasmique (Brogden 2005) ou empêcher la synthèse des composants de la paroi bactérienne (Bulet et al. 2004).

Chez l'huître, 5 familles de peptides antimicrobiens ont été caractérisées. Il s'agit des Défensines (Cg-Defm ; Cg-Defh1 ; Cg-Defh2), des Big-défensines (Cg-BigDef1, 2 et 3), des Peptides riche en proline (Cg-Prp) et des Bactericidal/permeability increasing protein (Cg-BPI). Il a été démontré que le profil d'expression des peptides antimicrobiens chez l'huître était différent en fonction des tissus suite à une infection à *Vibrio splendidus* LGP32 (Schmitt et al. 2012). En effet, alors que les défensines d'huîtres étaient exprimées de manière constitutive dans le manteau (CgDefm) ou les hémocytes (Cg-Defhs), la Cg-BPI était exprimée de façon inductible dans les hémocytes et la Cg-Prp sous exprimée (Schmitt et al. 2012).

#### d. Les protéines plasmatiques

Les protéines plasmatiques SODs (Superoxydes dismutases extracellulaires) ont un rôle d'antioxydant chez l'huître. A l'inverse des espèces réactives de l'oxygène (ROS), elles n'engendrent pas de dommages oxydatifs chez l'hôte (Cutler 1991). Il a été démontré, dans le cadre d'infections chez l'huître, que cette protéine aide à la réponse antibactérienne contre *Vibrio tasmaniensis* LGP32 en ayant un rôle d'opsonine. En effet, la reconnaissance bactérie-hémocyte est possible par les bêta intégrines présentes au niveau de la membrane des hémocytes. La Cg-SOD va reconnaître la porine OmpU, présente au niveau de la bactérie, et la recouvrir pour faciliter son internalisation (Duperthuy et al. 2011).



#### e. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules oxygénées telles que les radicaux libres, les ions oxygénés et les peroxydes. Leurs mécanismes d'action reposent sur l'oxydation des protéines microbiennes et la destruction des chaînes respiratoires des microorganismes (Kohen & Nyska 2002). Chez l'homme, le complexe de la NADPH oxydase présente une activité enzymatique dans la production de ROS. Ce complexe catalyse la réaction d'oxydation du NADPH cytosolique par le dioxygène  $O_2$ , conduisant en la production du  $NADP^+$  et des ions superoxydes ( $O_2^-$ ). Ces derniers sont des espèces radicalaires hautement réactives et toxiques qui vont s'accumuler dans le lumen du phagosome. Une superoxyde dismutase (SOD) phagosomale permet ensuite la synthèse de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à partir de l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) et de protons  $H^+$ . Il a été démontré que les hémocytes de l'huître ont la capacité de produire des ROS lors d'une réponse immunitaire (Donaghy et al. 2012). En effet, des études ont mis en évidence la présence d'un burst oxydatif par les hémocytes suite à la phagocytose (Bachère et al. 1990; Lambert et al. 2003; Delaporte 2003). Ce burst oxydatif implique une NADPH oxydase avec la production de l'ion  $O_2^-$  et de la superoxydes dismutase (SOD) qui convertissent l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Donaghy et al. 2012). Enfin, des myéloperoxydases (MPO) permettent de détoxifier les cellules en convertissant le  $H_2O_2$  en acide hypochlorique (HOCl) en présence d'ions chlorures.

#### 2. Une potentielle « réponse adaptative » mise en évidence chez *C. gigas* et le priming immunitaire antiviral

L'absence de cellules lymphocytaires et d'immunoglobulines chez les bivalves suggère que ces derniers sont dépourvus d'une réponse immunitaire adaptative comme celle identifiée chez les vertébrés (Boehm & Swann 2014). Toutefois, de récentes recherches menées sur *C. gigas* par différents laboratoires, suggèrent l'existence d'une réponse immunitaire mémoire (Green & Montagnani 2013; Green et al. 2016; Green & Speck 2018). En effet, des études *in vivo* ont été réalisées et ont permis de mettre en évidence que des juvéniles préalablement stimulés par le poly(I:C) (analogue synthétique d'ARN double brin viral) puis infectés par OsHV-1 $\mu$ Var présentaient une charge virale réduite de 82 % par rapport aux juvéniles contrôles non stimulés par le poly(I:C) (Green & Montagnani 2013). En revanche, une stimulation par des *Vibrio*

*tasmaniensis* LGP32 tués ne réduisait pas la charge virale suite à l'infection par OsHV-1. Cette capacité à pouvoir répondre positivement à une infection suite à une primo-stimulation est appelée le priming immunitaire.

Des études approfondies sur le priming immunitaire antiviral chez *C. gigas* ont été entreprises afin d'en caractériser la phénoménologie et de comprendre les bases moléculaires sous-jacentes à cette nouvelle vision de l'immunité (Lafont et al., 2017 ; Lafont et al., in prep). Il a été démontré plusieurs points :

- (i) Une stimulation de différents acides nucléiques dont le poly(I:C), 24h avant une infection par OsHV-1 $\mu$ Var, permet une réduction de la charge virale en comparaison d'huîtres non stimulées. En effet, les taux de survie après stimulation par du poly(I:C) oscillaient entre 78 % et 100 % de survie contre 20 % de survie chez les huîtres contrôles injectées avec de l'eau de mer stérile.
- (ii) La protection par le poly(I:C) est spécifique puisqu'elle ne fonctionne pas lors d'une infection bactérienne par *Vibrio tasmaniensis* LGP32. A noter cependant qu'une seule souche de *V. tasmaniensis* a été testée. Il sera nécessaire d'étudier l'effet d'autres souches de *V. tasmaniensis* sur la protection par le poly(I:C).
- (iii) La protection par le poly(I:C) est efficace en milieu naturel. Le taux de survie a été amélioré de 62 % en moyenne lorsque des huîtres ont été déployées pendant un épisode de mortalité et après une stimulation par le poly(I:C).
- (iv) La durée de protection a été établie à 5 mois minimum. En effet, des huîtres ont été protégées 5 mois après l'injection de poly(I:C) et ceci en milieu naturel.
- (v) Les mécanismes moléculaires du priming immunitaire antiviral chez *C. gigas* ont été caractérisés par une approche transcriptomique RNAseq (Lafont et al., in prep). Il a été mis en évidence une forte induction chez les huîtres stimulées de gènes de l'immunité antivirale en comparaison des huîtres non stimulées. Parmi ces gènes, la majorité présentait un profil d'expression de type maintenu (« sustained »), c'est-à-dire qu'ils étaient surexprimés suite à l'injection et maintenus jusqu'à la fin de la cinétique d'infection. Ces résultats sont soutenus par une autre étude ayant montré la mise en place d'une réponse antivirale suite à une primo-stimulation avec une



molécule d'ARNdb au niveau du muscle adducteur. La réponse se caractérisait par l'induction de récepteurs de reconnaissance virale (TLR et MDA5), des gènes de la signalisation antivirale tels que (IRF et SOC-1) et des effecteurs antiviraux (PKR et vipérine) dans les branchies et le manteau des huîtres (Green et al. 2014).

L'ensemble de ces résultats démontrent la mise en place d'une mémoire immunitaire chez des huîtres préalablement stimulées et que cette stimulation est efficace sur du long terme.

### 3. Un priming immunitaire antibactérien

Par ailleurs, la notion de priming antibactérien a été étudiée dans différentes études chez *C. gigas*. Il a été démontré par les membres de notre laboratoire que la stimulation d'huîtres par des bactéries virulentes tuées permettait de ralentir l'infection par *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (travaux de C. Montagnani, non publiés). En effet, au cours d'une cinétique d'infection établie sur 15 jours, il a été mis en évidence que lors des 4 premiers jours d'infection par *Vibrio tasmaniensis* LGP32, les huîtres stimulées par les bactéries tuées présentaient un taux de survie amélioré de 20 % en comparaison des huîtres non stimulées. En revanche, cette protection n'est pas maintenue après les 4 premiers jours car au 15<sup>ième</sup> jour le taux de survie entre huîtres stimulées et huîtres non stimulées est identique. De plus, ils ont mis en évidence qu'une stimulation avec des bactéries *Vibrio tasmaniensis* LGP32 tuées à la chaleur augmente les mortalités de 53.3 %, 15 jours après l'infection par OsHV-1  $\mu$ Var. Cette observation peut suggérer un mécanisme de compromis immunitaire entre réponse antibactérienne et réponse antivirale. Ainsi une stimulation par des bactéries atténuées empêcherait l'huître de répondre efficacement à une infection par le virus étant donné la mise en place de la réponse antibactérienne. Des études complémentaires sur le priming antibactérien sont en cours afin de valider ces premiers résultats et de caractériser plus précisément les bases moléculaires qui soutiennent ces observations.

Dans une autre étude, Li et ses collaborateurs ont étudié la réponse immunitaire et le processus d'hématopoïèse dans les branchies de *C. gigas* chez des huîtres stimulées par *V. splendidus* tué, avant infection par cette même bactérie (Li et al. 2017). Ils ont ainsi mis en évidence que les huîtres préalablement stimulées par la bactérie mettaient en place une réponse immunitaire plus forte, caractérisée par une augmentation des taux d'expression de CgClec-4 et de CgIFN dans les

branchies par rapport aux huîtres pré-stimulées avec de l'eau de mer stérile. L'hématopoïèse était également plus intense avec une augmentation des niveaux d'expression protéique du facteur de transcription hématopoïétique CgGATA3 et de la protéine liée à l'immunité CgEcSOD. De même, la production de ROS a été augmentée à 6h et 24h post infection (Li et al. 2017).

Dans une même expérience de challenge avec *V. splendidus*, Zhang et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation du nombre total d'hémocytes et une augmentation du taux de phagocytose par les hémocytes (Zhang et al. 2014). Néanmoins, il reste à définir la protection à plus long terme de ce type de stimulation.

## Objectifs de la thèse

De nombreux efforts de recherche ont été entrepris et ont permis d'avancer dans la compréhension du syndrome affectant les juvéniles d'huîtres en France. Cependant, à ce jour, ce syndrome n'est toujours pas caractérisé notamment parce que les différents acteurs de la maladie n'ont jamais été étudiés dans un même cadre expérimental. Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse vise à la compréhension du mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres par une approche holistique et en intégrant le paramètre diversité de la maladie (différents génotypes huîtres avec analyse du microbiote en incluant les agents pathogènes, dans deux environnements infectieux).

Pour atteindre ce but, nous proposons deux chapitres de thèse dont les objectifs sont les suivants. L'objectif de mon premier chapitre de thèse est de caractériser le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres *C. gigas* au travers d'une approche holistique de l'holobionte huître : l'hôte et son microbiote associé en suivant la dynamique des agents pathogènes. Le second chapitre de ma thèse a pour objectif d'étudier la diversité du mécanisme de pathogénèse des juvéniles d'huîtres creuses *C. gigas* en analysant des génotypes contrastés confrontés à des environnements infectieux différents (atlantique et méditerranée).

## Chapitre 1 : Caractérisation du mécanisme de pathogénèse des juvéniles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*.

### Introduction et principaux résultats

Nous l'avons vu tout au long de l'état de l'art, les mortalités des juvéniles d'huîtres sont d'étiologie complexe avec un certain nombre de causes identifiées. Parmi ces causes, les agents pathogènes associés aux mortalités ont fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, au cours de ces 10 dernières années, deux visions scientifiques impliquant deux types d'hypothèses ont alimenté la controverse. La première soutient l'hypothèse virale alors que la seconde se concentre sur l'implication des bactéries et plus particulièrement le rôle des vibrios dans l'expression de la maladie.

Malgré une avancée certaine dans la compréhension des mécanismes de pathogénicité associés à ces deux types d'agents pathogènes, à ce jour, nous ignorons par quels mécanismes les juvéniles d'huîtres meurent. Cette difficulté est liée à l'utilisation d'approches réductionnistes face à cette pathologie d'étiologie complexe. En effet, comprendre une pathogénèse d'origine multifactorielle, nécessite d'intégrer l'ensemble des facteurs identifiés comme ayant un rôle clef dans le processus infectieux. C'est ce que nous avons réalisé dans le cadre du projet ANR DECIPHER « déchiffrement des maladies multifactorielles : cas des mortalités de l'huître ». Par la mise en place d'une approche holistique, nous avons caractérisé la séquence des événements aboutissant au développement de la maladie des huîtres. Nous avons pour cela étudié la dynamique de l'holobionte huître : l'hôte et son microbiote associé en suivant les deux types d'agents pathogènes, bactéries et virus, systématiquement détectés lors de la pathogénèse.

Cette analyse intégrative a pu être réalisée grâce (i) à l'utilisation d'une combinaison de techniques traditionnelles (qPCR et analyses histologiques) et de séquençage de nouvelle génération (RNAseq et Barcoding 16S), (ii) à l'utilisation d'un système d'infection écologiquement réaliste développé récemment et (iii) à la prise en compte dans l'analyse de familles d'huîtres présentant des phénotypes contrastés (sensible /S résistant) lorsqu'elles sont confrontées à l'environnement infectieux (atlantique dans cette étude).

Ainsi, nous avons démontré que la maladie est causée par une infection multiple avec comme première étape nécessaire l'infection des cellules immunocompétentes de l'huître (les

hémocytes) par OsHV-1 $\mu$ var. La réplication du virus conduit à un état immunodéprimé de l'huître qui conduit à une septicémie par des bactéries opportunistes entraînant la mort des huîtres.

Plus précisément, nous avons mis en évidence que le virus OsHV-1 $\mu$ var est capable d'infecter l'ensemble des familles mais qu'il se réplique intensément uniquement chez les familles sensibles. La réplication devient intense à partir de 24h chez les familles sensibles alors qu'elle est jugulée chez les résistantes. De manière concomitante, l'analyse du microbiote par barcoding 16S nous a permis d'identifier une modification dans la structure et dans la composition des communautés bactériennes présentes chez les familles sensibles entre 24 et 48h, période durant laquelle le virus se réplique de façon intense. Nous avons pu observer aux différents rangs taxonomiques des modifications de l'abondance relative des bactéries du microbiote plus importantes chez les huîtres sensibles que chez les résistantes. Deux classes sont particulièrement touchées en termes d'abondance : les Gammaprotéobactéries et les Epsilonprotéobactéries, dont la proportion augmente chez les huîtres sensibles, 48h après l'infection. Parmi ces classes, 4 genres bactériens augmentent de façon très significative : *Vibrio*, *Arcobacter*, *Marinomonas* et *Alteromonadales*. A 60 h post-exposition, nous avons observé une augmentation significative du nombre de bactéries totales chez les huîtres sensibles. Simultanément, la charge en *Vibrio* totale augmente. Associée à cette colonisation bactérienne, nous avons observé, par histologie, des dommages tissulaires majeurs induits par les bactéries chez les huîtres sensibles au moment des mortalités.

Concernant la réponse transcriptomique, nous avons mis en évidence une réponse antivirale plus précoce et plus forte, dans les 12 premières heures suivant l'exposition, chez les huîtres résistantes. A l'inverse chez les sensibles, cette réponse antivirale est plus forte mais retardée dans le temps puisqu'elle apparaît à partir de 24h. Malgré la mise en place d'une réponse antivirale plus forte, le virus continue de se répliquer chez ces huîtres. Nous avons pu observer une induction d'inhibiteurs d'apoptose (IAPs) viraux et endogènes à partir de 48h chez les huîtres sensibles expliquant que la réponse antivirale soit inefficace. Ainsi les cellules infectées par le virus ne rentreront pas en apoptose ce qui entraînera une intense multiplication virale et une généralisation de l'infection. Suite à cette multiplication, la quantité de charge bactérienne augmente fortement jusqu'à la fin de l'infection. Parallèlement à l'induction des

IAPs chez la famille sensible, nous avons observé entre 24h et 48h une chute de la représentativité des transcrits correspondant à certains marqueurs hémocytaires dont les peptides antimicrobiens (AMPs) ou encore la superoxyde dismutase. Ces AMPs étant exprimés par les hémocytes, cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse que les hémocytes seraient les cellules cibles du virus. En effet, le virus altèrerait, par un mécanisme en cours d'élucidation (Martenot et al. 2017 ; Martenot et al. 2016 ; Morga et al. 2017), les hémocytes de l'huître. Ainsi le bouclier antibactérien serait affecté et permettrait la colonisation bactérienne des tissus de l'huître. En revanche, les huîtres résistantes seraient capables de mettre en place une réponse antivirale plus précoce et ceci leur permettraient de juguler la réplication virale. Par conséquent, les fonctions hémocytaires ne seraient pas altérées, l'expression des peptides antimicrobiens active permettant une défense antimicrobienne efficace sans prolifération bactérienne ni septicémie : l'homéostasie des huîtres serait conservée.

Enfin ce schéma infectieux a été validé par des infections expérimentales rationalisées durant lesquelles soit la réplication virale soit la multiplication bactérienne a été bloquée par un traitement des huîtres receveuses par des ARN double brins (mimant une infection virale) ou des antibiotiques, respectivement. Ces traitements bloquent ou délayent le développement de la maladie chez les huîtres sensibles, ce qui montre que les deux infections sont nécessaires pour compléter le processus infectieux caractéristique du POMS.

Cette étude est la première à déchiffrer le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* avec l'identification d'une infection multiple. Elle souligne également l'importance de la mise en place d'un tel type d'approche holistique pour la compréhension des pathologies d'étiologie complexe.

L'ensemble du travail qui a été réalisé pour caractériser le mécanisme de pathogénèse est présenté dans l'article 1 : « *Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in Pacific oysters, Nature Communications (in press)* ». Les supplementary files sont présentés en annexe 1.

[Article 1: « Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in Pacific oysters, Nature Communications \(in press\) ».](#)

# **Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in Pacific oysters**

Julien de Lorgeril<sup>1,&</sup>, Aude Lucasson<sup>1,&</sup>, Bruno Petton<sup>2</sup>, Eve Toulza<sup>1</sup>, Caroline Montagnani<sup>1</sup>, Camille Clerissi<sup>1</sup>, Jérémie Vidal-Dupiol<sup>1</sup>, Cristian Chaparro<sup>1</sup>, Richard Galinier<sup>1</sup>, Jean-Michel Escoubas<sup>1</sup>, Philippe Haffner<sup>1</sup>, Lionel Degremont<sup>3</sup>, Guillaume M. Charrière<sup>1</sup>, Maxime Lafont<sup>1</sup>, Abigaïl Delort<sup>1</sup>, Agnès Vergnes<sup>1</sup>, Marlène Chiarello<sup>4</sup>, Nicole Faury<sup>3</sup>, Tristan Rubio<sup>1</sup>, Marc Leroy<sup>1</sup>, Adeline Pérignon<sup>5</sup>, Denis Régler<sup>5</sup>, Benjamin Morga<sup>3</sup>, Marianne Alunno-Bruscia<sup>2</sup>, Pierre Boudry<sup>6</sup>, Frédérique Le Roux<sup>7</sup>, Delphine Destoumieux-Garzón<sup>1</sup>, Yannick Gueguen<sup>1,§</sup>, Guillaume Mitta<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup> IHPE, Université de Montpellier, CNRS, Ifremer, Université de Perpignan Via Domitia, Place E. Bataillon, CC080, 34095 Montpellier, France and 58 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

<sup>2</sup> Ifremer, LEMAR UMR 6539, UBO/CNRS/IRD/Ifremer, 11 presqu'île du vivier, 29840 Argenton-en-Landunvez, France

<sup>3</sup> Ifremer, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue du Mus de Loup, 17930 La Tremblade, France

<sup>4</sup> Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), CNRS, IRD, Ifremer, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, CC080, 34095 Montpellier, France

<sup>5</sup> CRCM, Comité de la Conchyliculture de Méditerranée, Quai Baptiste Guitard, 34140 Mèze, France.

<sup>6</sup> Ifremer, LEMAR UMR6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, ZI pointe du diable, CS 10070, F-29280, Plouzané, France

<sup>7</sup> Ifremer, Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, CNRS, UMR 8227, LBI2M, Station Biologique de Roscoff, Place G. Teissier, 29680 Roscoff, France

<sup>&</sup> equal contribution

<sup>§</sup> Correspondence and requests for materials should be addressed to Guillaume Mitta, [mitta@univ-perp.fr](mailto:mitta@univ-perp.fr) and Yannick Gueguen, [ygueguen@ifremer.fr](mailto:ygueguen@ifremer.fr)

## ABSTRACT

Infectious diseases are mostly explored using reductionist approaches despite repeated evidence showing them to be strongly influenced by numerous interacting host and environmental factors. Many diseases with a complex aetiology therefore remain misunderstood. By developing a holistic approach to tackle the complexity of interactions, we decipher the complex intra-host interactions underlying Pacific oyster mortality syndrome affecting juveniles of *Crassostrea gigas*, the main oyster species exploited worldwide. Using experimental infections reproducing the natural route of infection and combining thorough molecular analyses of oyster families with contrasted susceptibilities, we demonstrate that the disease is caused by multiple infection with an initial and necessary step of infection of oyster haemocytes by the *Ostreid herpesvirus* OsHV-1  $\mu$ Var. Viral replication leads to the host entering an immune-compromised state, evolving towards subsequent bacteraemia by opportunistic bacteria. We propose the application of our integrative approach to decipher other multifactorial diseases that affect non-model species worldwide.



For decades, methodological limitations have restricted the study of infectious diseases to simplified experimental pathosystems in which the influences of host and pathogen diversity and biotic and abiotic environments have been minimized. Such reductionist approaches have made diseases with complex aetiologies difficult to characterize. Thus, there is an incomplete understanding of diseases in which a conserved consortium of microorganisms co-operates to induce pathogenesis, diseases involving pathogens that cause immune deficiency followed by secondary infections, and diseases that are influenced by a series of host and environmental factors. There is a lack of understanding of some diseases triggering recurrent mass mortalities in non-model species of ecological and/or economic interest, such as pollinators, corals and marine molluscs <sup>1-3</sup>. These dramatic epizooties remain incompletely characterized because epidemiological descriptions require holistic approaches to decipher the whole pathosystem.

The objective of the present work was to examine one disease of complex aetiology affecting one of the most utilized invertebrate species in the world, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, applying a holistic approach to decipher the phenomenon. This species has been introduced from Asia to numerous countries and is now the main farmed oyster species worldwide <sup>4</sup>. Introduced to France in the 1970s, *C. gigas* suffers mass mortalities associated with complex interactions between the host, the environment and pathogens <sup>5</sup>. The severity of these mortality outbreaks has dramatically increased since 2008. They mainly affect juvenile stages, decimating up to 100% of young oysters in French farms <sup>6</sup>. In recent years, this mortality syndrome, called Pacific oyster mortality syndrome (POMS) <sup>7</sup>, has become panzootic, being observed in all coastal regions of France and numerous other countries worldwide <sup>6,8</sup>.

Research efforts have revealed a series of factors contributing to the disease, including infectious agents interacting with seawater temperature and oyster genetics <sup>6,9-14</sup>. The dramatic increase in mortality since 2008 coincided with the recurrent detection of *Ostreid herpesvirus* (OsHV-1) variants in moribund oysters both in France <sup>14-16</sup> and worldwide <sup>6,17-20</sup>. This increase has naturally driven research efforts to focus on the viral aetiology of the disease. However, the involvement of other aetiological agents is suspected. In particular, strains assigned to the genus *Vibrio* have been shown to be associated with the disease <sup>21</sup>. Among these, a *Vibrio crassostreae* population carrying a plasmid required for virulence has been repeatedly identified in diseased oysters <sup>22</sup>. Recent studies have also proposed that the stability of the natural bacterial microbiota, which is abundantly present in healthy oysters, influences their resistance to stress or invasion by

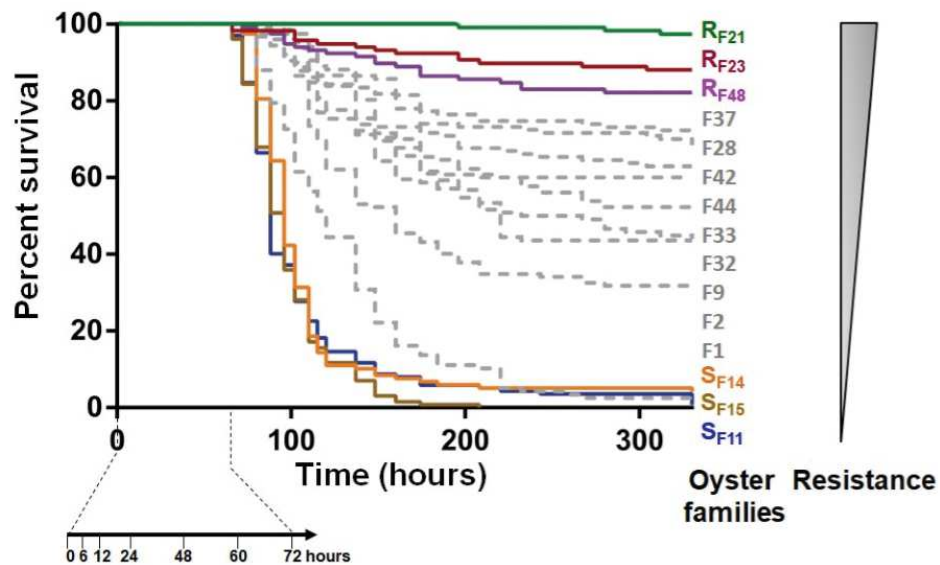
pathogens<sup>23,24</sup>. However, the roles of host genetics, pathogens, and opportunistic and commensal microbes have been studied with a focus on a restricted number of factors tested in isolation<sup>10,21-27</sup>. Thus, the dynamics, relative weight and interactions of these different parameters in the disease remain to be established.

In the present study, we concomitantly characterize the transcriptional responses of oysters and the dynamics of their associated microorganisms after exposure to an infectious environment using an experimental infection system that reproduced the natural route of infection in biparental families of oysters selected to display contrasted phenotypes (susceptible vs. resistant). This holistic approach allows us to establish that OsHV-1 replication in haemocytes is the initial step of the infectious process leading to an immune-compromised state of the host, which evolves towards subsequent bacteraemia by opportunistic bacteria. By identifying critical intra-host interactions between microorganisms and host immunity, this study cracks the code of POMS.

## RESULTS

**Production of oyster families with contrasted phenotypes.** To characterize the complex dynamics determining the outcome of Pacific oyster mortality syndrome, we produced 15 biparental oyster families with highly contrasted resistance phenotypes with regard to the disease. These families were produced from genitors that had experienced different selective filters. The genitors having experienced a high level of natural selection by the disease were either wild oysters collected from farming areas or oysters issued from mass selection programmes<sup>28</sup>. The genitors that had experienced low-level natural selection were wild oysters recruited outside farming areas (Supplementary Table 1). The juvenile offspring of the 15 biparental families produced were subjected to an ‘natural’ experimental infection mimicking disease transmission in the wild<sup>12,13,29</sup> (Supplementary Fig. 1). High variability in the dynamics of mortalities and percentages of survival (ranging from 0% to 97.4% at 330 h post-infection) were observed among families (Fig. 1). Two families showing highly contrasted phenotypes, Susceptible Family 11 ( $S_{F11}$ ) and Resistant Family 21 ( $R_{F21}$ ) (Mantel-Cox log-rank test,  $p < 0.0001$ ), were selected for the first set of molecular and histological analysis. During the experimental infection,  $S_{F11}$  oysters mortality began at 66 h and increased dramatically. At the end of the experiment (330 h), only 0.7% of  $S_{F11}$  oysters had survived. In contrast, almost all

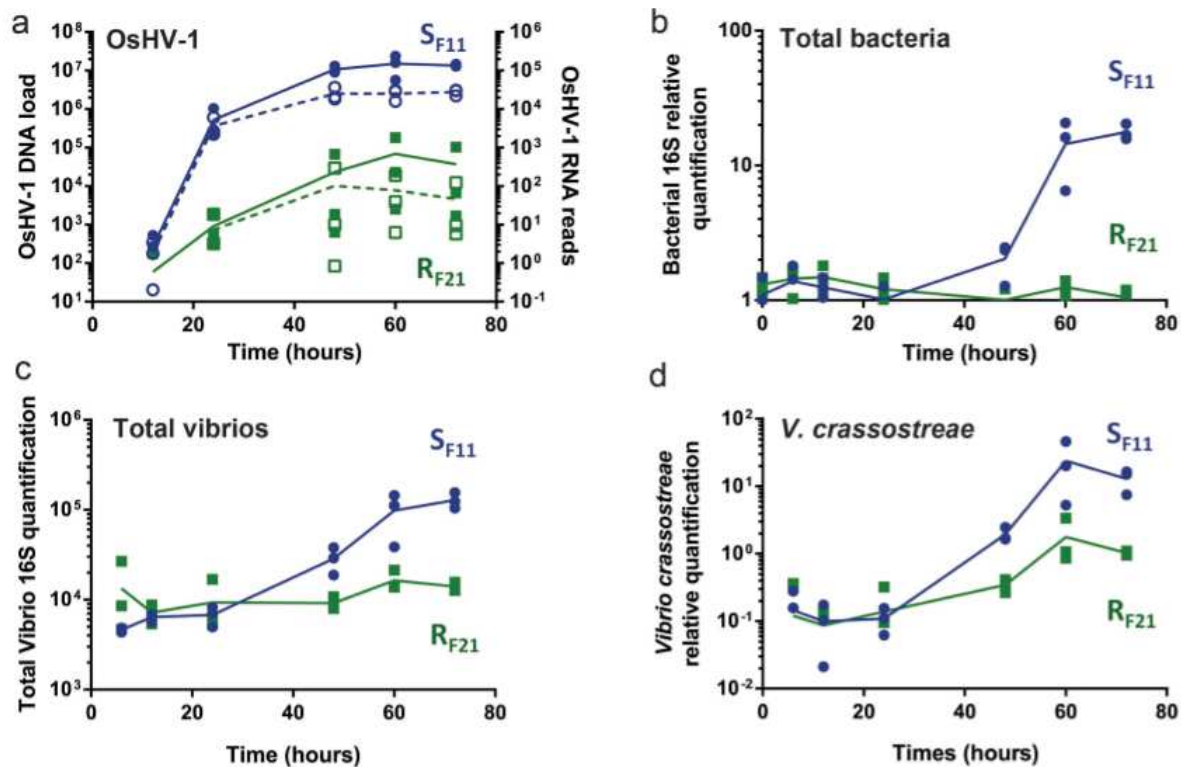
oysters of the  $R_{F21}$  family (97.4%) survived following exposure to the same infectious environment. The survival rates of  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters were also measured concomitantly in a batch of oysters left on oyster farms; they showed identical phenotypes, with 2% and 98.1% survival after 384 h of exposure to the infectious environment for  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$ , respectively. These results confirm that the disease that developed in our experimental set-up resembles the disease contracted in the natural environment with the same outcomes. Thereafter, the dynamics of the disease in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters were investigated by thorough molecular analyses.



**Figure 1: Production of oyster biparental families with contrasted resistance phenotypes.** Kaplan-Meier survival curves of the 15 families of recipient oysters ( $n=1000$  for each family) during the ‘natural’ experimental infection. At each time indicated on the arrow, 3 triplicates of 10 oysters were sampled from each tank for further molecular analysis.

**OsHV-1  $\mu$ Var infection occurs early in disease development.** OsHV-1 load and transcriptional activity were monitored in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters throughout the experiment using qPCR and RNA-seq, respectively (Fig. 2a). Whereas OsHV-1 DNA and RNA were detected in both families as early as 12 h after the beginning of experimental infection, very intense replication occurred in  $S_{F11}$  oysters, with DNA and RNA levels 3-log higher than in  $R_{F21}$  oysters at 24 h after exposure initiation (Fig. 2a). The time-course of OsHV-1 ORF expression is shown in Supplementary Fig. 2 for both oyster families. In  $S_{F11}$  oysters, the maximum viral load and

transcriptional activity were reached at 48 h and remained stable until the first deaths (at 66 h). The viral load remained low in R<sub>F21</sub> throughout the experiment without any remarkable mortality until the end of the experiment (330 h). Alignment of the Illumina reads to the OsHV-1 genome available in the NCBI database<sup>30</sup> revealed that the virus used in our experiments corresponded to an OsHV-1  $\mu$ Var variant, as indicated by (i) the deletion of 3 ORFs (ORF36, ORF37 and part of ORF38), (ii) the deletion of an adenosine upstream of ORF43 and (iii) a 12-nt deletion in the microsatellite locus H10, which are shared characteristics of  $\mu$ Var variants<sup>14,20,31</sup>. These variants have been associated with mass mortalities of juvenile oysters since 2008<sup>6,14,20,32</sup>. Taken together, these results show that OsHV-1  $\mu$ Var infection occurs in both families, but only R<sub>F21</sub> oysters successfully control viral replication.

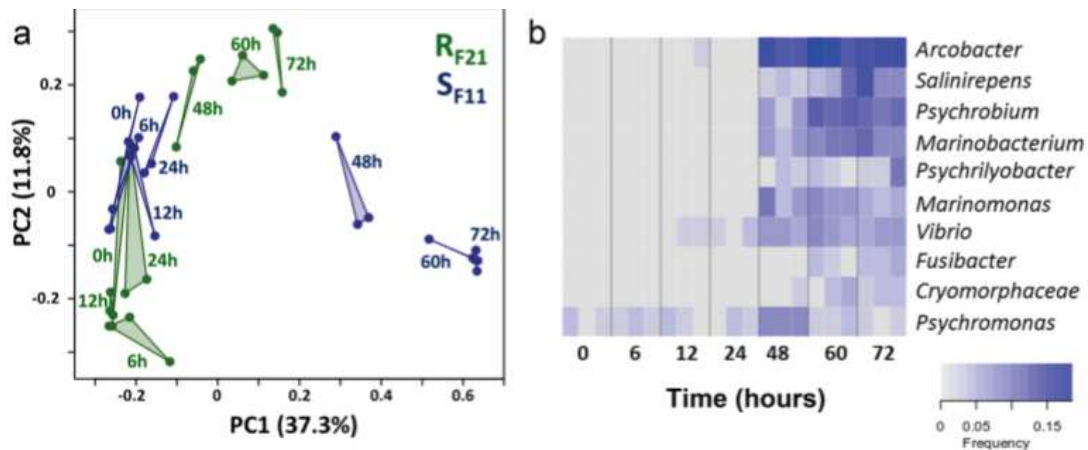


**Figure 2: OsHV-1 and bacterial colonization in the susceptible S<sub>F11</sub> oysters during the ‘natural’ experimental infection.** (a) The OsHV-1 load was quantified by qPCR and expressed as viral genomic units per ng of oyster DNA (plain lines, filled symbols); viral replication was estimated by the total number of RNA-seq reads mapped on the OsHV-1 genome (dotted lines, open symbols). Relative quantification of total bacteria (b), total *Vibrio* load (c) and *Vibrio crassostreae* (d) abundance were

measured by qPCR. Dots represent distinct pools of 10 oysters. The mean values (plain and dotted lines) are displayed.

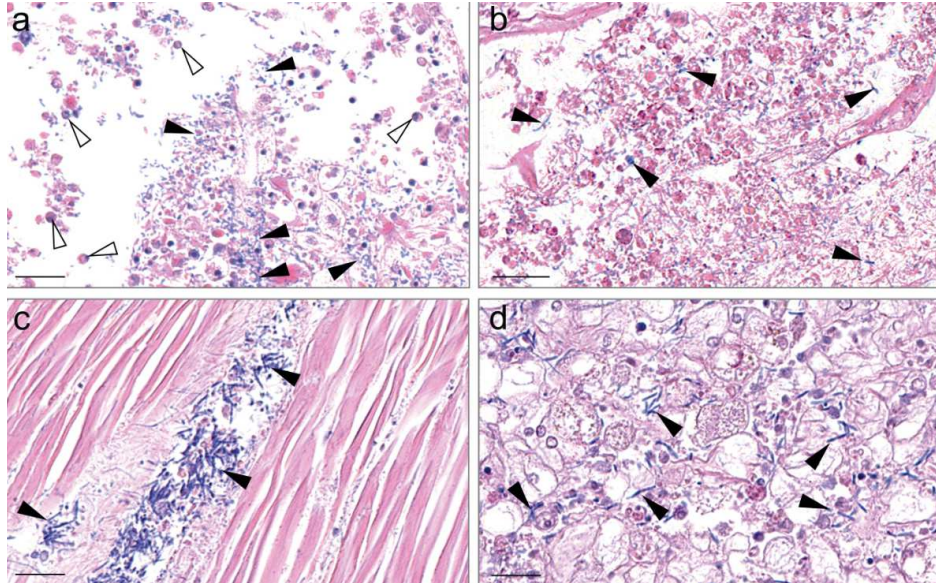
**Dysbiosis and bacteraemia occur in susceptible oysters.** To investigate the dynamics of oyster microbiota in the two families showing contrasting resistance to the disease, we analysed total bacterial communities using 16S rDNA metabarcoding over the first 3 days of the experiment. Overall, 6,061,881 clusters were obtained from 42 libraries (2 families, 7 sampling times, in triplicate). After cleaning steps and singleton filtering, 4,238,989 sequences affiliated with 10,080 OTUs were kept for further analyses (Supplementary Data 1). A sufficient sequencing depth was confirmed by species richness rarefaction curves (Supplementary Fig. 3). Changes in microbiota composition (Supplementary Fig. 4 and Supplementary Fig. 5) were much higher in  $S_{F11}$  oysters than in  $R_{F21}$  oysters throughout the experiment. Indeed, 105 OTUs significantly differed in terms of relative proportions in  $S_{F11}$  oysters, as opposed to 0 in  $R_{F21}$  oysters (Supplementary Fig. 5). A principal coordinate analysis (PCoA) of the Bray-Curtis dissimilarity matrix (beta diversity) consistently revealed a higher microbiota dispersion in the  $S_{F11}$  family (multivariate homogeneity of group dispersions, d.f. = 1;  $p = 0.016$ ) than in the  $R_{F21}$  family (Fig. 3a). This disruption of the bacterial community structure occurred in  $S_{F11}$  oysters between 24 h and 48 h concomitantly with the active replication of OsHV-1  $\mu$ Var. Similarly, the Chao1 and Shannon's H indexes of alpha diversity increased significantly in the  $S_{F11}$  family during the infectious process (Chao1: analysis of variance (ANOVA), d.f. = 6;  $p = 1.39e-07$  and Shannon's H index: ANOVA, d.f. = 6;  $p = 3.54e-05$ ), whereas they remained stable in the  $R_{F21}$  family (Supplementary Fig. 6). All the bacterial genera that changed significantly over the 'natural' experimental infection in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters are reported in Supplementary Data 2. Among these modified genera, those representing more than 4% of the bacteria in at least one sample of  $S_{F11}$  oysters are shown in Fig. 3b. The corresponding OTUs, which represent only 2.07% of the total bacteria at the beginning of the experiment, represent 59.07% of the  $S_{F11}$  bacterial community at 72 h, when the first mortalities occurred. Some of these OTUs were assigned to the genera *Vibrio* and *Arcobacter*, which have been previously associated with oyster mortalities<sup>22,24</sup>. In contrast, in  $R_{F21}$  oysters, the same taxa did not vary significantly over time (Supplementary Fig. 7 and Supplementary Data 2).

In addition, a significant increase in total bacterial abundance was observed in  $S_{F11}$  oysters only, which started at 48 h and continued to rise until the end of the experiment (ANOVA, d.f. = 6;  $p < 0.0001$ ; Fig. 2b). Compared with T0, the total bacteria were 13- and 17-fold higher at 60 h and 72 h, respectively, suggesting a massive bacterial proliferation in  $S_{F11}$  oysters. Simultaneously, we observed a high increase in total *Vibrio* load and abundance of *Vibrio crassostreae*, a previously characterized bacterial pathogen of oysters associated with the disease<sup>21,22</sup> (Fig. 2c, d). Accordingly, histological analyses revealed bacterial colonization and tissue damage in  $S_{F11}$  oyster histological sections (Fig. 4). At 54 h, bacterial accumulation accompanied by infiltrating haemocytes was visible in different areas both inside and outside the gill tissues (Fig. 4a). At 78 h, the gill tissue structure was completely disrupted and bacteria had spread throughout the body (Fig. 4b, c, d and Supplementary Fig. 8). In contrast, in  $R_{F21}$  oysters, total bacteria and vibrios remained low and stable (Fig. 2b-d), and no tissue damage or tissue colonization by bacteria were observed at any sampled time point (Supplementary Fig. 8).



**Figure 3: Microbiota changes in the susceptible  $S_{F11}$  and the resistant  $R_{F21}$  oysters during the ‘natural’ experimental infection. (a)** Principal coordinate analysis (PCoA) plot of the Bray-Curtis dissimilarity matrix of the microbiota. Each point of the triangles corresponds to one of the 3 replicates at one kinetic time. Dots represent distinct pools of 10 oysters. **(b)** Heatmap of the bacterial taxa that were significantly modified in susceptible oysters during the course of infection. Analyses were performed at the genus level. Only genera with a relative proportion superior to 4% in at least one sample are shown. The intensity level of the blue represents the relative abundance of bacterial taxa. At each time, the analysis was performed on 3 distinct pools of 10 oysters.

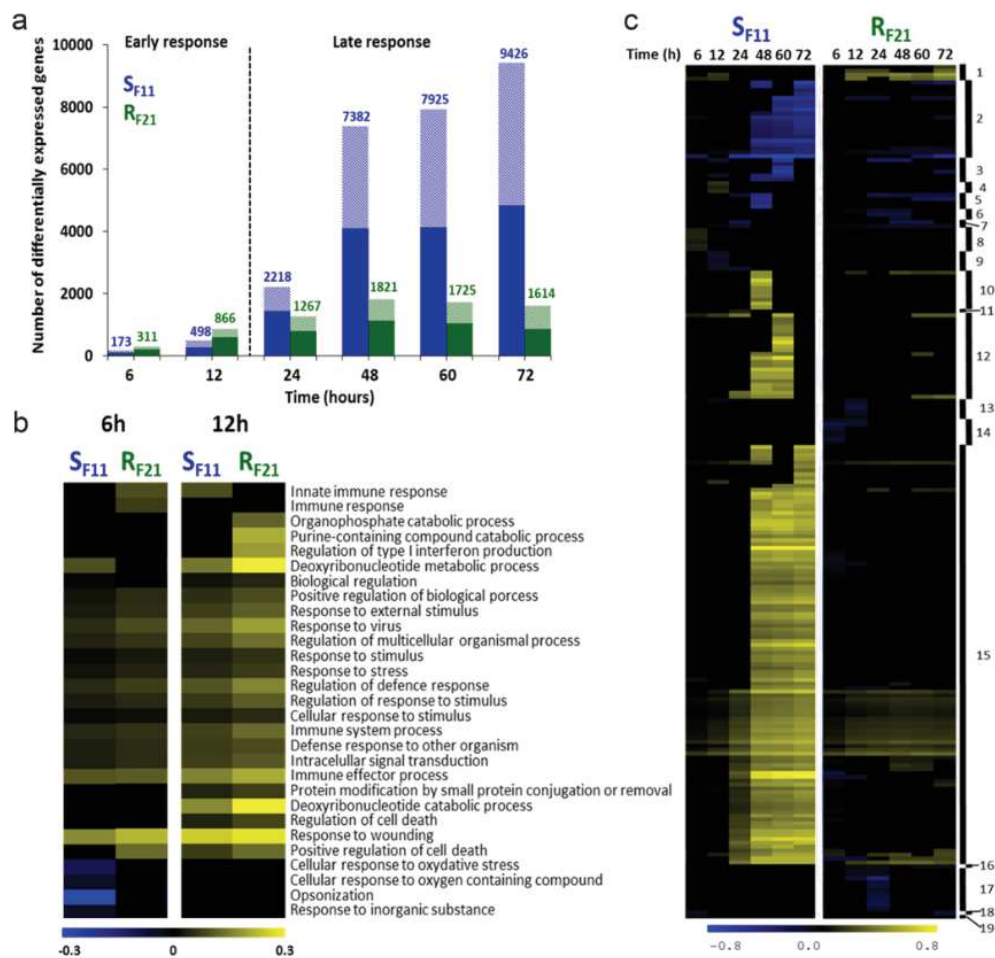




**Figure 4: Accumulation of bacteria in tissues of the susceptible  $S_{F11}$  oysters.** Giemsa staining was performed on paraffin wax-embedded tissue histological sections of  $S_{F11}$  oysters sampled at different time points to visualize tissue colonization by bacteria. Oyster tissues and cells were coloured in shades of pink to purple, and most bacteria appeared in deep blue (scale bars corresponds to 20  $\mu$ M). **(a)** At 54 h after the beginning of the ‘natural’ experimental infection, bacteria accumulated in the gills of the  $S_{F11}$  oysters (filled arrowheads). Rounded cells reminiscent of haemocytes were found in both gill tissues and outside tissues in the vicinity of the bacteria (open arrowheads). At 78 h, gill tissues appeared massively degraded, and bacteria were found in most tissues of the  $S_{F11}$  oysters, *e.g.*, in **(b)** gills, **(c)** adductor muscle and **(d)** interstitial tissues near the digestive tract. No bacteria or tissue damage were observed on sections of  $S_{F11}$  or  $R_{F21}$  either at the beginning of the experimental infection or at any time points for the  $R_{F21}$  oyster sections (Supplementary Fig. 8).

**Resistant oysters display an early antiviral response.** To identify key host factors controlling the infection, we compared the transcriptomic responses of  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters by RNA-seq over the time-course of the ‘natural’ experimental infection. In total, the sequencing of 42 samples (2 families, 7 sampling times, in triplicate) yielded between 20.4 and 32.3 million Illumina paired reads per sample; 69.7% to 75.3% of them mapped to the *C. gigas* V9 reference genome. RNA-seq results were validated by RT-qPCR on 30 genes at all sampling times in both oyster families ( $r^2 = 0.936$ ) (Supplementary Fig. 9). The transcriptomic responses of  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters can be divided into two phases: an early response (before 24 h) and a later response

(24 h to 72 h) (Fig. 5a). In the early response, the total number of differentially expressed genes was higher in R<sub>F21</sub> than in S<sub>F11</sub> oysters (Fig. 5a). To gain access to the functions enriched during this early phase, we used gene ontology (GO) enrichment analyses (Fig. 5b and Supplementary Fig. 10). At these time points, transcriptomes of R<sub>F21</sub> oysters were more enriched in functional categories related to immunity than S<sub>F11</sub> transcriptomes (Fig. 5b and Supplementary Fig. 10). Among those genes, 40.9% were involved in antiviral defence (Supplementary Data 3), encoding elements of the RLR/STING (*e.g.*, RIG-1, IRF and cGAS) and JAK/STAT (*e.g.*, STAT and SOCS2) pathways, antiviral effectors (*e.g.*, IFI44, Viperin, and SAMHD-1) and proteins involved in the apoptosis (*e.g.*, TNF and caspase-3) and maintenance of cellular homeostasis under viral infection (*e.g.*, poly(ADP-ribose) polymerase). Taken together, these data show that the antiviral response is more intense in R<sub>F21</sub> oysters than in S<sub>F11</sub> oysters during the first 12 h following exposure to the examined infectious environment.

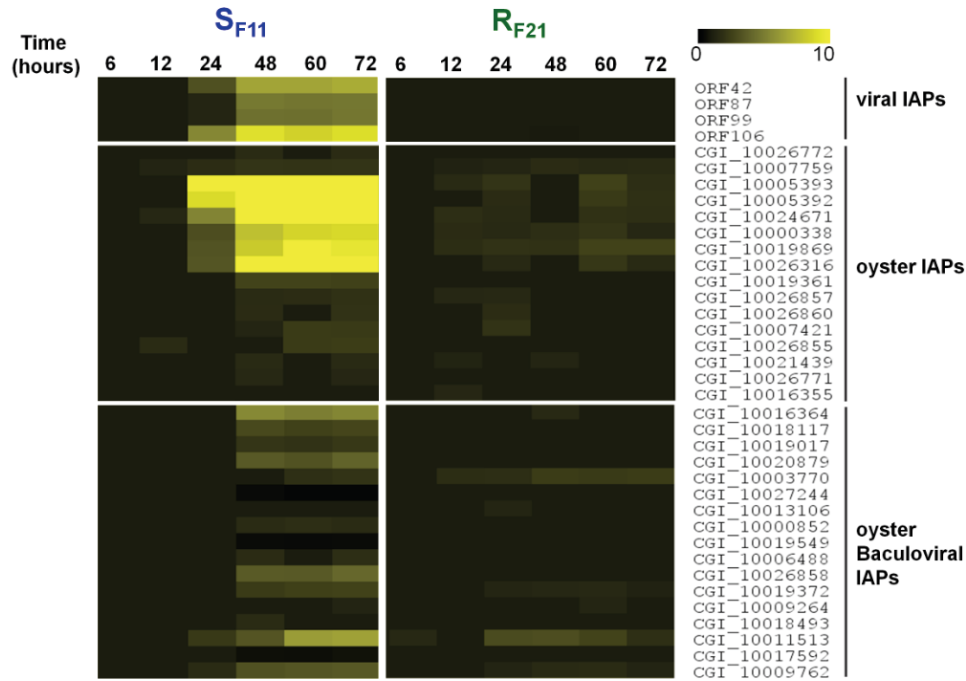


**Figure 5: The resistant R<sub>F21</sub> oysters display an early antiviral response that is delayed in the S<sub>F11</sub> susceptible oysters. (a)** The number of genes that were differentially expressed during the ‘natural’



experimental infection was higher in R<sub>F21</sub> (green) than in S<sub>F11</sub> (blue) oysters before 24 h (early response). This trend was reversed after 24 h and until the end of the infection (late response). Up-regulated genes are represented as filled coloured bars and down-regulated genes are represented as hatched bars. **(b)** Heat map focusing on the two clusters containing 29 immune-related GO categories that were significantly enriched at 6 and 12 h (FDR<1%; clusters A and B, Supplementary Fig. 10). **(c)** Heat map of the 220 significantly enriched GO categories (FDR<1%, biological processes root) clustered according to the Pearson correlation (numbered filled bar). The enrichment intensity was expressed as the ratio between the number of genes that were significantly up- (yellow heat) or down-regulated (blue heat) in the category compared with the total number of genes in the category. If the intensity was equal to zero (black heat), then the enrichment was not significant for the corresponding condition. Detailed results (cluster number, GO terms and enrichment values) are presented in Supplementary Data 4.

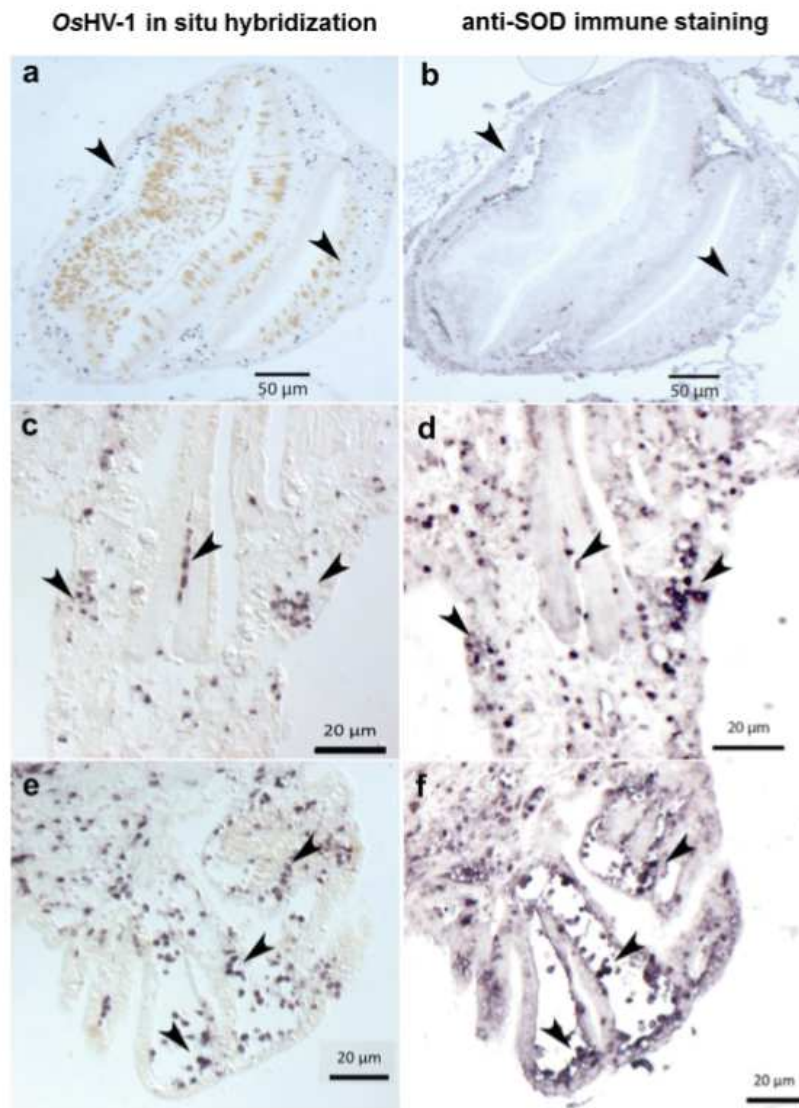
**The antiviral response of susceptible oysters is inefficient.** During the second phase of the response (after 24 h), S<sub>F11</sub> oysters displayed a major reprogramming of their transcriptome, with significant changes in the expression of 9,426 genes (33.6% of the transcriptome, Fig. 5a) and a large number of enriched functional categories as determined by GO enrichment analyses (Fig. 5c and Supplementary Data 4). This major transcriptomic reprogramming was not observed in R<sub>F21</sub> oysters (Fig. 5a, c). During this second phase, immunity and antiviral defence genes (cluster 15 Fig. 5c) were strongly enriched in S<sub>F11</sub> oysters. However, this intense antiviral response was inefficient, as the replication of the virus in S<sub>F11</sub> oysters was very high at these time points (Fig. 2a). Among the functional categories that were highly induced in S<sub>F11</sub> oysters only, we found the *negative regulation of cell death* category to be of particular interest (Supplementary Data 4). We performed a detailed analysis of the expression of the corresponding genes encoding endogenous inhibitors of apoptosis proteins (IAPs and Baculoviral IAPs, Fig. 6). These genes were found to be highly induced in S<sub>F11</sub> oysters, but only from 24 h to the end of the experimental infection. In addition, viral transcriptome analysis revealed an over-representation of viral transcripts encoding putative IAPs (ORFs 42, 87, 99 and 106) at the same time points in S<sub>F11</sub> oysters (Fig. 6). These data indicate that S<sub>F11</sub> oysters mount a delayed inefficient antiviral response and have an impacted apoptosis regulation during the late phase response.



**Figure 6: Viral and oyster endogenous inhibitors of apoptosis (IAPs) are strongly induced in the susceptible  $S_{F11}$  oysters (but not in the resistant  $R_{F21}$  oysters) during the ‘natural’ experimental infection.** The fold changes in virus IAPs, oyster IAPs, and oyster and baculoviral IAPs were calculated between each time point of the kinetics and the T0. Analyses were conducted with the RNA-seq data through mapping against the *C. gigas* genome for oyster IAPs and against the OsHV-1 genome for viral IAPs<sup>30</sup>. The intensity of the colour indicates the magnitude of the differential expression (log2 fold change). The heat map was constructed with Multiple Array Viewer software.

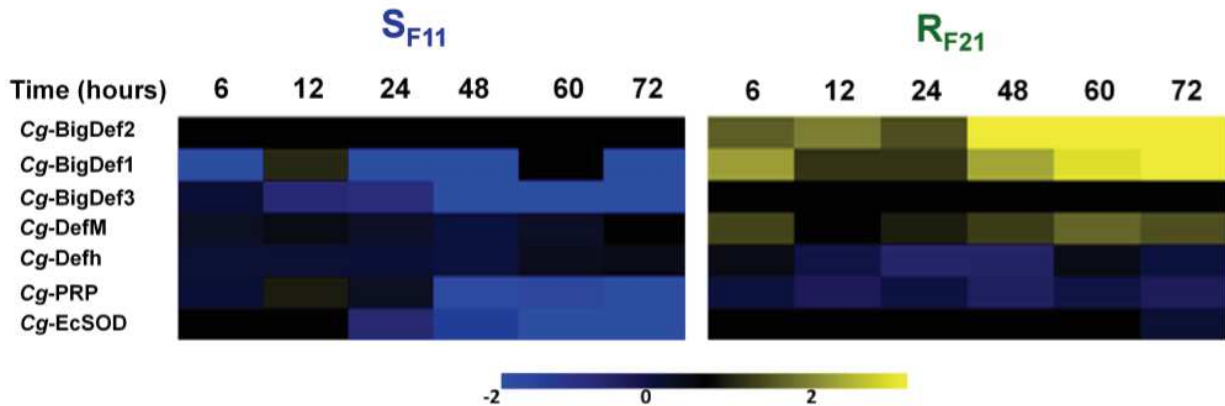
**OsHV-1 infection alters the antibacterial defence of oysters.** Histological sections of  $S_{F11}$  oysters showed accumulation of OsHV-1 in the haemocytes (Fig. 7), which are oyster immune cells that play a major role in controlling bacterial infections<sup>33</sup>. Interestingly, histological sections of  $R_{F21}$  oysters were devoid of OsHV-1 positive cells (Supplementary Fig. 11). As a proxy to monitor the antibacterial defence of oysters, we analysed the expression of genes encoding antimicrobial peptides (AMPs) in both oyster families. AMPs showed highly contrasted expression patterns in  $R_{F21}$  and  $S_{F11}$  oysters during the experiment (Fig. 8). In resistant ( $R_{F21}$ ) oysters, expression of *Cg-BigDef1* and 2 was induced. Conversely, expression of *Cg-BigDef1*, *Cg-BigDef3*, and *Cg-PRP* transcripts decreased significantly and regularly over time in  $S_{F11}$  oysters (Kruskal-Wallis,  $p = 0.009$ ,  $0.009$ , and  $0.005$ , respectively). This overall repression of AMP expression, which has not been previously reported, was particularly strong after 24 h,

which corresponds to the period of microbiota destabilization preceding bacterial proliferation in  $S_{F11}$  oysters (Fig. 2, 3 and 4). Interestingly, both *Cg*-BigDefs and *Cg*-PRPs are produced only by haemocytes<sup>34</sup>. We also showed that the transcript abundance of *Cg*-EcSOD, a specific marker of haemocytes<sup>35</sup>, decreased over time in  $S_{F11}$  oysters only (Fig. 8). Taken together, our data strongly suggest that by invading haemocytes of susceptible oysters, OsHV-1 infection alters haemocyte functions and thereby disrupts an important component of the oyster antibacterial shield.



**Figure 7: OsHV-1 invades haemocytes of the susceptible  $S_{F11}$  oysters.** OsHV-1 was detected in  $S_{F11}$  by *in situ* hybridization (a, c, e). Paraffin wax-embedded sections of oysters that were fixed 54 h after the beginning of the “natural” experimental infection were hybridized with a specific probe labelled with digoxigenin and revealed using alkaline phosphatase-conjugated antibodies and NBT/BCIP (dark blue

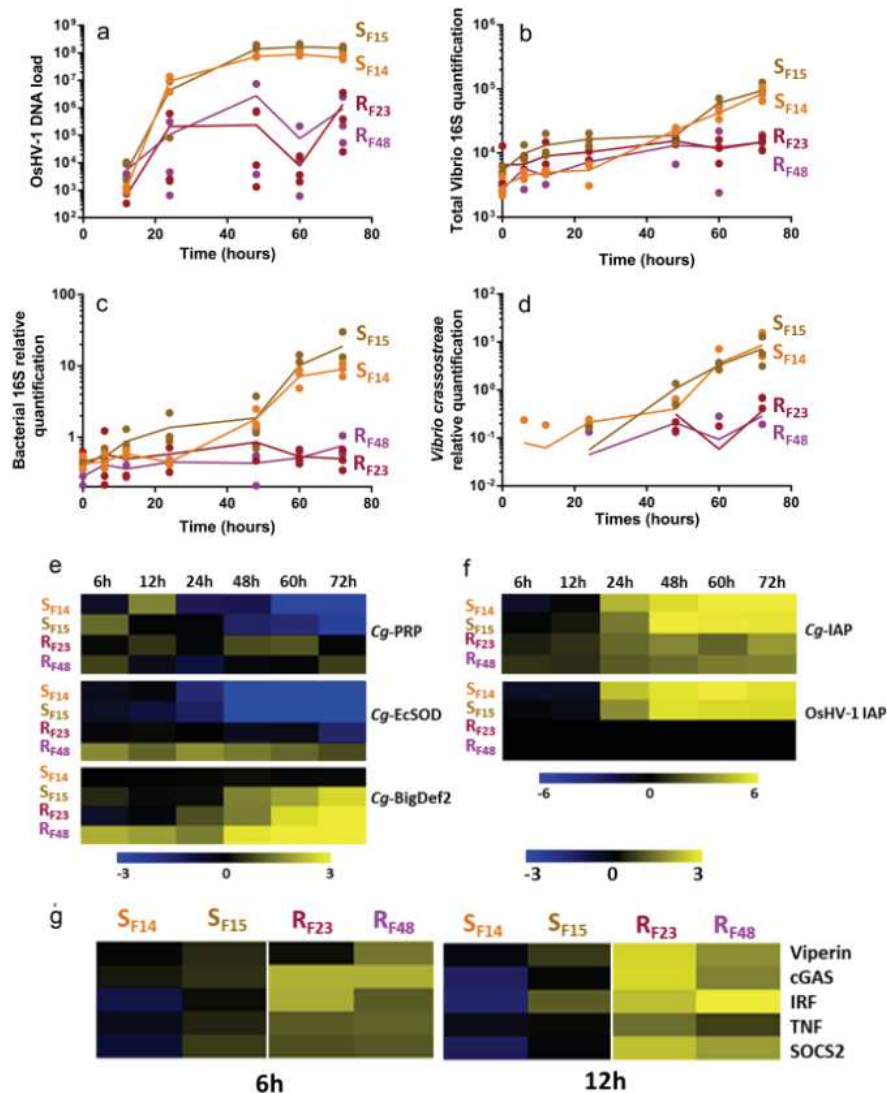
precipitate). Haemocytes were localized on consecutive tissue sections by immunostaining with an antibody specific to the SOD haemocytic protein (**b, d, f**). Immunostaining was revealed using alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies. Labelling of virus-infected cells was observed in areas enriched in haemocytes in different tissues (indicated by arrowheads), such as the connective tissue surrounding the digestive gland (**a, b**, scale bars 50 $\mu$ M) or in the gills (**c-f**, scale bars 20 $\mu$ M).



**Figure 8: Antimicrobial peptides and Cg-EcSOD expression is repressed in the susceptible  $S_{F11}$  oysters.** Time-course of antimicrobial peptide (AMP) and Cg-EcSOD expression in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters during the ‘natural’ experimental infection. The relative expression of AMPs was analysed by comparing the number of reads (calculated by alignment using DIAMOND 0.7.9) between each time point and time zero. Analyses were performed using the RNA-seq data by mapping against the *C. gigas* genome for Cg-EcSOD. The intensity of the colour from blue to yellow indicates the magnitude of the differential expression (log2 fold change). The heat map was constructed with Multiple Array Viewer software.

**Similar events lead to similar phenotypes across families.** To determine whether the main molecular events observed in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters were conserved in other oyster families sharing the same phenotypes but with distinct genetic backgrounds, we monitored viral replication, bacterial load and gene expression in two additional susceptible families,  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ , which died at more than 96% (Fig. 1), and in two other resistant families ( $R_{F23}$  and  $R_{F48}$ ), which died at less than 18% (Fig. 1). Consistent with our previous observations for  $R_{F11}$  and  $S_{F21}$ , viral infection occurred early (12 h) after the beginning of the experimental infection in all oyster families, but OsHV-1 replicated intensely in susceptible families ( $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ ) only (Fig. 9a). Subsequently, these two families were heavily colonized by bacteria (pairwise *t.test* at T72h; d.f.=10;  $p = 0.0027$ ), including vibrios and *V. crassostreae* (Fig. 9b-d). Like  $S_{F11}$ , the susceptible families  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$  exhibited a high induction of both oyster and viral IAP (pairwise *t.test* at

T72h; d.f.=10;  $p = 0.0025$  and  $p < 0.0001$ , respectively), together with lower expression or repression of haemocyte genes encoding AMPs and *Cg*-EcSOD (Fig. 9e-f). In contrast, oysters from resistant families  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$  displayed neither such a massive induction of IAP nor a repression of *Cg*-EcSOD or AMP expression, which were instead induced (Fig. 9e-f), confirming earlier results for the  $R_{F21}$  family (Fig. 6 and 8). Finally, we showed that early induction of antiviral genes (Viperin, cGAS, IRF, TNF and SOCS2) at 6 h (pairwise *t.test*; d.f.=10;  $p = 0.1841$ ,  $p = 0.0063$ ,  $p = 0.0317$ ,  $p = 0.0024$ ,  $p = 0.0409$ , respectively) and 12 h (pairwise *t.test*; d.f.=10;  $p = 0.0012$ ,  $p = 0.0011$ ,  $p = 0.0143$ ,  $p = 0.0009$ ,  $p < 0.0001$ , respectively) was the hallmark of resistant families (Fig. 9g), as also evidenced by the RNA-seq data from  $R_{F21}$  oysters (Supplementary Data 3).



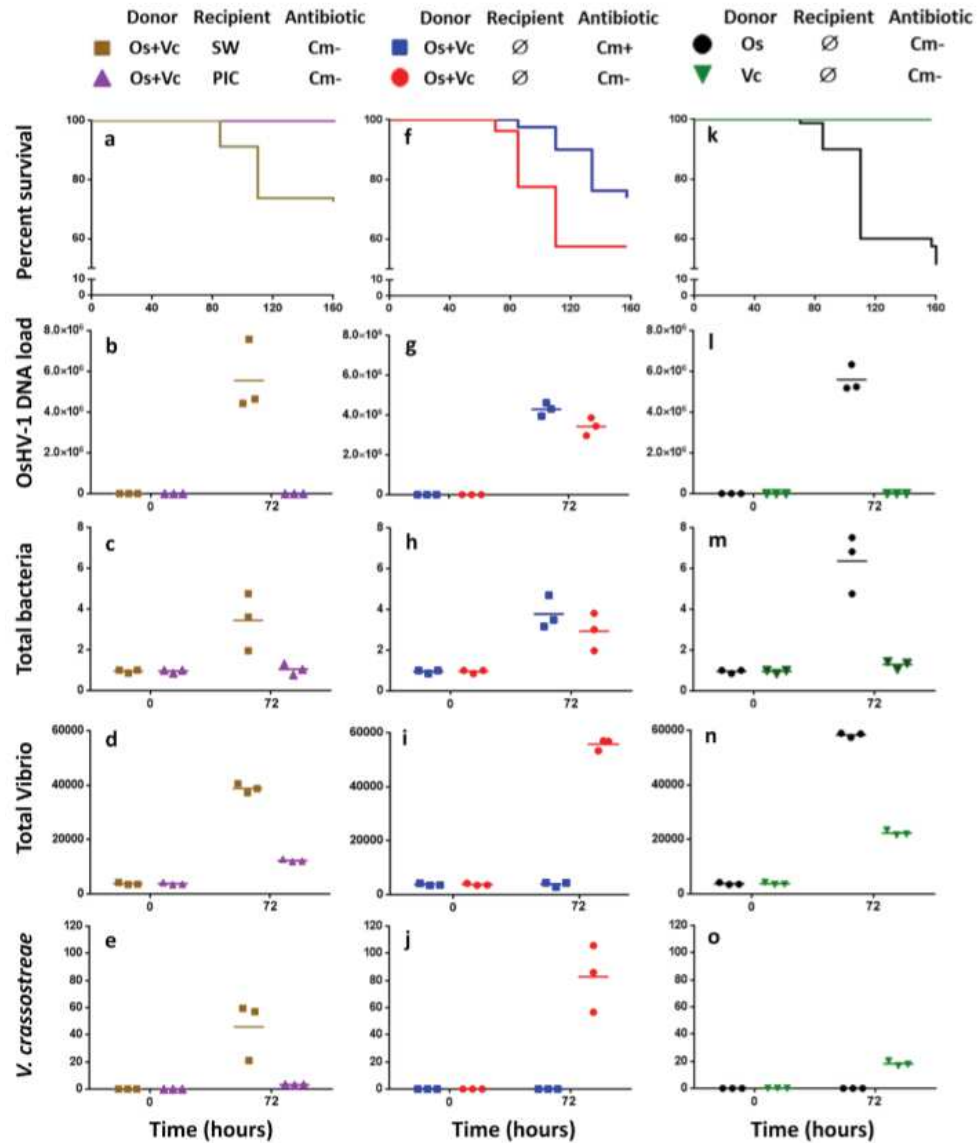


**Figure 9: Conservation of molecular events during the ‘natural’ experimental infection in the susceptible  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ , and in the resistant  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$  oysters.** (a) The OsHV-1 load was quantified by qPCR. Quantification of total bacteria (b), total *Vibrio* (c) and *Vibrio crassostreae* (d) were performed by qPCR. For a to d, dots represent distinct pools of 10 oysters. The mean values (plain lines) are displayed. Heatmap of antimicrobial peptide (Cg-Bigdef2, Cg-PRP), Cg-EcSOD (e) and IAPs (f) expression measured by RT-qPCR in each oyster family. (g) Heat map of antiviral gene (Viperin, cGAS, IRF, TNF and SOCS2) expression measured by RT-qPCR in each oyster family at early time points (6 and 12 h) of the experimental infection. The intensity of the colour from blue to yellow indicates the magnitude of the differential expression (log<sub>2</sub> fold change). The heat map was constructed with Multiple Array Viewer software.

**Viral infection and bacteraemia are needed to kill oysters.** To disentangle the respective roles of OsHV-1 and bacteria in pathogenesis, we designed a series of experimental infections using genetically diversified juveniles (Fig. 10). In a first set of experiments, we mimicked the simultaneous transmission of OsHV-1 and vibrios from infected to healthy oysters. Recipient (healthy) oysters were simultaneously exposed to two types of donors: the first ones were injected with *V. crassostreae* (pathogenic strain J2-9<sup>21</sup>), and the second ones were injected with OsHV-1 (Fig. 10a-j). The mortality of the donors is presented in Supplementary Fig. 12. Recipient oysters were either injected with poly(I:C), which restricts OsHV-1 replication<sup>36</sup>, with sterile seawater (SW) as a control (Fig. 10a-e), or treated with chloramphenicol, a broad-spectrum bacteriostatic antibiotic that is used to limit oyster colonization by bacteria, particularly vibrios<sup>12</sup> (Fig. 10f-j). The mortality and pathogen load of recipient oysters were monitored throughout disease development. Injection of poly(I:C), as opposed to SW, was sufficient to completely block OsHV-1 replication (Fig. 10b), bacterial colonization (Fig. 10c, d and e) and the death of recipient oysters (Fig. 10a). Moreover, antibiotic treatment significantly reduced the load of vibrios (pairwise *t.test* at T72h; d.f.=2; *p* = 0.0009, Fig. 10i) including *V. crassostreae* (pairwise *t.test* at T72h; d.f.=2; *p* = 0.028, Fig. 10j) and oyster mortality (Mantel-Cox log-rank test, *p* = 0.0075, Fig. 10f) without affecting OsHV-1 replication (Fig. 10g) and the total bacterial load associated with oysters (Fig. 10h). Importantly, when we mimicked the transmission of only one pathogen (Fig. 10k-o), the mortality of recipient oysters was observed only when they were exposed to virus-injected donors (Fig. 10k). In this condition, viral replication (Fig. 10l) was accompanied by increases in the total bacterial (Fig. 10m) and total vibrio loads (Fig. 10n).

Nevertheless, *V. crassostreae*, which was not included in this last experimental infection set-up, was not detected in oyster flesh (Fig. 10o). Two additional rationalized experimental infections were performed using the same design with susceptible juveniles from a biparental family (family H12<sup>10</sup>) (Supplementary Fig. 13). Both experiments confirmed the essential role of OsHV-1 replication in the bacterial colonization and death of recipient oysters (mortality data for donors are provided in Supplementary Fig. 14).

To identify the bacterial species involved in the secondary bacterial infection in our rationalized experiments, we studied microbiota changes in recipient oysters using 16S rDNA metabarcoding (Supplementary Data 5). All bacterial genera that changed significantly during these experimental infections are reported in Supplementary Data 6. Among them, the most abundant in oysters (more than 4% of the total bacterial communities in at least one sample) (Supplementary Fig. 15) included OTUs from different genera, which increased significantly in the four treatments in which mortalities occurred (Supplementary Fig. 15b, c, d and e). Two of them (*Vibrio* and *Arcobacter*) were common to three out of four treatments (Supplementary Fig. 15b, c and e). These two genera were also found to colonize the recipient oysters in our initial ‘natural’ experimental infection (Fig. 3b). Finally, although chloramphenicol treatment reduced and delayed mortality (Fig. 10b), secondary bacterial infection could still occur involving bacteria from other genera (Supplementary Fig. 15d). Taken together, these results indicate that viral infection is necessary to initiate the infectious process and that opportunistic bacteria are responsible for a secondary infection necessary to complete disease development.



**Figure 10: Rationalized experimental infections demonstrate that OsHV-1 replication is required for bacterial colonization and oyster death.** Experimental infection by OsHV-1 and/or *V. crassostreae* was performed as follows: oyster donors were injected with either  $3.88 \times 10^8$  genomic units of OsHV-1 (Os) or  $5 \times 10^7$  cfu *V. crassostreae* (Vc). **(a-e)** Recipient oysters were injected with poly(I:C) (PIC) or sterile seawater (SW) before exposition to both Vc and Os donors. **(f-j)** Recipients were exposed to both Os and Vc donors in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol in the tanks. **(k-o)** Recipients were exposed to Os or Vc donors. The OsHV-1 DNA load (viral genomic units per ng of total oyster DNA), relative quantification of total bacteria, and total Vibrio and *Vibrio crassostreae* abundance were measured by qPCR. No mortality was observed, and no OsHV-1 DNA was detected in recipient oysters when untreated donors were used as a control. Each dot represents a measure done on a distinct pool of 10 oysters



## DISCUSSION

In this study, we deciphered the complex intra-host interactions underlying the mortality syndrome affecting juveniles of *Crassostrea gigas*, providing a comprehensive view of the pathogenic processes underpinning a disease that has remained incompletely understood until now. The entire sequence of events leading to oyster death was traced and identified.

We showed that infection by the OsHV-1  $\mu$ Var is the first event that occurs during the infectious process and that the intense replication of this virus is a prerequisite for development of the disease. We showed that the immune cells of oysters, the haemocytes, are one of the cell types targeted by the virus. This localization of OsHV-1 in haemocytes during the infectious process has also been recently reported <sup>37</sup>. Notably, infection of haemocytes by OsHV-1 impacted haemocyte physiology and particularly impaired the expression of antimicrobial peptides either through transcriptional regulation or indirectly through the induction of cell death or lysis processes, as previously reported <sup>37</sup>. Following the repression of antibacterial defences, profound changes in oyster-associated microbiota were observed, followed by bacteraemia and mortalities. These results clearly identify OsHV-1 as a necessary actor triggering the disease as a whole.

Bacterial colonization was shown to be the second event necessary to complete the infectious process leading to death in oysters. This finding supports previous studies identifying bacteria as important aetiological agents of the disease <sup>12</sup>. From our histological analysis, gills could be the initial route of bacterial infection in OsHV-1 immune-compromised oysters before bacterial dissemination to the rest of the tissues. Such a scenario is reminiscent of immune suppression by viruses such as HIV and secondary colonization by opportunists <sup>38</sup>. Bacteria of the *Vibrio* genus were associated with the disease, supporting previous studies that identified *V. crassostreae* as an important pathogenic population in the field <sup>21,22</sup>. However, (i) *V. crassostreae* was not required to complete the infectious process leading to oyster death, and (ii) vibrios were not the only bacteria systematically associated with dying oysters. Finally, although chloramphenicol treatments controlling vibrios reduced and delayed mortality, secondary bacterial infection could still occur involving bacteria from other genera. These results clearly showed that the secondary bacterial infection of oysters already immune-compromised by viral infection could be engaged by a series of opportunistic bacteria present in the environment.

The inability of susceptible oysters to control viral replication and further bacterial colonization was associated with a strong, but late, antiviral response. Importantly, the molecular function

*negative regulation of cell death* was highly mobilized concomitantly with the intense replication of the virus in susceptible oysters. The majority of the genes belonging to this function encode endogenous IAPs that were strongly induced in susceptible oysters. Remarkably, intense OsHV-1 replication was also associated with high expression of IAPs of viral origin. Such viral proteins of the BIR family are known to have anti-apoptotic activities favouring viral replication<sup>39</sup>. These results indicate that both endogenous and exogenous anti-apoptotic processes, which are strongly activated in susceptible oysters, may play a key role in the success of OsHV-1 infection<sup>26,40</sup>.

Oyster resistance was associated with an early limitation of viral replication during pathogenesis. Although the genomic determinants of the antiviral response of resistant oysters remain to be identified and validated functionally, antiviral pathways that are known to be necessary for resistance to herpesviruses in vertebrates<sup>41</sup> were shown to be highly induced at early times in resistant oysters only. Genes involved in these pathways could be valuable candidates for future selective breeding. Overall, our data indicate that the time required for an oyster to establish effective immunological control is a key indicator of disease outcome. This finding is in agreement with theoretical predictions indicating that variations in parameters such as pathogen expansion or host response dynamics can affect the outcome of the infection<sup>42</sup>. Recent studies in an insect model of bacterial infection also support this theoretical prediction and identified the early induction of AMP expression as a key determinant of an efficient response against infection<sup>43</sup>.

In conclusion, the present work enabled us to decipher the mechanisms underlying a complex pathosystem affecting juvenile oysters. We found that pathogenesis was caused by multiple infections involving a virus and opportunistic bacteria. Indirect intra-host interactions were shown to occur during pathogenesis, enabling bacterial colonization of oysters that were already immune-compromised by the virus. As in a suprainfection pattern<sup>44</sup>, we found that the bacteria could not infect oysters in the absence of the virus, and we never observed oysters infected by only one of the pathogens. Future studies are needed to validate this suprainfection model and explore the genetic and physiological attributes underlying initial and subsequent colonization waves in oysters. Characterization of this multifactorial disease represents a breakthrough that was made possible by holistic approaches developed by combining ‘natural’ experimental procedures, using oyster biparental families with contrasted susceptibilities to the disease and developing thorough molecular analyses of host responses, the microbiota structure and pathogen

monitoring. This holistic view of diseases as a system provides an exceptionally well-adapted framework for studying the factors governing the progression of infections. We believe that such an integrative and holistic approach could now be applied to a series of multifactorial diseases that affect non-model invertebrate species worldwide.

## METHODS

**Production of biparental oyster families.** In 2015, fifty different biparental *Crassostrea gigas* oyster families were produced from wild seed broodstocks sampled in farming and non-farming areas in two geographic regions (French Mediterranean and Atlantic coasts, Supplementary Table 1). In the Atlantic area, 73 oysters were collected at Logonna Daoulas (farming area) and 70 oysters at Dellec (non-farming area). In the Mediterranean area, 125 oysters were collected in the Thau lagoon (farming area) and 65 at the Vidourle river mouth (non-farming area). In addition, 84 oysters issued from a mass selection programme to enhance their resistance to mortality syndrome were used<sup>28</sup>. All the collected oysters were transferred to the Ifremer facility at Argenton (Brittany, France) between 6 and 8 January 2015 and treated for 6 days with chloramphenicol (8 mg/l).

For gametogenesis induction, animals were held for 8 weeks in 500 l flow-through tanks with seawater enriched with a phytoplankton mixture at a constant temperature of 17°C<sup>13,22</sup>. Seawater was UV-treated and filtered through 10-µm mesh. The daily mixed diet consisted of *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14; 40 µm<sup>3</sup>, 12 pg cell<sup>-1</sup>) and *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3; 80 µm<sup>3</sup>, 25 pg cell<sup>-1</sup>). Once the oysters were reproductively mature, gametes from 91 individuals (46 males, 45 females) were obtained by stripping. Gametes from one male and one female from the same origin were mixed in a 5-l cylinder at a ratio of 50 spermatozooids per oocyte (day 0). The fertilized oocytes completed their embryonic development in 5-l tubes filled with 1-µm-filtered, UV-treated seawater at 21°C for 48 h. The D-larvae (day 2) were then collected and reared in flow-through rearing systems at 25°C<sup>45</sup>. At the end of the pelagic phase (day 15), all the larvae were collected on a 100-µm sieve and allowed to settle on cultch. Post-larvae were maintained in down-welling systems, where they were continuously supplied with enriched seawater until the experiments began. In the larval and post-larval stages, the oysters were fed the same diet as the broodstock at a concentration between 1500-2000 µm<sup>3</sup> µl<sup>-1</sup><sup>45</sup>.

Of the 50 families of oyster seed produced, 3 families from each location were kept, along with 3 other families from the mass selected broodstock, for ‘natural’ experimental infections. These 15 oyster families were maintained under highly controlled biosecured conditions to be sure that no oyster pathogens would interfere with further experiments. The ‘pathogen-free’ status of the animals was confirmed by i) the absence of OsHV-1 DNA detection by qPCR and ii) a low *Vibrio* presence ( $\sim 10 \text{ cfu}^{-1}$  tissue) determined by isolation on selective culture medium (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS)<sup>12</sup>. Oysters were observed to remain free of any abnormal mortality throughout the larvae until the beginning of the ‘natural’ experimental infections.

**‘Natural’ experimental infections.** Our experimental infection protocol consists of a cohabitation between *C. gigas* oysters (‘donors’) carrying the disease and ‘pathogen-free’ *C. gigas* oysters (‘recipients’)<sup>13,22</sup>. ‘Pathogen-free’ oysters used as donors (a mixture of 116-day-old oysters from 15 families, 17,700 g with a mean individual weight of 1.1 g corresponding to a weight of flesh without shell of  $\sim 0.2$  g) were first deployed in a farming area (Logonna Daoulas, (lat 48.335263 – long -4.317922) during the infectious period until the first mortalities occurred (0.01% on 17 July 2015). Then, donor oysters were transferred back to the laboratory and placed in contact with ‘pathogen-free’ recipient oysters in a controlled environment<sup>11-13,22</sup> (Supplementary Fig. 1). The experiment was conducted by placing the same biomass (1,120 g) of donors in cohabitation in 15 independent tanks (500 l), with each containing one of the 15 families (recipient oysters with a mean individual weight of 1.1 g corresponding to a weight of flesh without shell of  $\sim 0.2$  g) acclimatized in these structures for two weeks. In parallel, a control cohabitation experiment was performed under identical conditions but using donors that had not spent time in the farming areas. The ‘natural’ experimental infection began on 17 July 2015 and ended on 31 July 2015. Mortality was monitored in laboratory tanks. When recipients were exposed to the donors (17 July 2015), 2 replicates of 100 ‘pathogen-free’ oysters of each family were placed in the farming area, and mortality was monitored daily.

During the experimental infection, 10 oysters in triplicate were randomly sampled without blinding protocols from each tank and at each time (0, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h and 72 h) of the kinetics. The shell was removed, and pools of 10 oysters were flash frozen in liquid nitrogen. Oyster pools (10 individuals per pool) were ground in liquid nitrogen in 50-ml stainless steel

bowls with 20-mm-diameter grinding balls (Retsch MM400 mill). The obtained powders (stored at -80°C) were then used for extraction of RNA and DNA. In addition, 5 oysters were sampled at 54 h and 78 h and fixed in Davidson fixative<sup>46</sup> for histological analyses.

**Rationalized experimental infections.** The experiments were performed using genetically diversified *C. gigas* oysters (4 months old with a mean individual whole weight of 1 g corresponding to a weight of flesh without shell of ~ 0.2 g) or susceptible biparental family H12<sup>10</sup> *C. gigas* oysters (4 months old with a mean individual whole weight 1.5 g corresponding to a weight of flesh without shell of ~0.3 g). Oysters from these genetic backgrounds were ‘pathogen-free’ and were produced as previously described<sup>13</sup>. For the experiments, the oysters were anesthetized in hexahydrate MgCl<sub>2</sub> (ACROS, 50 g l<sup>-1</sup>, 100 oysters l<sup>-1</sup>) for 2 h<sup>47</sup>. Then, they were injected using a 26-gauge needle attached to a multi-dispensing hand pipette in the adductor muscle to allow spreading into the circulatory system with either 20 µl viral or 40 µl bacterial inoculum. The OsHV-1 inoculum (3.88×10<sup>8</sup> OsHV-1 genomic units µl<sup>-1</sup>) was prepared according to previously described protocols<sup>48</sup>, and injections were performed 24 h before the start of the experiment. *Vibrio crassostreae* J2-9 was grown under agitation at 20°C in Luria-Bertani (LB) + NaCl 0.5 M for 18 h<sup>21</sup>. The culture was centrifuged (1000 g, 10 min, 20°C), suspended in culture medium to an optical density (OD<sub>600</sub>) of 1 and injected (5×10<sup>7</sup> CFU) immediately before the start of the experiment. The rationalized experimental infections were performed by exposing the recipients (*n*=100) to injected donors (*n*=100) in 50-l tanks at 21°C. A control experiment was carried out by placing the non-injected donors in contact with recipient oysters. During each experimental treatment, oysters were sampled at 0 and 72 h, and cumulative mortality was monitored up to 72 h and 157 h for both donors and recipients, respectively. Recipient oyster pools were ground in liquid nitrogen in 50-ml stainless steel bowls with 20-mm-diameter grinding balls (Retsch MM400 mill). The powders obtained (stored at -80°C) were then used for DNA extraction. In one of these rationalized experimental infections, chloramphenicol (8 mg l<sup>-1</sup>) was added to the tank every 2 days to restrict bacterial proliferation. In another experiment, the recipients were treated with poly(I:C), which has been shown to block OsHV-1 replication<sup>36</sup>. In this case, 20 µl poly(I:C) (HMW, InvivoGen, cat. code: tlrl-pic - 1 mg ml<sup>-1</sup>) was injected into the adductor muscle of recipient oysters 24 h before the start of the cohabitation experiment. The experiment with genetically diversified oysters was performed one time. The experiments using

oysters from the H12 family were replicated two times. Three pools of 10 individuals for each experiment were randomly sampled without blinding protocols, and submitted for further molecular analysis.

**Oyster transcriptome analyses.** RNA was extracted from the powdered oysters using the Direct-Zol RNA Miniprep kit (Proteogene) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were checked using a Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific), and their integrity was analysed by capillary electrophoresis on a BioAnalyzer 2100 (Agilent). RNA-seq library construction and sequencing were performed by the Fasteris Company (Switzerland). Directional cDNA libraries were constructed using a TruSeq mRNA Stranded kit (Illumina) and sequenced on a HiSeq in paired-end reads of 2×75 bp. All data treatments were carried out under a local galaxy instance<sup>49</sup>. Phred scores were checked using the Fastq-X toolkit<sup>50</sup> and were higher than 26 over 90% of the read length for all the sequences. All the reads were thus kept for subsequent analyses. Mapping to the *C. gigas* reference genome (assembly version V9<sup>51</sup>) was performed using RNASTAR (Galaxy Version 2.4.0d-2<sup>52</sup>). The HTSeq-count was used to count the number of reads overlapping annotated genes (mode Union) (Galaxy Version v0.6.1)<sup>53</sup>. Finally, the differential gene expression levels were analysed with the DESeq2 R package<sup>54</sup>. Fold changes between each time point of the kinetics and the T0 control condition were considered significant when the adjusted *p*-value (Padj) for multiple testing with the Benjamini-Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR), was <0.05.

Because not all known *C. gigas* antimicrobial peptides (AMPs) were present in the *C. gigas* reference genome (assembly version V9<sup>51</sup>), read counts for all of them were specifically obtained by alignment against a protein database using DIAMOND 0.7.9<sup>55</sup>. The AMP database was prepared by retrieving *C. gigas* sequences from GenBank that were manually inspected to discard irrelevant or incomplete sequences. The reads for each sample/replicate were compared with the database using DIAMOND blastx. Alignments were filtered for the best hit and e-value < 1e-6. Read counts for each AMP were normalized against both the transcript size and the total sequence number for each sample/replicate and used for the differential gene expression analysis with DESeq2.

**Gene ontology annotation and enrichment analysis.** To work with current functional annotations of the *C. gigas* gene set, we performed a *de novo* functional annotation. Blastx comparison against the NR database was performed for the 28,027 genes annotated in the genome, with a maximum number of target hits of 20 and a minimum e-value of 0.001. XML blast result files were loaded onto Blast2GO <sup>56</sup> for GO mapping and annotation with the b2g\_sep13 version of the B2G database. These results were used as inputs for GO enrichment analysis, which was performed using adaptive clustering and a rank-based statistical test (Mann-Whitney U-test combined with adaptive clustering). The R and Perl scripts used <sup>57</sup> can be downloaded [[https://github.com/z0on/GO\\_MWU](https://github.com/z0on/GO_MWU)]. The following parameters were used for adaptive clustering: largest = 0.5; smallest = 10; clusterCutHeight = 0.25. For the continuous value characterization of each gene in the dataset, we used a strategy aiming to take into account both the level of expression and the significance of the differential expression. To combine these two factors, the log2 fold change was attributed to genes that were significantly differentially expressed (adjusted  $p < 0.05$ ), while a zero was attributed to the others. A category was considered enriched with a FDR < 1%. To represent the results synthetically, the intensity of the enrichment was calculated with the following ratios: i) for the up-regulated enriched categories, “number of genes significantly up-regulated in the category/total number of genes in the category”; ii) for the down-regulated enriched categories, “-1 x (number of genes significantly down-regulated in the category /total number of genes in the category)”. These ratios were then displayed on a heat map using the Multiple Experiment Viewer and clustered according to the Pearson correlation <sup>58</sup>.

**Virus transcriptome analyses.** RNA-seq reads that did not align with the *C. gigas* genome were collected using SAMtools <sup>59</sup>. These reads were aligned with the viral genome sequence of OsHV-1 (Refseq NC\_005881.2 <sup>30</sup>) using bowtie2 with single-end global alignment and default parameters <sup>60</sup>. The abundance of viral transcripts was calculated using HTSeq-count <sup>53</sup> and the viral genome GFF3 file. The counts for each ORF were normalized by dividing by the size of the ORF and multiplying by a library normalization factor (calculated as the average library size for all times and controls divided by the library size for the specific time point).  $C = \left( \frac{c_{orf}}{s_{orf}} \right) \times \left( \frac{\bar{L}}{L_i} \right)$ , where  $c_{orf}$  represents the raw counts for the ORF,  $s_{orf}$  represents the size of the ORF,  $\bar{L}$



represents the average reads for all the time points and  $L_i$  corresponds to the number of total reads for the specific time point.

**Quantification of bacteria and viruses.** Quantification of OsHV-1, total 16S rDNA *Vibrio* and *Vibrio crassostreae* was performed using quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were analysed using a Roche LightCycler 480 Real-Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University, France). The total qPCR reaction volume was 1.5  $\mu$ l and consisted of 0.5  $\mu$ l DNA (40 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) and 1  $\mu$ l LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) containing 0.5  $\mu$ M PCR primer (Eurogentec SA). Virus-specific primer pairs targeted a region of the OsHV-1 genome predicted to encode a DNA polymerase catalytic subunit (ORF100, AY509253): Fw-ATTGATGATGTGGATAATCTGTG and Rev-GGTAAATACCATTGGTCTTGTTC<sup>30</sup>. Total bacteria specific primer pairs were the 341F-CCTACGGGNGGCWGCAG and 805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC primers targeting the variable V3V4 loops for bacterial communities<sup>61</sup>. Total *Vibrio* specific primer pairs were Fw-GGCGTAAAGCGCATGCAGGT and Rev-GAAATTCTACCCCCCTCTACAG<sup>62</sup>, and *Vibrio crassostreae*-specific primer pairs were Fw-ATGACCATCCAACAACCCG and Rev-AGCCGTAATTGATACGCACG. A Labcyte Acoustic Automated Liquid Handling Platform (ECHO) was used for pipetting into the 384-well plate (Roche). A LightCycler® 480 Instrument (Roche) was used for qPCR with the following program: enzyme activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 10 s), hybridization (60°C, 20 s) and elongation (72°C, 25 s). A subsequent melting temperature curve of the amplicon was performed to verify the specificity of the amplification. Absolute quantification of viral and bacterial DNA copies were estimated by comparing the observed Cq values to a standard curve of the DP amplification product cloned into the pCR4-TOPO vector for OsHV-1 and from total DNA extraction of *V. crassostreae* J2-9 for total vibrio 16S rDNA. For total bacteria and *V. crassostreae* 16S rDNA, we used the relative quantification calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method<sup>63</sup> with the mean of the measured threshold cycle values of two reference genes (*Cg-BPI*, GenBank: AY165040 and *Cg-actin*, GenBank: AF026063).

**Giemsa staining and *in situ* hybridization.** *Crassostrea gigas* tissues were fixed for 24 h in Davidson fixative<sup>46</sup>. Tissues were embedded in paraffin wax, serially sectioned to a thickness of



5  $\mu\text{m}$  and collected on polylysine-coated slides (performed by Histalim Company, France). To visualize bacteria that had infiltrated the tissues, tissue sections were stained using Giemsa, which coloured the different tissues and cells in shades of pink to purple and most bacteria in deep blue (performed by Histalim Company, France). The presence of OsHV-1 in tissue sections was detected by *in situ* hybridization following a previously published protocol<sup>64</sup>. The slides were hybridized with 5 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  of OsHV-1-specific digoxigenin-labelled (DIG) antisense probes designed based on the C2-C6 fragment of the ORF4 of the OsHV-1 reference genome (GenBank: NC\_005881.2), which is also present in the OsHV-1  $\mu\text{Var}$  sequence. As a negative control, for the specificity assessment of the OsHV-1 probe, the samples were also hybridized with a GFP probe with no homology to the OsHV-1 or *C. gigas* genomes. The primers used for the probe synthesis were as follows: OsHV-1 probe, C2-CTCTTTACCATGAAGATACCCACC and C6-GTGCACGGCTTACCATTTTT; GFP probe, GFP-Fw-ACGTAAACGGCCACAAGTTC and GFP-Rev-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG. After hybridization, the tissues were counter-stained with a solution of Bismark Brown yellow. Haemocyte localization in tissue sections was performed by immunohistology. After dewaxing the tissue sections in xylene followed by rehydration in an ethanol series and distilled water, a heat-induced antigen retrieval procedure was conducted by incubating the sections for 12 min in sodium citrate solution (10 mM, pH 6) in a microwave (800 W). The sections were then incubated at room temperature for 1 h in a 5% non-fat dry milk (NFDm) and 0.1% Triton X100 solution as a blocking agent and permeabilization solution. Immunodetection of the haemocyte-specific protein Cg-EcSOD was performed using a primary antibody produced in-house from mouse ascites<sup>35</sup>. Sections were incubated overnight in a humidified chamber at 4°C in a 1/500 dilution (in PBS-5% NFDm) of the primary antibody and rinsed 3×5 min in TBS (pH 7.4). A 1/5000 dilution of the secondary antibody (goat anti-mouse polyvalent immunoglobulin alkaline phosphatase-conjugated, SIGMA A0162) was then applied for 2 h at room temperature in a humidified chamber, and the sections were rinsed 2×5 min in TBS. Alkaline phosphatase enzymatic activity was revealed by incubating slides in NBT/BCIP solution for 20 min in the dark, and reactions were stopped by thoroughly rinsing the slides in distilled water. As a negative control for specificity assessment of the anti-Cg-EcSOD signal, the sections were incubated with the secondary antibody only. The slides were finally mounted in Dako mounting medium (DAKO S3023). Images were acquired using a Zeiss microscope equipped with a Zeiss colour

camera and managed with ZEN software (Montpellier RIO imaging platform). For *in situ* hybridization, labelling was observed only with the virus-specific probe, and no labelling was detected in the sections treated with the GFP probe (Supplementary Fig. 16). For Cg-EcSOD immunostaining, labelling was observed in sections treated with anti-Cg-EcSOD antibody, and no labelling was observed for slides treated with the secondary antibody only (Supplementary Fig. 17).

**RNA extraction and RT-qPCR analysis.** RNA extraction was performed using Direct-zol<sup>™</sup> RNA MiniPrep according to manufacturer's instructions (Zymo Research). Frozen oyster powder (20 mg) was homogenized in 1 ml TRIzol by vortexing 1 h at 4°C. Prior to extraction, insoluble materials were removed by centrifugation at 12000 g for 10 min at 4°C. The quantification and integrity of the total RNA were checked using a *NanoDrop* spectrophotometer (Thermo Scientific) and 1.5% agarose gel electrophoresis, respectively. Total RNA (300 ng) was reverse-transcribed in 20 µl using Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Amplification and pipetting were performed with a Roche LightCycler 480 and a Labcyte Acoustic Automated Liquid Handling Platform (ECHO), as previously described (see above, Quantification of bacteria and viruses). The total RT-qPCR reaction volume was 1.5 µl and consisted of 0.5 µl of cDNA (dilution 1/6) and 1 µl of LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) containing 0.5 µM of PCR primer (Eurogenetec SA). The amplification efficiency of each primer pair (Supplementary Tables 2 and 3) was validated by serial dilution of a pool of all cDNAs. Related expression was calculated as the threshold cycle (C<sub>q</sub>) values of selected genes minus the mean of the measured threshold cycle (C<sub>q</sub>) values of three constitutively expressed genes (Cg-EF1, Cg-RPL40 and Cg-RPS6).

**Bacterial microbiota analysis.** DNA from powdered oyster tissues was extracted with DNA from the tissue Macherey-Nagel kit (reference 740952.250) according to the manufacturer's protocol. Prior to 90 min of enzymatic lysis in the presence of proteinase K, an additional 12-min mechanical lysis (Retsch MM400 mill) was performed with zirconia/silica beads (BioSpec). DNA concentration and purity were checked with a Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific). For each sample, 16S rDNA amplicon libraries were generated using the 341F-

CCTACGGGNGGCWGCAG and 805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC primers targeting the variable V3V4 loops for bacterial communities<sup>61</sup>. Paired-end sequencing with a 250-bp read length was performed at McGill University (Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada) on a MiSeq system (Illumina) using v2 chemistry according to the manufacturer's protocol. The FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented on a galaxy instance [<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>] was used for data processing<sup>65</sup>. In brief, paired reads were merged using FLASH<sup>66</sup>. After denoising and primer/adaptor removal with cutadapt<sup>67</sup>, clustering was performed using SWARM, which uses a novel clustering algorithm with a threshold (distance = 3) corresponding to the maximum number of differences between two OTUs<sup>68</sup>. Chimeras were removed using VSEARCH<sup>69</sup>. We filtered out the dataset for singletons and performed an affiliation using Blast+ against the Silva 16S rDNA database (release 128, Sept 2016) to produce an OTU and affiliation table in the standard BIOM format. Rarefaction curves of species richness were produced using the R package and the rarefy\_even\_depth and ggrare functions<sup>70</sup>. We used phyloseq to obtain relative abundances at different taxonomic ranks (from genus to phylum) (tax\_glom function). In our analyses, we only kept taxa that had a true annotation for each corresponding taxonomic rank (from genus to phylum).

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using R v3.3.1 (R: a language and environment for statistical computing, 2008; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.R-project.org>]). Survival curves were used to analyse mortality kinetics, and the non-parametric Kaplan-Meier test was used to estimate log-rank values for comparing conditions. Principal coordinate analyses (PCoA, {phyloseq}) were computed to represent dissimilarities between samples using the Bray-Curtis distance matrix (ordinate, {phyloseq}). Multivariate homogeneity of group dispersions was tested between bacterial assemblages of S<sub>F11</sub> and R<sub>F21</sub> using 999 permutations (permutest, betadisper, {vegan}). To identify candidate taxa with changes in abundances between the initial and the final time points of the experiment, we used DESeq2 (DESeq<sup>54</sup>) from the OTUs to the higher taxonomic ranks. Heatmaps of significant genera were computed using relative abundances and the heatmap.2 function ({gplots}). We performed one-way ANOVA or non-parametric Kruskal-Wallis tests when the normality of residuals was rejected (Shapiro test) to compare alpha

diversity metrics for bacterial microbiota, along with OsHV-1 (RNA and DNA level) and bacterial absolute abundances over the experiment after logarithmic transformations. When the ANOVA or Kruskal-Wallis tests were significant, we then computed pairwise comparisons between group levels (post-hoc analyses) with Bonferroni corrections for multiple testing using the pairwise t-test and the Dunn test, respectively. For all analyses, the threshold significance level was set at 0.05.

**Data availability.** RNAseq data and amplicon sequences for microbiota analysis have been made available through the SRA database (BioProject accession number PRJNA423079). RNAseq data are available under SRA accession SUB3540476 with BioSample accession SUB3540209. Amplicon sequences for microbiota analysis during ‘natural’ experimental infections are available under SRA accession SUB4485718 with BioSample accession SUB4485760. Amplicon sequences for microbiota analysis during rationalized experimental infections are available under SRA accession SUB3614976 with BioSample accession SUB3589699. Other data analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. Complementary information is available from the corresponding authors on reasonable request.

## REFERENCES

- 1 Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1255957, (2015).
- 2 Bourne, D. G. *et al.* Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol* **17**, 554-562, (2009).
- 3 Guo, X. & Ford, S. E. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **371**, (2016).
- 4 FAO. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Species Fact Sheets-Food and Agriculture Organization of the United Nations*, (2014).
- 5 Samain, J.-F. & Mc Combie, H. *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. The MOREST project.* 400 p. (QUAE ed., 2008).
- 6 EFSA, P. o. A. H. W. Oyster mortality. *EFSA Journal* **13**, 4122-n/a, (2015).
- 7 Paul-Pont, I., Dhand, N. K. & Whittington, R. J. Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **412**, 202-214, (2013).
- 8 Barbosa Solomieu, V., Renault, T. & Travers, M. A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol* **131**, 2-10, (2015).
- 9 Pernet, F. *et al.* Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquacult Env Interac* **2**, 215-237, (2012).

- 10 Azema, P. *et al.* Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet Sel Evol* **49**, 23, (2017).
- 11 Le Roux, F., Wegner, K. M. & Polz, M. F. Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends Microbiol* **24**, 568-580, (2016).
- 12 Petton, B. *et al.* *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* **6**, 686, (2015).
- 13 Petton, B., Pernet, F., Robert, R. & Boudry, P. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquacult Env Interac* **3**, 257-273, (2013).
- 14 Segarra, A. *et al.* Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* **153**, 92-99, (2010).
- 15 Martenot, C., Oden, E., Travaille, E., Malas, J. P. & Houssin, M. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Res* **160**, 25-31, (2011).
- 16 Renault, T. *et al.* Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *J Virol* **86**, 5942-5947, (2012).
- 17 Peeler, E. J. *et al.* Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 muVar in the Republic of Ireland in 2009. *Prev Vet Med* **105**, 136-143, (2012).
- 18 Lynch, S. A., Carlsson, J., Reilly, A. O., Cotter, E. & Culloty, S. C. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* **139**, 1526-1532, (2012).
- 19 Abbadi, M. *et al.* Identification of a newly described OsHV-1 microvar from the North Adriatic Sea (Italy). *J Gen Virol* **99**, 693-703, (2018).
- 20 Burioli, E. A. V., Prearo, M. & Houssin, M. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 microVar isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology* **509**, 239-251, (2017).
- 21 Lemire, A. *et al.* Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME J* **9**, 1523-1531, (2015).
- 22 Bruto, M. *et al.* *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J* **11**, 1043-1052, (2017).
- 23 Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J. & Wegner, K. M. The Role of Tissue-specific Microbiota in Initial Establishment Success of Pacific oysters. *Environ Microbiol*, (2015).
- 24 Lokmer, A. & Mathias Wegner, K. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J* **9**, 670-682, (2015).
- 25 Wendling, C. C. & Wegner, K. M. Adaptation to enemy shifts: rapid resistance evolution to local *Vibrio* spp. in invasive Pacific oysters. *Proc Biol Sci* **282**, 20142244, (2015).
- 26 Segarra, A. *et al.* Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet Res* **45**, 103, (2014).
- 27 He, Y. *et al.* Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol* **46**, 131-144, (2015).
- 28 Degremont, L., Nourry, M. & Maurouard, E. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture* **446**, 111-121, (2015).
- 29 Le Roux, F. Diagnosis of vibriosis in the era of genomics: lessons from invertebrates. *Scientific and Technical Review-OIE (World Organisation for Animal Health)* **35**, 259-269, (2016).
- 30 Davison, A. J. *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**, 41-53, (2005).

- 31 Renault, T. *et al.* Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens. *Vet Res* **45**, 3, (2014).
- 32 Renault, T., Bouquet, A. L., Maurice, J. T., Lupo, C. & Blachier, P. Ostreid herpesvirus 1 infection among Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, spat: virus replication and circulation related to water temperature prior the onset of mortality. *Appl Environ Microbiol*, (2014).
- 33 Bachere, E. *et al.* The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish Shellfish Immunol* **46**, 50-64, (2015).
- 34 Schmitt, P. *et al.* The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* **3**, 160, (2012).
- 35 Gonzalez, M. *et al.* Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1089-1097, (2005).
- 36 Lafont, M. *et al.* Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Sci Rep* **7**, 13143, (2017).
- 37 Martenot, C., Gervais, O., Chollet, B., Houssin, M. & Renault, T. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *Plos One* **12**, e0177448, (2017).
- 38 Yang, L. *et al.* HIV-induced immunosuppression is associated with colonization of the proximal gut by environmental bacteria. *AIDS* **30**, 19-29, (2016).
- 39 Miller, L. K. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* **9**, 323-328, (1999).
- 40 Green, T. J., Rolland, J. L., Vergnes, A., Raftos, D. & Montagnani, C. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. *Fish Shellfish Immunol* **47**, 435-443, (2015).
- 41 Gao, F. X. *et al.* Distinct herpesvirus resistances and immune responses of three gynogenetic clones of gibel carp revealed by comprehensive transcriptomes. *BMC Genomics* **18**, 561, (2017).
- 42 Alizon, S., Luciani, F. & Regoes, R. R. Epidemiological and clinical consequences of within-host evolution. *Trends Microbiol* **19**, 24-32, (2011).
- 43 Duneau, D. *et al.* Stochastic variation in the initial phase of bacterial infection predicts the probability of survival in *D. melanogaster*. *Elife* **6**, (2017).
- 44 Sofonea, M. T., Alizon, S. & Michalakakis, Y. Exposing the diversity of multiple infection patterns. *J Theor Biol* **419**, 278-289, (2017).
- 45 Rico-Villa, B., Pouvreau, S. & Robert, R. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **287**, 395-401, (2009).
- 46 Gonzalez, M. *et al.* Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17759-17764, (2007).
- 47 Suquet, M. *et al.* Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* **22**, 29-34, (2009).
- 48 Schikorski, D. *et al.* Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet Res* **42**, 27, (2011).
- 49 Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. & Galaxy, T. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* **11**, R86, (2010).
- 50 Blankenberg, D. *et al.* Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics* **26**, 1783-1785, (2010).
- 51 Zhang, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49-54, (2012).
- 52 Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21, (2013).



- 53 Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-169, (2015).
- 54 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550, (2014).
- 55 Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* **12**, 59-60, (2015).
- 56 Conesa, A. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674-3676, (2005).
- 57 Wright, R. M., Aglyamova, G. V., Meyer, E. & Matz, M. V. Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus*. *BMC Genomics* **16**, 371, (2015).
- 58 Saeed, A. I. *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374-378, (2003).
- 59 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079, (2009).
- 60 Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-359, (2012).
- 61 Klindworth, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, e1, (2013).
- 62 Mansergh, S. & Zehr, J. P. *Vibrio* diversity and dynamics in the Monterey Bay upwelling region. *Front Microbiol* **5**, 48, (2014).
- 63 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45, (2001).
- 64 Bueno, R., Perrott, M., Dunowska, M., Brosnahan, C. & Johnston, C. In situ hybridization and histopathological observations during ostreid herpesvirus-1-associated mortalities in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **122**, 43-55, (2016).
- 65 Escudie, F. *et al.* FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **34**, 1287-1294, (2018).
- 66 Magoc, T. & Salzberg, S. L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**, 2957-2963, (2011).
- 67 Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *2011* **17**, (2011).
- 68 Mahe, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C. & Dunthorn, M. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* **2**, e593, (2014).
- 69 Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahe, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **4**, e2584, (2016).
- 70 McMurdie, P. J. & Holmes, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *Plos One* **8**, e61217, (2013).

## END NOTES

**Acknowledgements.** We warmly thank the staff of the Ifremer stations of Argenton (LPI, PFOM) and Sète (LER), and the Comité Régional de Conchyliculture de Méditerranée (CRCM) for technical support in the collection of the oyster genitors and reproduction. We also thank Fabrice Pernet, Marie-Agnès Travers, David Mouillot, Marion Richard and Franck Lagarde for fruitful discussions. The authors are grateful to Philippe Clair from the qPHD

platform/Montpellier genomix for useful advice and Yannick Labreuche for the *Vibrio crassostreae*-specific primers. This work, through the use of the GENSEQ platform [<http://www.labex-cemeb.org/fr/genomique-environnementale-2>] from the labEx CeMEB, benefited from the support of the National Research Agency under the ‘Investissements d’avenir’ program (reference ANR-10-LABX-04-01). The authors also thank the Montpellier RIO imaging platform (<https://www.mri.cnrs.fr>). The present study was supported by the ANR project DECIPHER (ANR-14-CE19-0023), by the EU funded project VIVALDI (H2020 program, n°678589) and by Ifremer, CNRS, Université de Montpellier and Université de Perpignan *via* Domitia.

### **Author contributions**

J.D.L., A.L., B.P., C.M., J.M.E., P.H., L.D., M.L., A.V., N.F., T.R., M.L., A.P., D.R., B.M., M.A.B., Y.G. and G.M. performed oyster experiments. J.D.L., A.L., E.T., C.C.L., M.C., Y.G. and G.M. performed microbiota analyses. J.D.L., A.L., E.T., C.M., J.V.D., C.C.H., R.G., J.M.E., Y.G. and G.M. performed RNA-seq analyses. J.D.L., A.L., A.D., A.V. and C.M. performed qPCR analyses. C.M., G.M.C. and A.V. performed histology analyses. J.D.L., B.P., P.B., D.D.G. and G.M. designed experiments. J.D.L., A.L., B.P., F.L.R., D.D.G., Y.G. and G.M. interpreted results. J.D.L., A.L., F.L.R., D.D.G., Y.G. and G.M. wrote the paper. All the authors have revised and approved the manuscript submission.

**Conflict of interest statement.** The manuscript has been seen and approved by all of the authors. There are no conflicts of interest. The material represents an original result and has not been submitted for publication elsewhere.



## Chapitre 2 : Diversité du mécanisme de pathogénèse des juvéniles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*.

### Introduction et principaux résultats

L'objet du second chapitre de ma thèse est d'étudier la diversité du mécanisme de pathogénèse précédemment décrit, dans un autre environnement infectieux. La problématique de ce second chapitre est en effet, de savoir si la maladie des juvéniles d'huîtres (POMS) suit un mécanisme qui est conservé quel que soit l'environnement ou si les huîtres sont affectées par des maladies impliquant des mécanismes différents en fonction des environnements infectieux. Pour répondre à cette problématique nous avons comparé la séquence des événements dans deux environnements infectieux : atlantique et méditerranée. Pour cela nous avons analysé la dynamique du microbiote en incluant les agents pathogènes sur trois familles aux phénotypes sensibles et trois familles aux phénotypes résistants de différents génotypes et ceci dans les deux environnements infectieux.

Nous avons montré que la séquence des événements est la même dans les deux environnements infectieux : une réplication virale intense a été observée chez les huîtres sensibles, suivie d'une déstabilisation du microbiote et d'une infection bactérienne secondaire par des bactéries opportunistes conduisant à la mort des huîtres.

De plus, cette étude nous a permis de caractériser plus précisément l'infection bactérienne secondaire. En effet, nous avons mis en évidence la présence d'un consortium bactérien commun aux huîtres sensibles quel que soit l'environnement infectieux. Parmi ces bactéries nous avons identifié les genres *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Prolixibacter* et *Psychrilyobacter*. Ainsi, les bactéries du genre *Vibrio* ne sont pas les seules bactéries impliquées dans l'infection bactérienne secondaire. Nous avons également observé des différences quantitatives et qualitatives au niveau des genres bactériens colonisateurs des huîtres sensibles entre les génotypes et les environnements. Ceci suggère que la colonisation bactérienne peut être influencée par les facteurs génétiques des huîtres. Ainsi, les résultats obtenus dans la présente étude ont permis de démontrer qu'un certain nombre de bactéries pourraient être responsable de l'infection bactérienne secondaire consécutive à l'état d'immunosuppression induit par l'infection

virale. Ces résultats suggèrent qu'une grande variété de bactéries possède des capacités permettant de coloniser et de tuer les huîtres immunodéprimées.

L'ensemble de ce travail nous a donc permis de généraliser le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas* décrit dans le chapitre 1 à un autre environnement infectieux. Nous avons également pu affiner la caractérisation de l'infection bactérienne secondaire grâce à l'identification d'un consortium bactérien colonisateur commun à l'ensemble des huîtres sensibles dans les différents environnements infectieux.

L'ensemble du travail qui a été réalisé est présenté dans l'article 2 : « *The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments* ». Les supplementary files sont présentés en annexe 2.

Article 2: « The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments ».

**The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments.**

Aude Lucasson, Bruno Petton, Camille Clerissi, Eve Toulza, Jean-Michel Escoubas, Philippe Haffner, Lionel Dégremont, Yannick Gueguen, Julien de Lorgeril, Guillaume Mitta.

**ABSTRACT**

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the main invertebrate species exploited in the world. Since 2008, oyster juveniles are confronted to a mortality syndrome called POMS whose etiology is complex and mechanisms remained incompletely understood until recently. De Lorgeril and collaborators (De lorgeril et al. 2018) demonstrated that the disease is caused by a multiple infection whose initial and necessary step is the infection of oyster haemocytes by a *herpesvirus* called OsHV-1. Viral replication leads to an immune-compromised state of the host followed by a secondary infection caused by opportunistic bacteria. In order to evaluate if this mechanism of POMS can be generalized to other infectious environments, we compared in the present work the pathogenesis in oysters with distinct genetic backgrounds confronted to another infectious environment. We show that the mechanism of POMS is conserved in this new infectious environment. This study also revealed that strains from five genera (*Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Proxilibacter* and *Psychrilyobacter*) are systematically associated to the secondary bacterial infection independently of the environment and the oyster genotype. Future studies will be needed to explore the genetic and physiological attributes underlying oyster colonization by these opportunistic pathogens.

**INTRODUCTION**

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the main invertebrate species exploited in the world. Introduced to France in the 1970s, *C. gigas* suffers mass mortalities due to a multifactorial disease involving complex interactions between host, environment and pathogens (Samain & Mc Combie 2008). The severity of these mortality outbreaks has dramatically increased since 2008. They mainly affect juvenile stages decimating up to 100 % of young oysters in French farms (EFSA 2015). Over the past years, this mortality syndrome, called Pacific Oyster Mortality syndrome (POMS) (Paul-pont et al. 2013) has become panzootic, being observed in all coastal regions of France and numerous other countries worldwide (Barbosa Solomieu et al. 2015; EFSA 2015).

This worrying situation has promoted an important research effort that revealed a series of factors contributing to the disease including infectious agents interacting with seawater temperature and oyster genetic (Azéma et al. 2017; Le Roux et al. 2016; Pernet et al. 2012; Petton et al. 2015; Petton et al. 2013; Segarra et al. 2010; EFSA 2015). The dramatic increase of mortalities since 2008 coincided with the recurrent detection of *Ostreid herpesvirus* variants in moribund oysters in France (Martenot et al. 2011; Renault et al. 2012; Segarra et al. 2010) and worldwide (Abbadi et al. 2018; Burioli et al. 2017; Burioli et al. 2016; Lynch et al. 2012; Peeler et al. 2012; EFSA 2015). However, the involvement of other etiological agents was suspected. In particular, strains assigned to the genus *Vibrio* were shown to be associated with the disease (Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2015). Recent studies have also proposed that the stability of the natural bacterial microbiota, abundantly present in healthy oysters, influences their resistance to stress or invasion by pathogens (Lokmer et al. 2016; Lokmer & Mathias Wegner 2015; Wegner et al. 2013). In the majority of the studies, the role of host genetics, pathogens, and opportunistic and commensal microbes have been studied independently and the experimental infections by injection were not ecologically realistic (Green et al. 2015; He et al. 2015; Rosani & Venier 2017; Segarra et al. 2014; Wendling & Mathias Wegner 2015; Azéma et al. 2017; Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2015; Lokmer & Mathias Wegner 2015; Wegner et al. 2013). Recently, the transcriptional responses of oysters and the dynamics of their associated microorganisms were concomitantly characterized after exposure to one infectious environment (French Atlantic coast) using an experimental infection system that reproduced the natural route of infection in resistant and susceptible families of oysters (De longeril et al. 2018). This holistic approach allowed to establish that OsHV-1  $\mu$ var replication in hemocytes (immunocompetent cells) is the initial step of the infectious process leading to an immune-compromised state of the host, which evolved toward subsequent bacteremia necessary to complete the infectious process leading to oyster death (De longeril et al. 2018).

This pathogenesis scheme was established using a specific infectious environment and a remaining question is the validity of this scheme in other infectious environments. We address this question in the present study. We compare viral replication, microbiota destabilization and bacteria colonization in oyster biparental families displaying different phenotypes (resistant and susceptible) and confronted to two different infectious environments (Atlantic and Mediterranean). We showed that the sequence of events is the same in both infectious environments: an intense viral replication occurred in susceptible

oysters followed by a microbiota destabilization and a secondary bacterial infection by opportunistic bacterial pathogens leading to oyster death.

## **METHODS**

### **Production of biparental oyster families and “natural” experimental infections**

The different oyster biparental families were produced as previously described (De longeril et al. 2018). Six families F<sub>11</sub>, F<sub>14</sub>, F<sub>15</sub>, F<sub>21</sub>, F<sub>23</sub> and F<sub>48</sub> were used in the present study. These six oyster families were maintained under highly controlled bio-secured conditions to be sure that no oyster pathogens will interfere with further experiments. The “pathogen-free” status of animals was confirmed by i) the absence of OsHV-1 DNA detection by qPCR and ii) a low *Vibrio* presence (~10 cfu/g tissue) determined by isolation on selective culture medium (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS) (Petton et al. 2015). Oysters were observed to remain free of any abnormal mortality throughout the larvae until the beginning of the experimental infections. Our experimental infection protocol consists in a cohabitation between oysters, called “donors”, carrying the disease and “pathogen-free” oysters called “recipients” (Bruto et al. 2017; Petton et al. 2013). For experiments performed with the Atlantic infectious environment, the details are given in (De longeril et al. 2018). For the Mediterranean infectious environment, “Pathogen-free” oysters used as donors (7 months-old oysters from the 15 families produced in (De longeril et al. 2018), mean individual whole weight 1.73 g +/- 0.186 g, corresponding to a weight of flesh without shell of ~ 0.45 g) were first deployed in a Mediterranean farming area (Thau lagoon, (lat 43.418736, long 3.622620)) during the infectious period until the first mortalities occurred (< 1% on September 21<sup>th</sup> 2015, 17 days of exposition). Then, donor oysters were brought back to the laboratory and put into contact with “pathogen-free” recipient oysters from the different families in a controlled environment as previously described (Bruto et al. 2017; Le Roux et al. 2016; Petton et al. 2015; Petton et al. 2013). The experiments were conducted by putting the same biomass (1,767 g) of donors in cohabitation in six independent tanks each containing one of the six families mentioned above (recipient oysters) acclimatized in these structures for two weeks. In parallel, a control cohabitation experiment was performed under identical conditions but using donors that had not spent time in the farming areas. The experimental infection started on September 21<sup>th</sup> 2015 and ended on 6<sup>st</sup> October 2015. In the laboratory tanks, mortalities were monitored. When recipients were exposed to the donors (September 21<sup>th</sup> 2015), two replicates of 100 “pathogen-free” oysters of each family were placed in the farming area and mortalities were monitored daily.

During the experimental infection, 10 oysters in triplicate were sampled from each tank and each time (0, 6 h, 12 h, 24h, 48 h, 60 h and 72h) of the kinetics. The shell was removed and the pools of 10 oysters were flash frozen in liquid nitrogen. Oyster pools (10 individuals per pool) were ground in liquid nitrogen in 50 ml stainless steel bowls with 20 mm diameter grinding balls (Retsch MM400 mill). The powders obtained (stored at -80°C) were then used for extractions of RNA and DNA.

**Total bacteria and OsHV-1 quantifications.** Quantifications of OsHV-1 and total 16S rDNA bacteria were performed using quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were analyzed using a Roche LightCycler 480 Real-Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University, France). The total qPCR reaction volume was 1.5 µl and consisted of 0.5 µl DNA (40 ng/µl), 0.75 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) and 0.25 µl of both PCR primers (0.5 µM of each, Eurogenetec SA). Virus-specific primer pairs targeted a region of the OsHV-1 genome predicted to encode a DNA polymerase catalytic subunit (ORF100, AY509253): Fw-ATTGATGATGTGGATAATCTGTG and Rev-GGTAAATACCATTTGGTCTTGTTC (Davison et al. 2005). Total bacteria specific primer pairs were the 341F-CCTACGGGNGGCWGCAG and 805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC primers targeting the V3V4 loops of the 16S rDNA (Klindworth et al. 2013). A Labcyte Acoustic Automated Liquid Handling Platform (ECHO) was used for pipetting into the 384 well-plate (Roche). A LightCycler® 480 Instrument (Roche) was used for qPCR with the following program: enzyme activation of 95°C for 10 min followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 10 s), hybridization (60°C, 20 s) and elongation (72°C, 25 s). A subsequent melting temperature curve of the amplicon was performed to verify the specificity of the amplification. Absolute quantification of virus was estimated by comparing the observed Cq values to a standard curve of the OsHV-1 DP amplification product cloned into the pCR4-TOPO vector. For total bacteria, we used relative quantification calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method (Pfaffl 2001) using the mean of the measured threshold cycle values of two reference genes (*Cg-bpi*, GenBank: AY165040 and *Cg-actin*, GenBank: AF026063).

**Identification of OsHV-1 variant by RNAseq analyses.** RNA was extracted from the powdered oysters (*S<sub>F11</sub>* family) using the Direct-Zol RNA Miniprep kit (Proteogene) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and purity were checked using a Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific), and their integrity was analysed by

capillary electrophoresis on a BioAnalyzer 2100 (Agilent). RNA-seq library construction and sequencing were performed by the Fasteris Company (Switzerland). Directional cDNA libraries were constructed using a TruSeq mRNA Stranded kit (Illumina) and sequenced on a HiSeq in paired-end reads of 2×75 bp. All data treatments were carried out under a local galaxy instance (Goecks et al. 2010). Phred scores were checked using the Fastq-X toolkit (Blankenberg et al. 2010) and were higher than 26 over 90% of the read length for all the sequences. All the reads were thus kept for subsequent analyses. Mapping to the *C. gigas* reference genome (assembly version V9, (Wang et al. 2012)) was performed using RNASTAR (Galaxy Version 496 2.4.0d-2 (Dobin et al. 2013)). For sequence analyses of OsHV-1, RNA-seq reads that did not align with the *C. gigas* genome were collected using SAMtools (Li et al. 2009). These reads were aligned with the viral genome sequence of OsHV-1 (Refseq NC\_005881.2 (Davison et al. 2005)) using bowtie2 with single-end global alignment and default parameters (Langmead & Salzberg 2012).

**Bacterial microbiota analysis.** DNA from powdered oyster tissues was extracted with the DNA from tissue Macherey-Nagel kit (reference 740952.250) according to the manufacturer's protocol. Before the 90 min enzymatic lysis in the presence of proteinase K, an additional 12 min mechanical lysis (Retsch MM400 mill) with zirconia/silica beads (BioSpec), was performed. DNA concentration and purity were checked with Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific). For each sample, 16S rDNA amplicon libraries were generated using the 341F-CCTACGGGNGGCWGCAG and 805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC primers targeting the variable V3V4 loops for bacterial communities (Klindworth et al. 2013). Paired-end sequencing with 250 bp read length was performed at the McGill University (Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada) on a MiSeq system (Illumina) using v2 chemistry according to the manufacturer's protocol. [Document10](#) The FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented on a galaxy instance (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) was used for data processing (Escudie et al. 2017). In brief, paired reads were merged using FLASH (Magoc & Salzberg 2011). After denoising and primer/adaptor removal with cutadapt (Martin 2011), Clustering was done using SWARM which uses a novel clustering algorithm with a threshold (distance =3) which correspond to the maximum number of difference between two OTUs (Mahe et al. 2014). Chimeras were removed using VSEARCH (Rognes et al. 2016). We filtered out the dataset for singletons and performed affiliation using Blast+ against the Silva 16S rDNA database (release 128, Sept 2016) to produce an OTU and



affiliation table in standard BIOM format. Rarefaction curves of species richness were produced using the R package, and the `rarefy_even_depth` and `ggrare` functions (McMurdie & Holmes 2013). We used `phyloseq` to obtain relative abundances at different taxonomic ranks (from genus to phylum) (`tax_glom` function). In our analyses, we only kept taxa having a true annotation for each corresponding taxonomic rank (from genus to phylum).

**Statistical analyses.** Statistical analyses were done using R v3.3.1 (R: a language and environment for statistical computing, 2008; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.R-project.org>]). Survival curves were used to analyze mortality kinetics and the non-parametric Kaplan-Meier test was used to estimate log-rank values for comparing conditions. Principal coordinate analyses (PCoA, `{phyloseq}`) were computed to represent dissimilarities between samples using Bray-Curtis distance matrix (`ordinate`, `{phyloseq}`). Multivariate homogeneity of group dispersions were tested between bacterial assemblages of the six oyster families using 999 permutations (`permutest`, `betadisper`, `{vegan}`). In order to identify candidate taxa whose abundances changed between the initial and the final time points of the experiment, we used DESeq2 (DESeq, (Love et al. 2014)) from the OTUs to the higher taxonomic ranks. Heatmaps of significant genera were computed using relative abundances and the `heatmap.2` function (`{gplots}`). We performed non-parametric Mann Whitney test to compare OsHV-1 DNA level, total bacteria level and alpha diversity index (Chao1 and Shannon).

**Data availability.** Microbiota and RNAseq sequences will be made available through the SRA database (in progress). Other data analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. Complementary information is available from the corresponding authors on reasonable request.

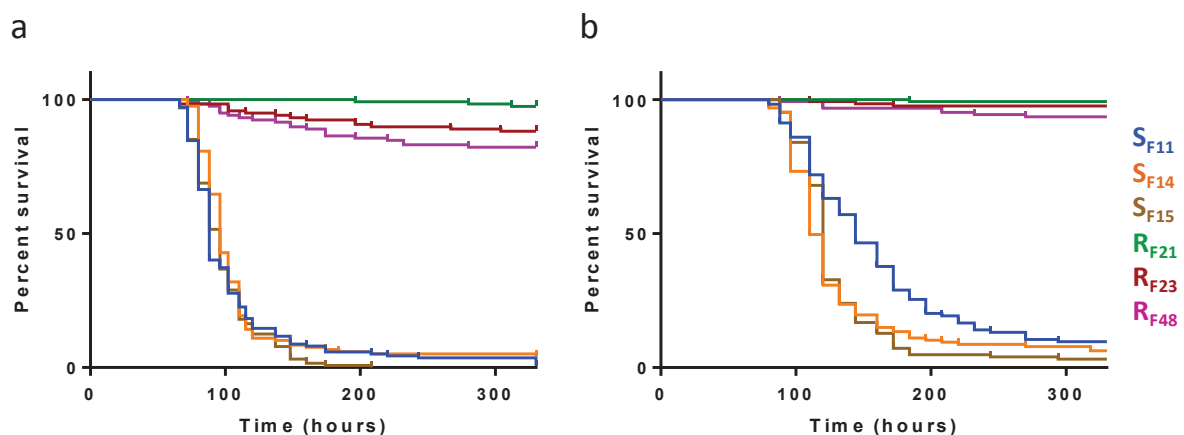
## RESULTS

### Oysters of the same genotype displayed the same phenotype in Atlantic and Mediterranean infectious environments

In a previous study, the juvenile offspring of the 15 biparental families were subjected to an experimental infection mimicking disease transmission in the wild (Petton et al. 2015; Petton et al. 2013). Confronted to an Atlantic infectious environment, high variability in the dynamics of mortalities and percentages of survival were observed among families (De longeril et al. 2018). Three of them (F11, F14 and F15) were highly susceptible and three

other families (F21, F23 and F48) were highly resistant (**Figure 1a**). At the end of the experiment (330 h), less than 4% of susceptible oysters had survived. In contrast, more than 82% of resistant oysters survived when exposed to the same Atlantic infectious environment. In order to evaluate the effect of another infectious environment, we applied exactly the same protocol on the same oyster families confronted to a Mediterranean infectious environment. The results are shown in **figure 1b**. Again the F11, F14 and F15 families which present survival rate inferior to 5% can be considered as susceptible and the survival rate of F21, F23 and F48 is superior to 82% making them resistant to the disease. The survival rates of oyster families were also measured concomitantly in a batch of oysters left in Mediterranean oyster farms during *in situ* mortality and they showed similar phenotypes with survival rates inferior to 7% and superior to 88% after 384 h of exposure for susceptible and resistant families, respectively.

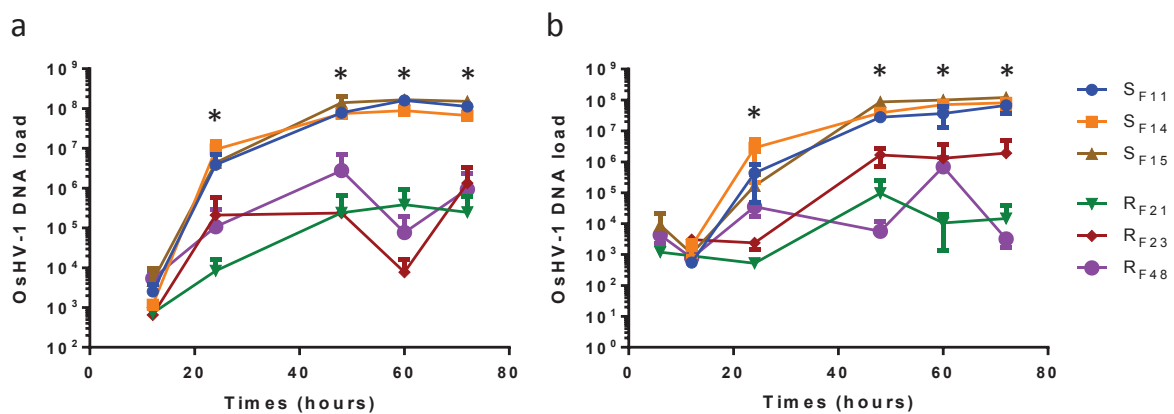
In conclusion, oyster of the same genetic backgrounds displayed the same phenotypes (resistance/susceptibility) when confronted to two different infectious environments. F11, F14 and F15 are considered as susceptible ( $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ ) and F21, F23 and F48 are considered as resistant ( $R_{F21}$ ,  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$ ). Thereafter, the dynamics of the disease in these different families was investigated by molecular analyses.



**Figure 1: Kaplan-Meier survival curves of oyster biparental families confronted to two different infectious environments.** Survival curves for (a) Atlantic and (b) Mediterranean infectious environments. The panel (a) corresponds to data published in (De Iorgeril et al. 2018). These published data are shown to allow the comparison of the phenotypes between both infectious environments.

## OsHV-1 $\mu$ Var infection occurs early during the infectious process independently of the infectious environment

OsHV-1 load was monitored in susceptible and resistant oyster families over the Mediterranean experimental infection using qPCR. As evidenced in experimental infections developed in the Atlantic infectious environment ((De longeril et al. 2018), **Figure 2a**), OsHV-1 DNA was detected in families of both phenotypes early after the exposure to the Mediterranean infectious environment (**Figure 2b**). Nevertheless, very intense replication of the virus occurred in susceptible oysters only with DNA levels 2 to 3 log higher than in resistant oysters after 24 h of exposure (**Figure 2**). In susceptible oysters, the maximum viral load was reached at 48h and remained stable until 72h in both infectious environments (**Figure 2**). On the contrary in resistant oysters the viral load remained low all along the kinetic (**Figure 2**). In order to identify the OsHV-1 variant implicated in the Mediterranean experiment, we have performed an RNAseq analysis in the susceptible oyster family  $S_{F11}$  at the end of the Mediterranean experimental infection (72h post infection). As found in the Atlantic experimental infection (De longeril et al. 2018), the virus involved is the OsHV-1  $\mu$ Var. Indeed, alignment of the illumina reads to the OSHV-1 genome (Davison et al. 2005) revealed the characteristics associated to an OsHV-1  $\mu$ Var variant (deletions of ORF36, ORF37, a part of ORF38, an adenosine upstream of ORF43 and a 12nt region in the microsatellite locus H10) (Renault et al. 2014; Burioli et al. 2017).

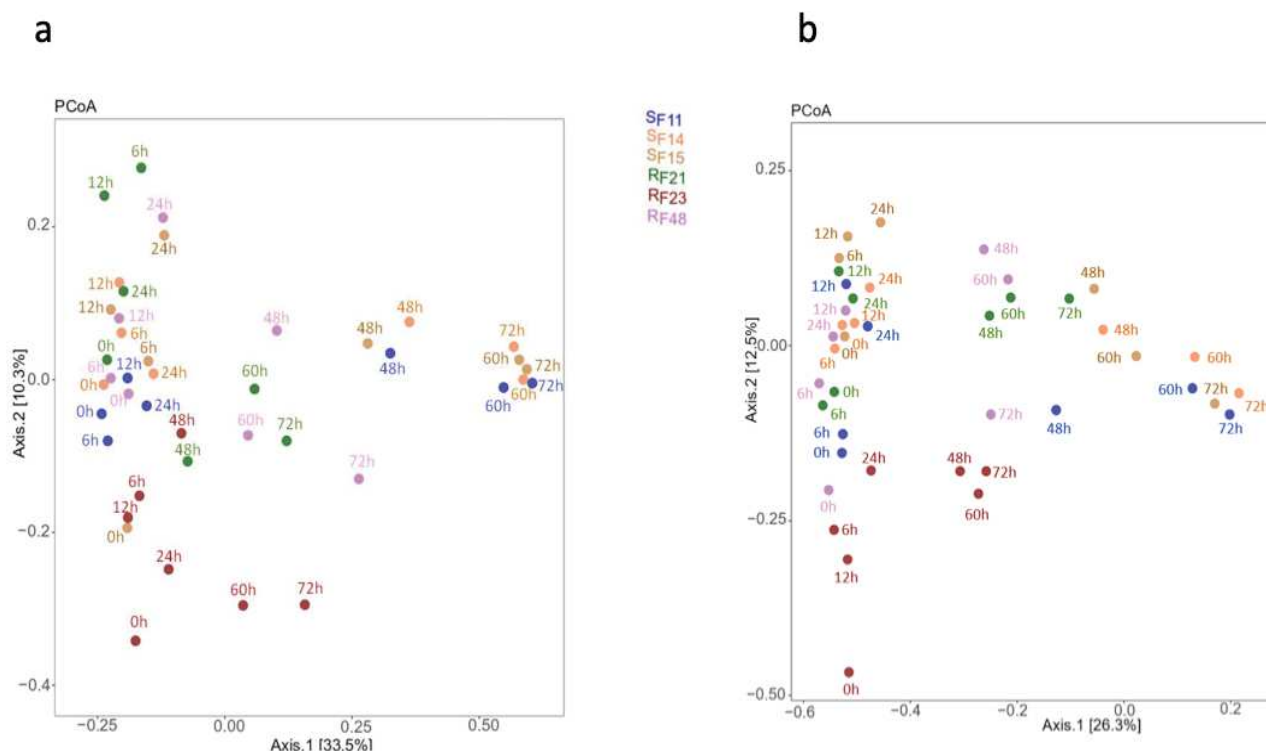


**Figure 2: Early and intense replication of OsHV-1  $\mu$ Var in susceptible oysters in both infectious environments.** OsHV-1 load was quantified by qPCR and expressed as Viral Genomic Units per ng of oyster DNA, during (a) Atlantic and (b) Mediterranean experimental infections. The panel (a) was extracted from (De longeril et al. 2018). These published data are shown to facilitate the comparison of the phenotypes between both infectious environments. Asterisks indicate significant differences between susceptible and resistant oyster families (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ).

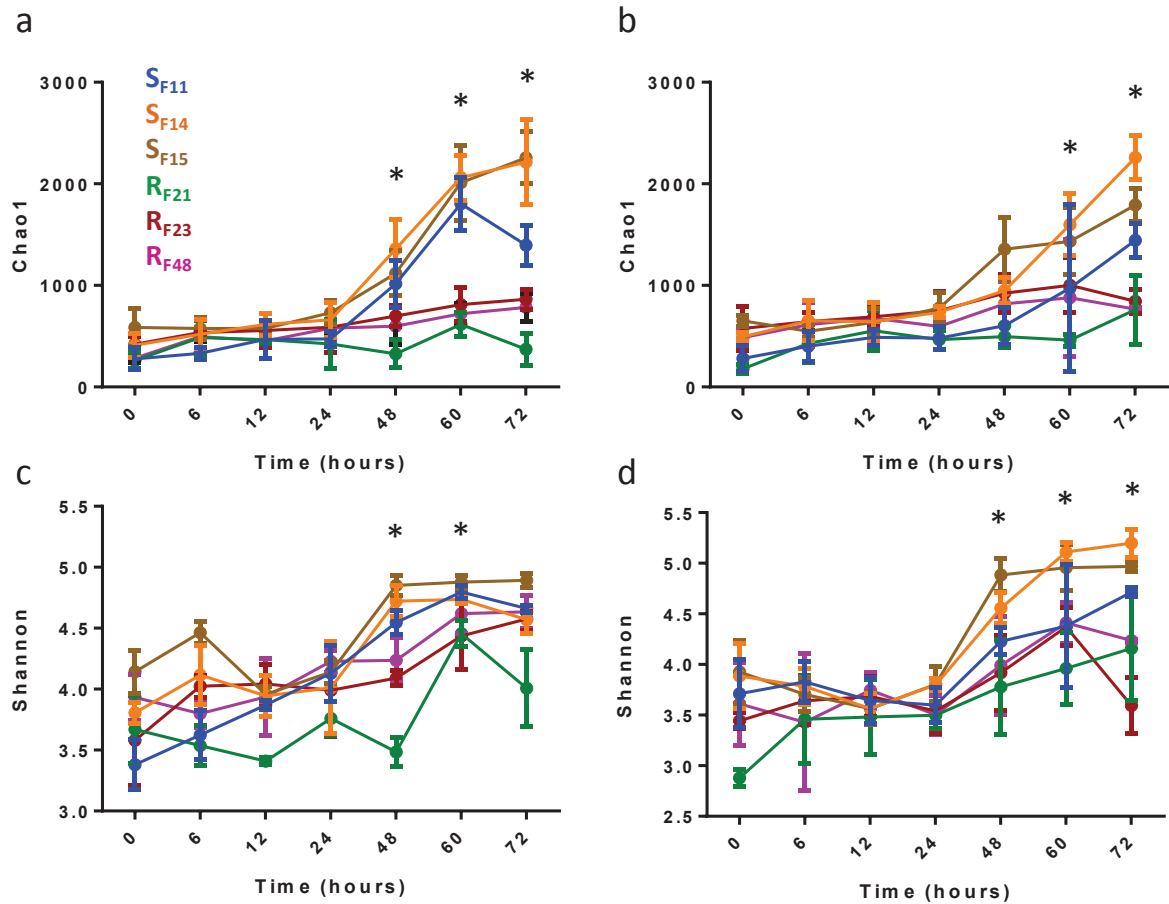
## **Microbiota destabilization and secondary bacterial infection occurred in susceptible oysters whatever the infectious environment**

To investigate the dynamics of oyster microbiota in the six families showing contrasted resistance to the disease, we analyzed total bacterial communities using 16S rDNA metabarcoding over the first 3 days of both experimental infection (Mediterranean and Atlantic infectious environments). A total of 41,012,155 clusters were obtained from 252 libraries (six families, seven sampling times, in triplicate and two infectious environments). After cleaning steps and singleton filtering, 26,442,455 sequences affiliated to 45,686 OTUs were kept for further analyses (**Supplementary Table 1**). Sufficient sequencing depth was confirmed by species richness rarefaction curves (**Supplementary Figure 1**). Changes in microbiota composition were much higher in susceptible oysters than in resistant oysters throughout our experiments at all taxonomic rank (**Supplementary Figure 2**). Indeed, for Atlantic infectious environment, 52, 43 and 54 clusters of OTUs significantly differed in terms of relative proportions in susceptible oysters (for  $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ , respectively), as opposed to 1, 11 and 9 clusters of OTUs in resistant oysters ( $R_{F21}$ ,  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$ , respectively; **Supplementary Table 2**). Same trend was evidenced in Mediterranean infectious environment with 11, 47 and 43 clusters of OTUs significantly differing in terms of relative proportion in susceptible oysters (for  $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ , respectively), as opposed to 2, 8 and 6 clusters of OTUs in resistant oysters ( $R_{F21}$ ,  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$ , respectively). Consistently, a principal coordinate analysis (PCoA) on Bray-Curtis dissimilarity matrix (beta diversity) was performed and revealed a higher microbiota dispersion in susceptible oyster families (multivariate homogeneity of groups dispersions, d.f. = 1;  $p = 0.016$  and  $p = 0.020$  for Atlantic and Mediterranean, respectively) than in resistant families in both infectious environments (**Figure 3**). This disruption of the bacterial community structure occurred in susceptible oysters between 24 h and 48 h, concomitantly with the active replication of OsHV-1  $\mu$ Var. Similarly, the Chao1 and Shannon's H indexes of alpha diversity were significantly higher in susceptible families during the infectious process compared to resistant ones (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ; **Figure 4**). In addition, as it was evidenced during the infectious process of oyster families confronted to the Atlantic infectious environment (, a significant higher abundance in total bacterial was observed in susceptible oyster families confronted to the Mediterranean infectious environment, compared to resistant ones (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ; **Figure 5**). This increase started at 60 h and continued to rise until the end of the experiment (72 h). Total bacteria abundances in susceptible oysters were more than

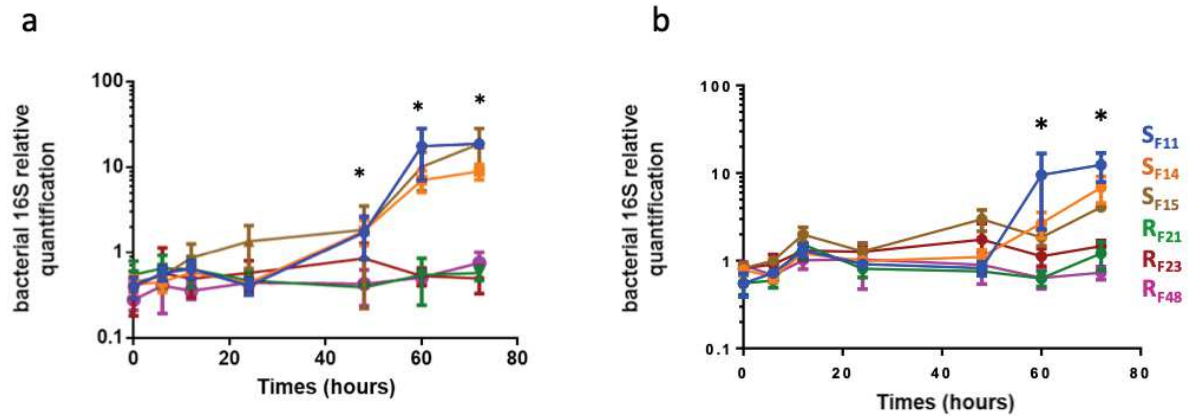
5-fold higher at 72 h by comparison with T0; this suggests a bacterial proliferation in susceptible oysters. In contrast, in resistant oysters, total bacteria remained low and stable.



**Figure 3: Principal coordinate analyzes (PCoA) plot of the microbiota for susceptible and resistant oyster families confronted to two different infectious environments.** Dispersion of oyster families according Bray-Curtis dissimilarity matrix (beta diversity) in (a) Atlantic and (b) Mediterranean infectious environments. The PCOA for SF<sub>F11</sub> and RF<sub>F21</sub> were extracted from (De Iorgeril et al. 2018); they were included in this figure to allow comparison of the 6 genotypes in both environments.



**Figure 4: Temporal dynamics of alpha diversity in susceptible and resistant oyster families confronted to two different infectious environments.** Dynamics of Chao1 index in (a) Atlantic and (b) Mediterranean infectious environments; and dynamics of Shannon index in (c) Atlantic and (d) Mediterranean infectious environments. The Chao1 and Shannon indexes for S<sub>F11</sub> and R<sub>F21</sub> in Atlantic infectious condition were extracted from (De longeril et al. 2018). Color code of oyster families is indicated in (a). Asterisks indicate significant differences between susceptible and resistant oyster families (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ).



**Figure 5: Temporal dynamics of total bacteria in susceptible and resistant oyster families confronted to two different infectious environments.** Total bacteria quantification based on qPCR amplification of the V3-V4 region of the 16S rDNA, during (a) Atlantic and (b) Mediterranean experiments. The panel (a) is extracted from (De longeril et al. 2018). These published data are shown to allow the comparison of the phenotypes between both infectious environments. Asterisks indicate significant differences between susceptible and resistant oyster families (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ).

### Which bacteria are responsible for the secondary bacterial infection?

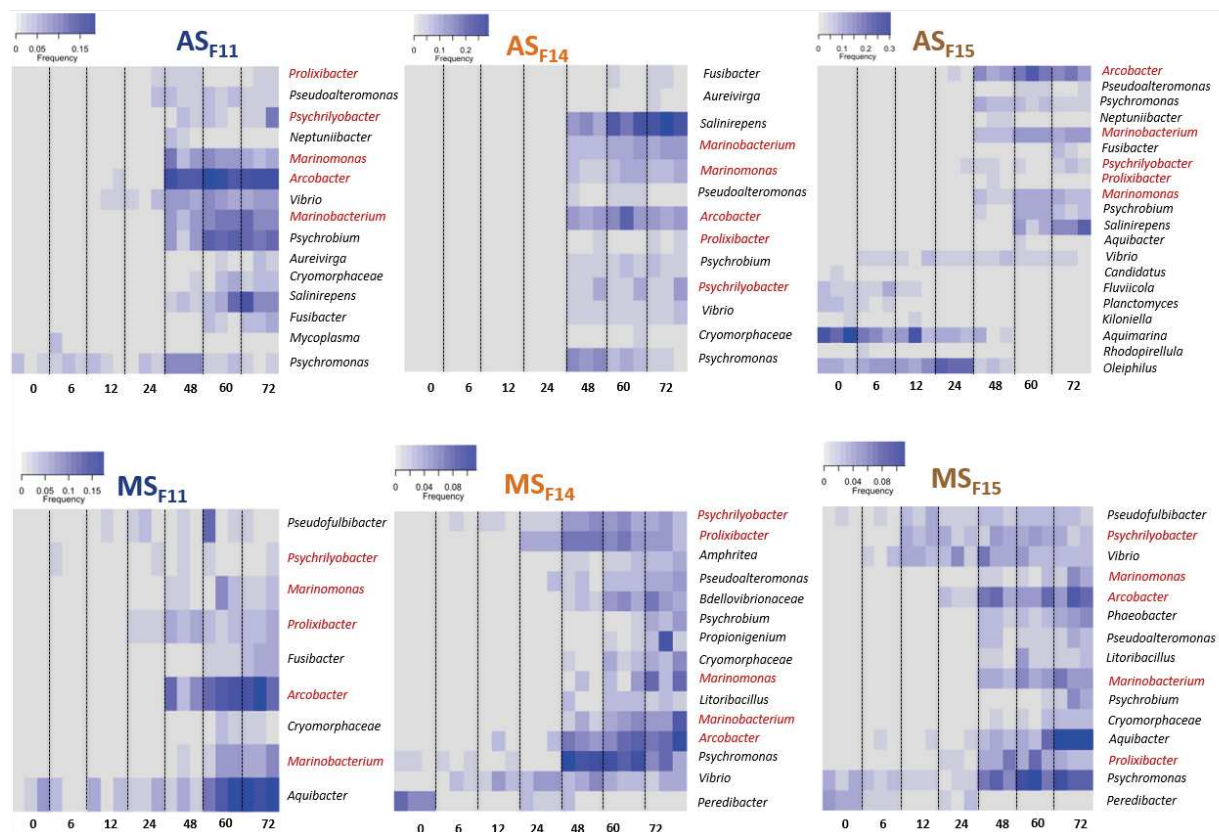
All bacterial genera that changed significantly over the two experimental infections (Atlantic and Mediterranean) in susceptible and resistant oyster families are reported in **Supplementary Table 2**. Among these modified genera, those representing more than 2% of the bacteria in at least one sample for each susceptible oyster families confronted to both infectious environments are shown in **figure 6**. In the Atlantic infectious environment, the corresponding OTUs, which represent 4%, 0.8% and 4.8% of total bacteria at the beginning of the experiment, represent 75%, 78% and 74% of the bacterial community at 72 h, for S<sub>F11</sub>, S<sub>F14</sub> and S<sub>F15</sub>, respectively (**Supplementary Table 2**). Likewise, in Mediterranean infectious environment the corresponding OTUs which represent 0.4%, 7% and 7% of total bacteria at the beginning of the experiment, represent 49%, 60% and 55% of the bacterial community at 72 h, for S<sub>F11</sub>, S<sub>F14</sub> and S<sub>F15</sub>, respectively. According to susceptible oyster families and infectious environments between 9 and 20 genera increased significantly between the beginning (0 h) and the end (72 h) of the experimental infections. Among these genera, five (*Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Proxilibacter* and *Psychrilyobacter*) are common to all susceptible oyster families and both infectious environments (**Figure 6**). Most of the remaining genera are shared by at least two families in one infectious environment (*Aquibacter*, *Aureivirga*, *Cryomorphaceae*, *Fusibacter*, *Neptunibacter*, *Peredibacter*,



*Pseudoalteromonas*, *Pseudofulvibacter*, *Psychrobium*, *Psychromonas* and *Vibrio*) and one genera (*Salinirepens*) increased significantly in all susceptible oysters in Atlantic infectious condition only. These results showed that a core microbiota colonize oysters during the secondary bacterial infection. Nevertheless, some qualitative and quantitative variations were observed between oyster genotypes and environments.

Considering now the resistant oysters, the number of genera significantly modified is much lower but some of the genera mentioned above varied significantly when oysters were confronted to infectious environments (**Supplementary Figure 3** and **Supplementary Table 2**). Nevertheless, three points must be considered to minimize this observation. Firstly, R<sub>F48</sub> and R<sub>F23</sub> oyster families are not totally resistant and some individuals died during the Atlantic experimental infection (17.8% and 12 % for R<sub>F48</sub> and R<sub>F23</sub> families when confronted to the Atlantic infectious environment, **Figure 1**). Consequently, some individuals of the pooled samples (3 pools of 10 individuals were used for analysis) are diseased and submitted to the secondary bacterial infection. Secondly, recipient oysters cohabitated with oyster donors that are diseased and even if the secondary bacterial infection did not occur in resistant recipient oysters they could accumulate by filtration some of the bacteria that are released by the diseased donors. Thirdly, even if bacteria variations were detected, the results represent variations in proportion and we must consider that the total bacteria abundance associated to resistant oysters is much lower by comparison with susceptible ones (**Figure 5**).

Concerning the origin of the bacteria which increased significantly in susceptible oysters, two cases are evidenced. Firstly, a part of the corresponding OTUs are found in few proportions before the infection (T0) and they could be part of healthy oyster's microbiota and then multiply in oysters after the immune depression induced by the virus (**Supplementary Table 1 & 2**). Secondly, other genera are not detected at T0 and are probably brought by donor oysters and the infectious environment during infection process (**Supplementary Table 1 & 2**).



**Figure 6: Heatmaps of bacterial communities that are significantly modified during the kinetics in susceptible oysters in Atlantic infectious environment AS<sub>F11</sub>, AS<sub>F14</sub>, AS<sub>F15</sub> and in Mediterranean infectious environment MS<sub>F11</sub>, MS<sub>F14</sub>, MS<sub>F15</sub>.** Analyses were performed at the genus level. Data for AS<sub>F11</sub> were extracted from (De longeril et al. 2018). Only genera with a relative proportion superior to 2% in at least one sample are shown. The intensity level of the blue represents the relative abundance of genera. Genera that are commonly modified in all families and infectious environments are in red.

## DISCUSSION

After deciphering recently the mechanism underlying the POMS (De longeril et al. 2018), we showed here that the mechanism of POMs is conserved in different oyster genotypes confronted to two distinct infectious environments. Indeed, the first event occurring during the infectious process is an intense replication of the OsHV-1  $\mu$ Var and this viral infection is followed by a secondary bacteremia occurring in all susceptible oyster families and both infectious conditions. In contrast, viral replication and bacterial infection did not occur in resistant oysters that block the virus replication and subsequent bacteremia.

Even if the first and necessary step for triggering the disease is the replication of the virus the question of the bacteria responsible for the secondary infection is an open one. In previous studies several bacterial genera (e.g. *Vibrio* and *Arcobacter*) were shown to be associated to

diseased oyster juveniles (Bruto et al. 2017; Lokmer & Mathias Wegner 2015). *Vibrios* were extensively studied and a *Vibrio crassostreae* population carrying a plasmid required for virulence has been repeatedly identified as a key etiological agent of the disease (Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2015). Nevertheless, these last approaches focusing on cultivable bacteria did not take into account the whole diversity of bacteria associated to oysters during the infectious process preceding the occurrence of the first mortalities. In addition, these previous studies were performed in oyster confronted to the same infectious environment (Atlantic) and they did not take into account a diversity of infectious environment. By studying exhaustively the bacterial microbiota by metabarcoding in oysters from different genotypes confronted to two different infectious environments (Atlantic and Mediterranean), we showed here that diseased oyster are colonized by a common consortium of bacteria composed of a variety of taxonomic groups including *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Proxilibacter* and *Psychrilyobacter* bacteria. Consequently, vibrios are not the only bacteria involved in the secondary bacterial infection. In addition, even if a core colonizing microbiota was clearly identified here, we showed some quantitative and qualitative differences between genotypes and environments. As an example bacteria from the *Salinerepens* genus colonize susceptible oysters only when they were confronted to the Atlantic infectious environment. Another example is about *Aquibacter* bacteria which colonize strongly S<sub>F11</sub> and S<sub>F15</sub> only when they were confronted to the Mediterranean infectious environment. This last result suggests that bacterial colonization is influenced by oyster genetic factors. This can be linked to recent data which showed that colonization of oyster by pathogenic *Vibrio sp.* is dependent on host genotype, using oysters with different genetic background and confronted to different *Vibrio sp.* populations (Wendling & Mathias Wegner 2015). The results obtained in the present study clearly showed that a series of bacteria strains can be responsible for the secondary bacterial infection following the immune depression status induced by the viral infection (De Iorgeril et al. 2018). These results suggest that a large variety of bacteria possesses physiological attributes allowing them to colonize and kill immune compromised oysters. In a next research effort, we will perform meta-transcriptomic analysis on the three susceptible oyster families (S<sub>F11</sub>, S<sub>F14</sub> and S<sub>F15</sub>) in both infectious environments. This analysis will allow characterizing more precisely the functional attributes of the different bacteria species multiplying in diseased oysters.

Finally, this study, the experimental design used and methodological limitations did not allow to get a clear idea on the source of the bacteria colonizing oysters at the late stages of the infectious process. Indeed, some of the OTUs colonizing oysters were detected in healthy

oysters just before their exposure to the infectious environment and others were not detected at the same stage. This suggested that at least some colonizing bacteria were brought by the infectious environment. Nevertheless, we cannot exclude that some colonizing bacteria were not detected in healthy oysters because sequencing was not deep enough. In addition, rDNA metabarcoding is not specific enough to discriminate bacterial strains; consequently, we cannot exclude that the bacterial strains detected at the beginning of the experiment are the same than those colonizing oyster flesh in the later steps. Future researches will be needed to disentangle these questions.

## END NOTES

**Acknowledgements.** We warmly thank the staff of the Ifremer stations of Argenton (LPI, PFOM) and Sète (LER), and the Comité Régional de Conchyliculture de Méditerranée (CRCM) for technical support in the collection of the oyster genitors and reproduction. We also thank Fabrice Pernet, Marie-Agnès Travers, David Mouillot, Marion Richard and Franck Lagarde for fruitful discussions. The authors are grateful to Philippe Clair from the qPHD platform/Montpellier genomics for useful advice and Yannick Labreuche for the *Vibrio crassostreae*-specific primers. This work, through the use of the GENSEQ platform (<http://www.labex-cemeb.org/fr/genomique-environnementale-2>) from the labEx CeMEB, benefited from the support of the National Research Agency under the "Investissements d'avenir" program (reference ANR-10-LABX-04-01). The present study was supported by the ANR project DECIPHER (ANR-14-CE19-0023), by the EU funded project VIVALDI (H2020 program, n°678589) and by Ifremer, CNRS, Université de Montpellier and Université de Perpignan *via* Domitia.

## Author contributions

J.D.L., A.L., J.M.E., P.H., B.P. and G.M. performed oyster experiments. J.D.L., A.L., E.T., C.C.L., and G.M. performed microbiota analyses. J.D.L., A.L., C.C.H., R.G. and G.M. performed RNA-seq analyses. J.D.L. and A.L. performed qPCR analyses. J.D.L., B.P. and G.M. designed experiments. J.D.L., A.L. and G.M. interpreted results. J.D.L., A.L. and G.M. wrote the paper. All the authors have revised and approved the manuscript submission.

**Conflict of interest statement.** The manuscript has been seen and approved by all of the authors. There are no conflicts of interest. The material represents an original result and has not been submitted for publication elsewhere.

## REFERENCES

- Abbadi, M. et al., 2018. Identification of a newly described OsHV-1 microvar from the North Adriatic Sea (Italy). *J Gen Virol*, 99(5), pp.693–703.
- Azéma, P. et al., 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), p.23.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T. & Travers, M.A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*, 131, pp.2–10.
- Blankenberg, D. et al., 2010. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), pp.1783–1785.
- Bruto, M. et al., 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal*, 11(4), pp.1043–1052.
- Burioli, E.A. V et al., 2016. Ostreid herpesvirus type 1 genomic diversity in wild populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas* from Italian coasts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 137(4), pp.71–83.
- Burioli, E.A. V, Prearo, M. & Houssin, M., 2017. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 microVar isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology*, 509, pp.239–251.
- Davison, A.J. et al., 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol*, 86(Pt 1), pp.41–53.
- De Lorgeril, J., Lucasson, A., et al., 2018. Cracking the code of Pacific oyster mortality syndrome. *Nature communication. Accepted*.
- Dobin, A. et al., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), pp.15–21.
- EFSA, 2015. P. o. A. H. W. Oyster mortality. *EFSA Journal*, 13(4122–n/a).
- Escudie, F. et al., 2017. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), pp.1287–1294.
- Goecks, J., Nekrutenko, A. & Taylor, J., 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol*, 11(8), p.86.
- Green, T.J. et al., 2015. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. *Fish Shellfish Immunol*, 47(1), pp.435–443.
- He, Y. et al., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), pp.131–144.
- Klindworth, A. et al., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 41(1), p.e1.
- Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 9(4), pp.357–359.



492 Le Roux, F., Wegner, K.M. & Polz, M.F., 2016. Oysters and Vibrios as a Model for Disease  
493 Dynamics in Wild Animals. *Trends Microbiol*, 24(7), pp.568–580.

494 Lemire, A. et al., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in  
495 naturally infected oysters. *ISME Journal*, 9(7), pp.1523–1531.

496 Li, H. et al., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*,  
497 25(16), pp.2078–2079.

498 Lokmer, A. et al., 2016. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success  
499 of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18(3), pp.970–987.

500 Lokmer, A. & Mathias Wegner, K., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in  
501 response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9(3), pp.670–  
502 682.

503 Love, M.I., Huber, W. & Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and  
504 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15(12), p.550.

505 Lynch, S.A. et al., 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype  
506 detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology*, 139(12),  
507 pp.1526–1532.

508 Magoc, T. & Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve  
509 genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), pp.2957–2963.

510 Mahe, F. et al., 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies.  
511 *PeerJ*, 2, p.e593.

512 Martenot, C. et al., 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the  
513 Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Res*, 160(1–2), pp.25–  
514 31.

515 Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing  
516 reads. *EMBnet.journal*, 17(1), p.10.

517 McMurdie, P.J. & Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive  
518 analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 8(4), p.e61217.

519 Paul-pont, I., Dhand, N.K. & Whittington, R.J., 2013. Influence of husbandry practices on  
520 OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 413,  
521 pp.202–214.

522 Peeler, E.J. et al., 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid  
523 herpesvirus-1 muVar in the Republic of Ireland in 2009. *Prev Vet Med*, 105(1–2),  
524 pp.136–143.

525 Pernet, F. et al., 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious  
526 diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France.  
527 *Aquaculture Environment Interactions*, 2(3), pp.215–237.

528 Petton, B. et al., 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes  
529 virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in*  
530 *microbiology*, 6, p.686.

532 Petton, B. et al., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent  
 533 mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environment*, 3(3),  
 534 pp.257–273.

535 Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
 536 PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), p.e45.

537 Renault, T. et al., 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae)  
 538 Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas.  
 539 *Journal of Virology*, 86(10), pp.5942–5947.

540 Renault, T. et al., 2014. Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid  
 541 herpesvirus 1 specimens. *Veterinary Research*, 45(1), p.3.

542 Rognes, T. et al., 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4,  
 543 p.e2584.

544 Rosani, U. & Venier, P., 2017. Oyster RNA-seq Data Support the Development of  
 545 Malacoherpesviridae Genomics. *Front Microbiol*, 8, p.1515.

546 Samain, J.-F. & Mc Combie, H., 2008. *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas*.  
 547 *The MOREST project*. , QUAE ed.

548 Segarra, A. et al., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1  
 549 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea*  
 550 *gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153(1), pp.92–99.

551 Segarra, A. et al., 2014. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult  
 552 Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research*, 45(1), p.103.

553 Wang, J. et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell  
 554 formation. *Nature*, 490(7418), pp.49–54.

555 Wegner, K.M. et al., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and  
 556 composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol*, 13, p.252.

557 Wendling, C.C. & Mathias Wegner, K., 2015. Adaptation to enemy shifts: Rapid resistance  
 558 evolution to local vibrio spp. in invasive pacific oysters. *Proceedings of the Royal*  
 559 *Society B: Biological Sciences*, 282(1804), p.20142244.

560



## Discussion et Perspectives

### I. Synthèse des résultats

L'ensemble du travail réalisé durant cette thèse nous a permis de (i) comprendre le mécanisme associé au syndrome de mortalité des jeunes huîtres dans l'environnement infectieux atlantique et (ii) de montrer que ce mécanisme est généralisable à d'autres environnements infectieux survenant notamment sur les côtes méditerranéennes.

Ainsi dans une première partie nous avons démontré par analyse RNAseq des transcrits viraux et par détection de l'ADN viral par qPCR que la première phase de l'infection implique un variant de l'herpès virus nommé OsHV-1 $\mu$ var. Ce dernier est capable d'infecter aussi bien les huîtres sensibles que les huîtres résistantes mais il se réplique intensément uniquement chez les huîtres sensibles. Grâce à une cinétique d'infection à des pas de temps rapprochés (6h, 12h, 24h, 48h, 60h, 72h), nous avons pu déterminer que la réplication du virus est à son maximum entre 24h et 48h post infection. Après 48h, la mise en place d'un plateau est observée chez les huîtres sensibles alors que les niveaux de réplication du virus restent faibles chez les huîtres résistantes. De plus, l'hybridation *in situ* avec une sonde virale et l'immunodétection avec un anticorps dirigé contre un marqueur hématocytaire nous a permis par l'observation d'une coupe adjacente de démontrer que le virus se réplique dans les hémocytes d'huîtres.

Côté microbiote, nous avons également utilisé une combinaison de techniques : metabarcoding 16S pour suivre la structure et la diversité des communautés bactériennes au cours de l'infection et la détection par qPCR de genres et d'espèces bactériennes suspectés d'être impliqués dans le syndrome de mortalité. Nous avons ainsi observé une modification dans la structure et dans la composition des communautés bactériennes chez les familles sensibles entre 24 et 48h, période durant laquelle le virus se réplique intensément. Au cours de cette modification, nous avons observé que deux classes bactériennes sont particulièrement modulées : les Gammaprotéobactéries et les Epsilonprotéobactéries ; leurs proportions augmentent chez les huîtres sensibles, 48h après l'infection. Parmi ces classes, 4 genres bactériens augmentent de façon très significative : *Vibrio*, *Arcobacter*, *Marinomonas* et *Alteromonadales*. En qPCR nous

avons suivi la dynamique des bactéries totales, du genre *Vibrio* et la dynamique de l'espèce *Vibrio crassostreae*.

Ce suivi temporel nous a permis d'observer une augmentation significative du nombre de bactéries totales chez les huîtres sensibles, 60h post infection. Simultanément, la charge en *Vibrio* a augmenté.

Afin de comprendre pourquoi les huîtres sensibles se font coloniser par les bactéries nous avons analysé l'expression de gènes impliqués dans la défense antibactérienne. Le proxy utilisé était les gènes codant les peptides antimicrobiens (AMPs). Ainsi nous avons pu suivre les transcrits de certains gènes et observer une chute de leur concentration entre 24h et 48h et simultanément, nous avons également mis en évidence une chute de l'expression de la superoxyde dismutase (SOD). Ces AMPs et la SOD étant exprimés par les hémocytes, cette observation nous a permis d'émettre l'hypothèse que les hémocytes, infectés par le virus, ne pourraient plus jouer leur rôle clé dans la défense antibactérienne. En effet, le virus altérerait, par un mécanisme en cours d'élucidation (Martenot et al. 2017 ; Martenot et al. 2016 ; Morga et al. 2017), les hémocytes de l'huître et la colonisation bactérienne des tissus de l'huître s'en suivrait.

Des colorations Giemsa, effectuées sur des coupes histologiques permettant d'identifier les microorganismes dans les tissus nous ont permis d'observer des dommages tissulaires majeurs induits par les bactéries chez les huîtres sensibles au moment des mortalités. Nous avons en effet observé à 54h post infection, une accumulation des bactéries dans les branchies des huîtres sensibles. A 78h post infection les tissus des branchies sont dégradés massivement et des bactéries ont été observées dans la plupart des tissus des huîtres sensibles, tels que dans les branchies, les muscles adducteurs et les tissus interstitiels près du tube digestif. Aucune lésion bactérienne ou tissulaire n'a été observée sur des coupes d'huîtres sensibles au début de l'infection expérimentale ou dans les tissus d'huîtres résistantes à aucun moment de la cinétique. Ces observations montrent que les huîtres sensibles subissent une septicémie bactérienne qui précède la mort.

Le dual RNAseq que nous avons effectué nous a permis d'avoir accès à la réponse transcriptomique des huîtres résistantes et sensibles. Grâce à cette analyse nous avons pu comprendre le lien entre la dynamique microbienne, incluant celle des agents pathogènes et la réponse des huîtres. En effet, par l'analyse des transcrits d'huîtres, nous avons mis en évidence une réponse antivirale plus précoce et plus forte, dans les 12 premières heures suivant

l'exposition, chez les huîtres résistantes. Cette réponse se caractérise par l'induction de gènes et d'effecteurs liés aux voies de signalisation antivirale telles que la voie RLR / STING et JAK/STAT. A l'inverse, nous avons observé chez les sensibles une réponse antivirale plus forte mais retardée dans le temps puisqu'elle n'apparaît qu'à partir de 24h. En analysant les fonctions modulées chez les huîtres sensibles, nous avons trouvé que la fonction « régulation négative de la mort cellulaire » était particulièrement enrichie entre 24 et 48h post infection. Or cette période correspond à la période de répllication intense du virus. En analysant les gènes impliqués dans cette fonction, nous avons identifié une induction massive d'inhibiteurs d'apoptose (IAPs) endogènes à partir de 48h chez les huîtres sensibles. L'analyse exhaustive des transcrits viraux nous a également permis d'identifier une expression massive de 4 ORFs virales (ORF42, ORF87, ORF96 et ORF106) codant pour des inhibiteurs d'apoptose (IAPs). L'expression de ces IAPs endogènes et exogènes pourrait expliquer l'inefficacité de la réponse antivirale.

L'ensemble de ces éléments n'étant que corrélatif, nous avons dû développer des expériences de co-infections rationalisées pour valider la participation du virus et des bactéries pour compléter le processus infectieux. Pour cela des huîtres receveuses ont été simultanément exposées à deux types d'huîtres donneuses. Les premières ont été injectées par une souche de *Vibrio crassostreae* et les secondes par OsHV-1. Les huîtres receveuses ont été injectées (i) soit avec du poly(I:C) qui empêche la répllication du virus, (ii) soit avec de l'eau de mer stérile comme contrôle, (iii) soit traitées avec un antibiotique bactériostatique, le chloramphénicol, qui limite la colonisation bactérienne dans les huîtres. Les deux traitements poly(I:C) et antibiotique ont bloqué ou retardé les mortalités chez les huîtres sensibles, signifiant que les deux infections sont nécessaires pour compléter le processus infectieux caractéristique du syndrome (POMS).

Cette première partie sur la dynamique de l'huître et de son microbiote nous a permis de démontrer grâce à une combinaison de techniques et à l'utilisation d'un système d'infection écologiquement réaliste que le syndrome est causé par une infection multiple. La première étape nécessaire est l'infection des cellules immunocompétentes de l'huître par OsHV-1 $\mu$ var. Chez les huîtres sensibles, la réponse antivirale est retardée permettant au virus de se répliquer intensément dans les hémocytes ce qui altère la réponse antibactérienne dont les hémocytes sont le principal artisan. Des bactéries opportunistes sont donc capables de coloniser les tissus d'huîtres sensibles provoquant la mort des huîtres par septicémie. En revanche, la capacité des

huîtres résistantes à mettre en place une réponse antivirale précoce empêche le virus de se répliquer et donc la suite des événements délétères de se produire.

Dans une seconde partie nous nous sommes intéressés à la diversité du mécanisme de pathogénèse précédemment identifié. Notre question était de savoir si ce mécanisme pouvait être généralisable quels que soient les génotypes partageant le même phénotype et quel que soit l'environnement infectieux.

Pour cela nous avons comparé la séquence des événements au cours d'une cinétique d'infection (6h, 12h, 24h, 48h, 60h, 72h) dans deux environnements infectieux : atlantique et méditerranée sur trois familles (de génotype différent) de phénotype sensible et trois familles au phénotype résistant.

Pour suivre la dynamique du microbiote nous avons effectué un séquençage de l'ARN ribosomique 16S bactérien sur l'ensemble des familles dans les deux environnements infectieux. Le suivi des agents pathogènes et des bactéries totales a été réalisé par une détection en qPCR. A l'inverse du travail réalisé dans la première partie, nous n'avons pas effectué de dual transcriptome huître et virus et d'analyses histologiques. Notre but était de valider ou non le mécanisme en méditerranée et d'analyser les bactéries responsables de l'infection bactérienne secondaire.

Nous avons observé, comme précédemment décrit en atlantique, que le virus est capable d'infecter les huîtres des familles sensibles et les familles résistantes dans l'environnement méditerranéen. La réplication virale intense ne se produit que dans les familles sensibles et a lieu entre 24 et 48h. L'analyse de la structure et de la diversité des communautés bactériennes nous a montré comme en atlantique une modification dans le microbiote des huîtres sensibles entre 24 et 48h.

Comme en atlantique, cette modification dans la structure et la diversité des communautés bactériennes est associée à une augmentation du nombre de bactéries totales 60h post infection uniquement chez les huîtres sensibles dans les conditions infectieuses méditerranéennes. Pour identifier les bactéries colonisatrices en atlantique et en méditerranée nous avons effectué des heatmaps sur l'abondance des genres bactériens qui sont modulés significativement au cours de la cinétique d'infection. Parmi ces genres modulés, ceux représentant plus de 2 % des bactéries,

dans au moins un échantillon, pour chaque famille d'huîtres sensibles confrontées aux deux environnements infectieux, a été analysé.

Dans l'environnement infectieux atlantique, les OTU correspondants aux genres modulés significativement représentaient 4 %, 0,8 % et 4,8 % des bactéries totales au début de l'expérience, et 75 %, 78 % et 74 % de la communauté bactérienne à 72 h, respectivement pour les trois familles sensibles  $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  et  $S_{F15}$ .

De même, en milieu infectieux méditerranéen, les OTU correspondants représentaient 0,4 %, 7 % et 7 % des bactéries totales en début d'expérience et 49 %, 60 % et 55 % de la communauté bactérienne à 72 h, pour les familles  $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  et  $S_{F15}$ , respectivement.

Nous avons identifié quels que soient l'environnement infectieux et le génotype des huîtres de phénotype sensible, un core microbiote colonisateur commun et les bactéries qui le constituent, appartiennent aux genres *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Prolixibacter* et *Psychrilyobacter*. Le genre *Vibrio* était absent d'une famille en méditerranée. Nous avons également observé des différences quantitatives et qualitatives au niveau des genres bactériens colonisateurs des huîtres sensibles entre les génotypes et les environnements.

Cette seconde partie nous a ainsi permis de valider le mécanisme de pathogénèse dans un second environnement infectieux : la réplication virale intense chez les huîtres sensibles précède la déstabilisation du microbiote et l'infection bactérienne secondaire par des bactéries opportunistes. L'analyse comparative du microbiote dans les deux environnements a permis de préciser la caractérisation de l'infection bactérienne secondaire : un consortium bactérien colonisateur commun à l'ensemble des huîtres sensibles dans les différents environnements infectieux a ainsi pu être identifié.

## II. Les acteurs impliqués dans la maladie

### a. Le virus, facteur déclencheur du processus de pathogénèse

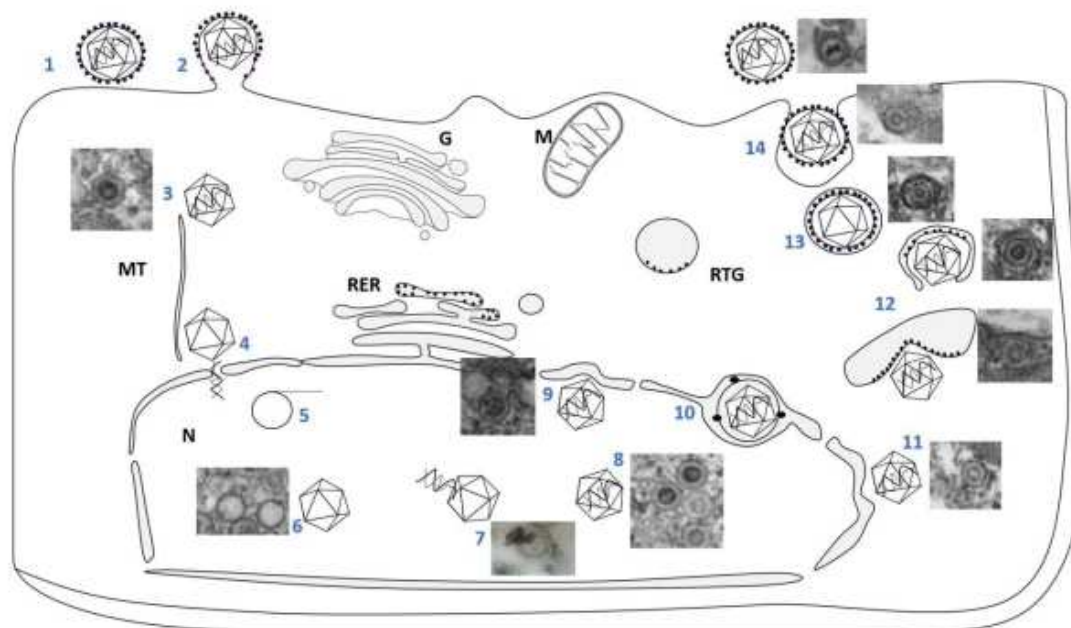
Nous avons démontré que le facteur déclencheur du syndrome de mortalité des huîtres juvéniles est la réplication intense du virus OsHV-1  $\mu$ Var qui atteint le compartiment hématocytaire des huîtres. Cette observation est appuyée par différents travaux réalisés sur les interactions OsHV-1  $\mu$ Var -hématocytes d'huîtres. En effet, Martenot et ses collaborateurs ont identifié une réplication

du virus OsHV-1 dans les hémocytes d'huîtres après injection de la suspension virale dans le muscle adducteur. En combinant plusieurs techniques de détection : PCR en temps réel, RT-qPCR, immunofluorescence et microscopie électronique à transmission, ces auteurs ont observé une augmentation des transcrits viraux dans les hémocytes d'huîtres 2h, 24h et 48h post-infection pour 3 gènes qui codent des protéines membranaires (ORF 25, 41 et 72) et 1 gène qui code un inhibiteur d'apoptose (ORF 87).

Une autre étude s'est intéressée à l'interaction virus-hémocytes dans un système *in vitro* (Morga et al. 2017). Les hémocytes d'huîtres saines de *C. gigas* ont été collectés et exposés *in vitro* à une suspension virale. Les résultats montrent que l'ARN viral (suivi de 15 gènes viraux par RT-qPCR) est détectable 1 heure après le contact avec une augmentation de l'ARN viral au cours du temps, jusqu'à 24h. L'ensemble de ces résultats montre que le virus est capable d'infecter les hémocytes et de se répliquer rapidement (dans les premières heures qui suivent l'exposition). Aucune de ces études n'a cependant pu montrer les particules virales enveloppées dans les hémocytes suggérant ainsi que les hémocytes ne seraient pas un tissu adapté pour la production de particules virales infectieuses. En effet, la détection de l'ADN d'OsHV-1, de l'ARN et la détection de protéines dans les hémocytes semblent indiquer que le virus pourrait initier son cycle de réplication dans ces cellules sans atteindre la production de particules enveloppées (Martenot et al. 2017).

De plus, des transcrits viraux ont également été détectés au niveau du manteau, des branchies et du cœur, 26h après infection (Segarra et al. 2016). La détection des ARN viraux était plus forte dans le cœur que dans les autres tissus, suggérant que le virus serait capable de se répliquer dans les différents tissus de l'huître et qu'il pourrait initier son cycle de réplication dans le cœur. En revanche, la gonade était le seul organe pour lequel aucune détection d'ARNs viraux n'a été mise en évidence.

A ce jour, les résultats acquis sur le tropisme cellulaire ne nous permettent pas de comprendre les étapes de l'infection par le virus au travers de l'ensemble du processus infectieux. Toutefois, Segarra et ses collaborateurs ont proposé un cycle de réplication hypothétique sur la base d'observations en microscopie électronique à transmission et des connaissances acquises sur les herpes virus de type 1 (**Figure 12**).



**Figure 12 : Cycle de réplication hypothétique d'OsHV-1.**

Le mécanisme serait le suivant : (1) après une étape d'adsorption à la cellule cible, le virus est capable de pénétrer dans la cellule par (2) fusion de son enveloppe avec la membrane. (3) Après son entrée dans la cellule, les microtubules assurent le transport des nucléocapsides vers le noyau. (4) Son génome est ensuite libéré dans le noyau. (5) L'ADN viral est ensuite transcrit et répliqué. (6) L'assemblage de la capside a lieu. (7) et (8) L'ADN viral et la capside s'assemblent. (9) La nucléocapside nouvellement formée fusionne avec la membrane nucléaire interne. (10) et (11) La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme. (12) Acquisition de l'enveloppe virale au niveau du réseau Trans-golgien. (13) Les particules virales nouvellement formées (virions) sont transportées vers la membrane cellulaire et libérées par exocytose. D'après Renault et Segarra, *in prep*.

Dans la première partie de la thèse nous avons observé que le virus est capable d'infecter aussi bien les huîtres sensibles que les résistantes mais qu'il se réplique intensément uniquement chez les sensibles. De plus, nous avons observé une légère diminution des transcrits viraux en fin de cinétique d'infection chez les huîtres résistantes alors qu'une phase de plateau était observée chez les huîtres sensibles. Cette observation suggère deux hypothèses : (i) soit le virus ne se réplique plus chez les huîtres résistantes, il est éliminé, (ii) soit il ne se réplique plus mais il reste latent.

En effet, de l'ADN et des protéines virales ont été détectés chez des huîtres adultes asymptomatiques (Barbosa-Solomieu et al. 2004; Arzul et al. 2002). De plus, la latence est une caractéristique des herpès virus. Elle peut être résumée à une persistance silencieuse du virus dans l'organisme (Roizman & Sears 1987). L'infection latente se met en place suite à une primo



infection. Durant la phase de latence, l'activité virale est quasi inexistante puisqu'un nombre réduit de gènes viraux est transcrit. Ainsi, durant cette phase il n'y a pas de cycle viral lytique. Bien que de l'ADN et des protéines virales aient été détectés dans des huîtres non malades, aucun gène en lien avec la latence n'a encore été identifié chez le virus OsHV-1. La compréhension du mécanisme de latence pourra permettre d'approfondir les mécanismes de virulence d'OsHV-1 et d'identifier si des huîtres survivantes à des épisodes de mortalité peuvent constituer un réservoir à la transmission d'OsHV-1.

Que le virus soit latent ou éliminé, nous avons observé que les huîtres résistantes sont capables de répondre à l'infection par le virus. En effet, dans la première partie de la thèse, nous avons observé une induction de gènes et d'effecteurs antiviraux impliqués dans les voies de signalisation antivirale. En revanche, les huîtres sensibles n'ont pas été capables de répondre efficacement à l'infection virale à cause de l'induction d'inhibiteurs d'apoptose viraux et endogènes.

Nous n'avons pas approfondi le mécanisme par lequel OsHV-1 est capable d'induire l'inhibition de l'apoptose des cellules hôtes. Toutefois, il a été rapporté dans la littérature que certains composants viraux sont capables d'inhiber, par différents mécanismes, l'apoptose des cellules humaines (Teodoro & Branton 1997; Krajcsi & Wold 1998). Par exemple, des protéines virales sont capables d'inhiber des protéines cellulaires impliquées dans le déclenchement de l'apoptose telles que la protéine P53 ou le récepteur FAS. C'est le cas pour les virus de type herpès, des adénovirus ou des papillomavirus. D'autres protéines peuvent quant à elle activer des protéines cellulaires qui inhibent l'apoptose comme la protéine Bcl-2. Enfin, des protéines virales peuvent directement inhiber les mécanismes apoptotiques (Krajcsi & Wold 1998).

Il y a encore du travail pour comprendre les mécanismes de virulence d'OsHV-1 et des questions clefs dans le processus infectieux restent en suspens :

- 1) Comment le virus pénètre-t-il dans la cellule hôte ?
- 2) Quelles sont les premières cellules infectées ?
- 3) Le virus est-il éliminé par les huîtres résistantes ou reste-t-il latent ?
- 4) Dans quel type cellulaire s'effectue la latence ?
- 5) Quels sont les facteurs participant à la réactivation du virus ?

L'ensemble du travail qui sera réalisé pour répondre à ces questions sera un élément déterminant dans la compréhension du mécanisme de pathogénèse associé au virus OsHV-1 dans le syndrome de mortalité des huîtres.

#### b. Les bactéries opportunistes responsables de la septicémie

Nous avons démontré dans une première partie de cette thèse que les bactéries opportunistes colonisaient les tissus des huîtres sensibles suite à l'infection des hémocytes par le virus. Dans la seconde partie nous avons affiné cette infection secondaire avec l'identification de cinq genres bactériens *Arcobacter*, *Marinobacterium*, *Marinomonas*, *Proxilibacter* et *Psychrilyobacter* communs à toutes les familles d'huîtres sensibles et aux deux environnements infectieux. La plupart des genres modulés à la hausse chez les familles d'huîtres sensibles était partagée par au moins deux familles dans au moins un environnement infectieux : *Aquibacter*, *Aureivirga*, *Cryomorphaceae*, *Fusibacter*, *Neptunibacter*, *Peredibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudofulvibacter*, *Psychrobium*, *Psychromonas* et *Vibrio*.

Chez les huîtres résistantes, nous avons observé que le nombre de genres significativement modulés était plus faible. Toutefois, certains des genres identifiés chez les huîtres sensibles ont été significativement modulés chez les huîtres résistantes. Les huîtres résistantes peuvent donc être colonisées par des bactéries opportunistes. Attention, trois points doivent être considérés pour minimiser cette observation. Premièrement, les familles d'huîtres R<sub>F48</sub> et R<sub>F23</sub> ne sont pas totalement résistantes (taux de mortalités observés de 17,8 % et 12 %, respectivement) et donc certaines huîtres étaient en train de mourir lors de l'infection expérimentale en Atlantique. Par conséquent, certains individus des échantillons (pools de 10 individus) peuvent être malades et soumis à l'infection bactérienne secondaire. Deuxièmement, les huîtres receveuses cohabitaient avec des huîtres donneuses malades, ainsi une accumulation par filtration de certaines bactéries libérées par les huîtres donneuses a probablement été détectée.

Troisièmement, les résultats représentent des variations de proportion des genres bactériens et il faut considérer que l'abondance totale des bactéries associée aux huîtres résistantes est beaucoup plus faible en comparaison des huîtres sensibles.

Ceci dit, nous pouvons émettre l'hypothèse que les huîtres résistantes peuvent présenter certains genres bactériens potentiellement pathogènes mais que l'infection secondaire dans les huîtres

résistantes n'a pas lieu parce que la réplication du virus et l'immunosuppression associée ont été jugulés en amont.

Nous avons voulu savoir si les genres bactériens qui colonisaient les huîtres étaient déjà présents avant le début de l'infection (T0) ou s'ils étaient apportés par les environnements infectieux. Nous avons identifié qu'une partie des OTUs correspondant aux genres modulés significativement étaient présents avant l'infection suggérant qu'ils pourraient faire partie du microbiote de l'huître, puis se multiplier dans les huîtres après l'immunosuppression induite par la réplication virale. D'autres genres n'ont cependant pas été détectés à T0 et sont donc probablement apportés par les huîtres donneuses et le milieu infectieux au cours du processus d'infection. Par exemple, le genre *Salinirepens* n'a été observé chez les huîtres sensibles uniquement dans l'environnement Atlantique. De même les bactéries du genre *Aquibacter* colonisaient fortement les familles S<sub>F11</sub> et S<sub>F15</sub> uniquement lorsqu'elles étaient confrontées à l'environnement infectieux méditerranéen. Ce dernier résultat suggère que la colonisation bactérienne peut être influencée par les facteurs génétiques des huîtres. Cette observation rejoint l'étude de Wendling et Wegner qui ont montré que la colonisation des huîtres par des vibrios pathogènes dépendait de l'origine génétique des huîtres (Wendling & Mathias Wegner 2015). Il est important de signaler que la méthode utilisée est limitante dans l'interprétation de ces observations. En effet, la technique de metabarcoding de l'ADN ribosomique 16S n'est pas suffisamment résolutive pour identifier les souches bactériennes et il se peut que le séquençage n'ait pas été suffisamment profond dans certains échantillons. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure que les souches bactériennes, détectées au début de l'expérience, sont les mêmes que celles qui colonisent la chair des huîtres en fin d'infection.

Cette analyse approfondie du microbiote au cours du processus infectieux nous a permis de démontrer que les vibrios ne sont pas les seules bactéries impliquées dans l'infection bactérienne secondaire. Les vibrios ont été largement étudiés dans le syndrome de mortalité des juvéniles d'huîtres et une population de *Vibrio crassostreae* portant un plasmide nécessaire à la virulence a été identifiée à plusieurs reprises comme un agent étiologique clé de la maladie (Bruto et al. 2017; Lemire et al. 2015). Néanmoins, ces dernières approches axées sur les bactéries cultivables ne prenaient pas en compte toute la diversité des bactéries associées aux huîtres lors du processus

infectieux. De plus, ces études ont été réalisées sur des huîtres confrontées au même environnement infectieux atlantique et ne prenaient donc pas en compte la diversité des environnements infectieux.

Concernant les autres genres identifiés par metabarcoding nous avons peu de recul sur leurs mécanismes de virulence dans la maladie des huîtres. Le genre *Arcobacter* a toutefois déjà été associé à des mortalités d'huîtres (Lokmer & Mathias Wegner 2015b). Dans de futures études il sera intéressant de coupler les approches cultivables et de séquençage pour identifier des genres bactériens impliqués dans le processus infectieux. Un travail préliminaire a déjà été entrepris par une étudiante de master (B. Cotteux).

L'objectif de son travail était d'isoler et d'identifier les bactéries responsables de l'infection secondaire. L'isolement a été effectué par des approches cultivables et l'identification par séquençage des régions V3 et V4 du gène de l'ARN ribosomique 16S. Les souches isolées ont ensuite été testées en injection expérimentale. 230 souches bactériennes ont été isolées et 170 de ces souches ont été identifiées par séquençage. 23 souches ont été testées en infections expérimentales avec 9 souches induisant des mortalités chez les huîtres. Ces 9 souches correspondaient aux genres ou espèces *Shewanella colwelliana*, *Shewanella pealeana*, *Tenacibaculum soleae*, *Vibrio europaeus*, *Vibrio tubiashii*, *Alteromonas macleodii*, *Acinetobacter radioresistens* et *Psychrobacter piscotorii*. Malheureusement, nous n'avons identifié aucune bactérie correspondant aux 5 genres communs identifiés par metabarcoding. Une raison peut être le fait que l'identification des bactéries dans le cadre de son stage a été réalisée à partir de poudres d'huîtres congelées et stockées au -80°C et ce depuis 2015. Un prochain isolement et séquençage à partir d'isolats frais pourra peut-être nous permettre d'identifier des bactéries de ces 5 genres. Ce travail a également permis d'identifier des différences dans les pourcentages et les cinétiques de mortalité entre les différentes espèces bactériennes testées suggérant ainsi la présence de propriétés bactériennes différentes entre les souches telles que des facteurs de colonisation ou de virulence différents.

En définitive il semble que la nature des bactéries colonisant les huîtres en fin de processus ne soit pas si importante. Ce qui semble important de considérer ce sont les mécanismes mis en place par les bactéries pour coloniser les huîtres et déclencher la septicémie. Des questions restent ouvertes :

- 1) Est-ce que les bactéries que nous avons identifiées ont des gènes de virulence qui leur permettent de coloniser les huîtres par rapport à d'autres ne colonisant pas l'huître ?
- 2) Ces gènes sont-ils les mêmes que ceux identifiés chez les vibrios ?
- 3) Pouvons-nous déterminer des gènes communs du consortium bactérien nécessaires à la colonisation/virulence ?

Pour répondre à ce genre de questions, il serait intéressant de développer des approches de génomique comparative et fonctionnelle sur des souches bactériennes comme celles qui ont été réalisées pour les populations de vibrios du clade *Splendidus*. La comparaison des génomes permettrait d'approfondir les mécanismes de virulence des bactéries associées à un consortium bactérien potentiellement pathogène chez les huîtres. Ce travail est un travail de longue haleine qui présente un certain nombre de verrous et qui nécessitera de mettre en œuvre des moyens considérables. C'est la raison pour laquelle nous proposons dans un premier temps, pour avancer dans la compréhension de cette infection bactérienne secondaire, une analyse méta-transcriptomique sur les trois familles d'huîtres sensibles ( $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  et  $S_{F15}$ ) dans les deux environnements infectieux à différents temps de la cinétique d'infection. Cette analyse permettra de caractériser les gènes exprimés par les bactéries dans les huîtres malades et donnera des pistes sur les attributs fonctionnels mis en place par les bactéries.

A noter que nous parlons de consortium bactérien mais nous ne savons pas encore si des interactions potentielles entre les bactéries (par exemple des mécanismes de synergie) sont mises en place entre les bactéries. Ainsi le terme de core microbien semble plus approprié tant que les mécanismes sous-jacents n'auront pas été élucidés.

### c. Le microbiote et son influence sur le pathosystème

Nous avons observé que les changements dans la structure et la diversité des communautés bactériennes étaient causés par l'infection virale. Autrement dit, nous avons analysé les modifications dans le microbiote comme la conséquence d'un stress. C'est ce que nous observons dans la majorité des études réalisées impliquant le microbiote et les mortalités d'huîtres. En effet, Lokmer et Wegner ont montré qu'un stress thermique peut perturber les associations microbiennes et entraîner le développement de bactéries opportunistes pathogènes

(Lokmer & Mathias Wegner 2015b). De même, un transfert d'huîtres non traitées aux antibiotiques dans un autre environnement augmente les mortalités suggérant que la modification des communautés bactériennes chez les huîtres transférées, non traitées, pourrait être due aux interactions entre le microbiote résident et externe (Lokmer, Goedknecht, et al. 2016). Ces études soulignent l'importance du microbiote résident avant la mise en place d'un stress.

Peu d'études se sont intéressées au rôle du microbiote comme élément protecteur dans le processus de pathogène des juvéniles d'huîtres. Dans le papier présenté en annexe, il est proposé que les cyanobactéries pourraient permettre l'acclimatation des huîtres à des changements environnementaux. En effet, des huîtres résistantes ont présenté, en période de stress, (période associée à des événements de mortalité) une augmentation des OTUs associés aux cyanobactéries. Ces OTUs n'étaient pas présents des microbiotes d'huîtres sensibles. De plus, il semblerait que la quantité des cyanobactéries soit variable dans les tissus d'huîtres puisqu'une étude a identifié que les cyanobactéries étaient plus abondantes dans la glande digestive que dans le tissu conjonctif, le manteau et la gonade des huîtres (Avila-Poveda et al. 2014). Une autre étude indique également le rôle potentiellement protecteur des cyanobactéries (Turner et al. 2009). En effet, les auteurs ont montré que les cyanobactéries étaient corrélées négativement à l'abondance des vibrios cultivables dans les communautés microbiennes libres. Le mécanisme par lequel les cyanobactéries permettent une protection n'est pas connu. Toutefois, l'activité photosynthétique des cyanobactéries pourrait inhiber la croissance des bactéries pathogènes par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme cela a été démontré pour le protozoaire *Plasmodium* dont l'infection chez *Anopheles gambiae* est limitée par des entérobactéries productrices de ROS (Cirimotich et al. 2011).

La discussion autour de ces 3 parties sur les acteurs de la maladie nous indique que pour comprendre les interactions au sein du microbiote, il est nécessaire de combiner différentes approches d'analyse du microbiote, telles que le séquençage (metabarcoding, metatranscriptomique, analyse du virome) et les approches cultivables. De plus, dans les infections polymicrobiennes comme celles qui interviennent dans ce syndrome touchant les huîtres, il est possible que des interactions entre agents pathogènes s'établissent. Peu d'études ont abordé ces questions. Pourtant, nous l'avons vu dans l'état de l'art, des interactions moléculaires peuvent s'établir entre les virus et les bactéries afin de favoriser les infections

polymicrobiennes (Almand et al. 2017). Les analyses de métabolome peuvent ajouter des informations sur la compréhension des systèmes (Aguiar-Pulido et al. 2016). La métabolomique est l'analyse des molécules libérées par l'organisme, elle permet de glaner des informations sur les caractéristiques du microbiote mais aussi sur les interactions au sein de la communauté microbienne et avec le milieu (Wu et al. 2016; Xu et al. 2007) ; Des analyses métabolomiques en réponse à des changements environnementaux ont été réalisées chez l'huître (Ji et al. 2015; Wei et al. 2015; Tikunov et al. 2010) mais à notre connaissance aucune n'a été effectuée en réponse à une infection. Combiner ces approches pour déchiffrer les interactions au sein du microbiote demande beaucoup de travail mais semble être une piste à explorer si nous voulons améliorer notre vision sur ces interactions.

### III. L'environnement, la physiologie de l'huître, le développement et la maladie

Le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres a pu être caractérisé grâce à l'approche holistique que nous avons mise en place. Nous avons pris en compte les deux agents pathogènes impliqués dans le processus infectieux (virus et bactéries), la dynamique du microbiote de l'huître, deux environnements infectieux et le génotype huître. Ainsi, nous avons vu au travers des deux articles que le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres est conservé entre familles d'huîtres présentant le même phénotype et quel que soit l'environnement infectieux considéré.

Toutefois, une série d'autres facteurs est corrélée aux mortalités d'huîtres. En effet, la température a été identifiée comme un élément clef dans le processus infectieux puisque les mortalités débutent quand la température atteint 16°C (Pernet et al. 2012; Petton et al. 2013; Dégremont et al. 2013). Le mécanisme par lequel la température agit sur les mortalités d'huîtres n'est pas élucidé mais différentes études ont permis d'approfondir ce lien. Par exemple, la température pourrait favoriser l'activation des agents pathogènes. En effet, Pernet et ses collaborateurs ont démontré que le virus persiste dans les huîtres à basses températures (10°C et 13°C) et qu'il est réactivé lors d'une augmentation de la température à 21°C (Pernet et al. 2015). De même dans une expérience de cohabitation entre huîtres exposées au terrain, en période de mortalité, et huîtres non exposées, Petton et ses collaborateurs ont démontré que la transmission



du virus est réalisée entre 16°C et 22°C. En revanche aucune transmission virale n'a lieu à 13°C (Petton et al. 2013).

Un autre facteur que nous n'avons pas considéré dans le processus infectieux est l'histoire de vie des huîtres. Ce facteur est pris en compte dans le cadre de la seconde partie du projet DECIPHER, le projet Transgigas (porté par C. Cosseau) et dans la thèse de M. Fallet. Nous pouvons définir l'histoire de vie des huîtres comme les interactions passées avec différents microorganismes lui permettant de développer une résistance aux prochaines rencontres. Des études ont été entreprises afin de savoir si une stimulation du système immunitaire de l'huître durant les phases précoces du développement et plus tard durant la vie de l'huître, peut avoir des conséquences sur la sensibilité future des huîtres à la maladie. Ces travaux s'intéressent également à la transmission transgénérationnelle des capacités de survie de l'huître et aux mécanismes moléculaires sous-jacents à cette transmission suite à une exposition des huîtres à une microflore environnementale. Ainsi par une combinaison d'approches transcriptomiques, épigénétiques et de metabarcoding, ces travaux de thèse devraient permettre de comprendre l'effet de l'exposition aux microorganismes sur la résistance à la maladie et sa transmission éventuelle à la descendance.

Les travaux entrepris dans le cadre du projet MOREST ont permis de mettre en évidence que le statut reproducteur de l'huître pouvait être impliqué dans le processus de pathogénèse. En période de gamétogénèse, l'huître investirait davantage d'énergie à l'effort de reproduction qu'à l'immunité. Ainsi un compromis entre immunité et reproduction serait mis en place. Par conséquent l'huître serait davantage exposée aux infections par des agents pathogènes (Samain & Mc Combie 2008).

Enfin, un nombre croissant de polluants chimiques et biologiques ne cessent d'augmenter dans les environnements marins notamment en raison des activités humaines. Des études ont montré que l'exposition des huîtres à une algue toxique augmente les mortalités après injection d'une souche de *Vibrio* pathogène de l'huître (*Vibrio tasmaniensis*) (Abi-Khalil et al. 2016; Abi-Khalil et al. 2017). A notre connaissance aucune étude n'a été publiée sur des composés toxiques et leurs liens avec les mortalités d'huîtres. La plupart des études analysent les effets des composés

toxiques sur le système immunitaire de l'huître. Par exemple, l'exposition des huîtres au cuivre affaiblit les fonctions immunitaires des hémocytes (Huang et al. 2018). De même l'exposition au cadmium inhibe la phagocytose (Cao et al. 2018). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que ces composés peuvent jouer un rôle indirect dans les mortalités par un mécanisme de trade off ou en perturbant le système immunitaire de l'huître la rendant ainsi incapable de se défendre contre les agents pathogènes du milieu.

Pour pouvoir faire le lien entre les facteurs que nous avons étudiés dans le cadre de cette thèse et les facteurs que nous venons de citer dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés, nous proposons de mettre en place la même approche holistique que celle développée dans le cadre de la thèse. Par exemple, étudier la dynamique microbienne de l'huître, celle des agents pathogènes et la réponse transcriptomique huître pourrait permettre d'identifier comment ces différents facteurs influencent le pathosystème.

#### IV. Pistes ouvertes pour l'aquaculture durable

Différents moyens de lutte ont été mis en place en aquaculture afin de limiter les pertes économiques dues aux maladies infectieuses, visant soit à atténuer la virulence des agents infectieux incriminés (action directe comme l'usage d'antibiotiques vis-à-vis des infections bactériennes, l'utilisation de protocoles de traitement de l'eau aux UV à titre d'exemple), soit à conserver le caractère indemne de certaines zones ou compartiments d'élevage. Les antibiotiques sont apparus comme une solution efficace pour lutter contre les bactéries. Cependant, l'apparition de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques rend leur utilisation inefficace. Une alternative aux antibiotiques est l'utilisation de probiotiques. Un probiotique est un microorganisme ayant une action favorable sur la santé de l'hôte (Irianto and Austin, 2002). Leur mode d'action est triple, soit ils agissent par exclusion compétitive empêchant ainsi la croissance des bactéries pathogènes, soit ils altèrent directement le métabolisme du pathogène, ou encore agissent en stimulant les réponses immunitaires de l'hôte (Verschuere et al. 2000). L'inconvénient de l'utilisation des probiotiques est que ces derniers présentent une durée de vie limitée dans le milieu nécessitant des ajouts réguliers et rendant ainsi le coût du traitement élevé.

L'utilisation de bactériophages a été récemment utilisée pour le contrôle des maladies bactériennes (Nakai & Park 2002). Les bactériophages sont des virus de bactéries, ils ont l'avantage d'être spécifiques à une bactérie et donc de ne pas affecter les bactéries environnantes. Cependant, Austin et al., 2003 ont mis en évidence un transfert possible de gènes de virulence des bactériophages vers les bactéries (Austin et al. 2003). De plus, certaines bactéries ont présenté l'apparition de résistances envers les phages nécessitant l'utilisation d'un mélange de phages (Fischetti et al. 2006). Enfin, la vaccination est surtout utilisée en pisciculture du fait de l'existence d'un système immunitaire à mémoire adaptative chez les poissons (Austin et al. 2003) alors que les mollusques et crustacés en semblent dénués. Cependant, les vaccins utilisés se heurtent à la difficulté du mode d'administration du vaccin (Lin et al. 2006). Une autre stratégie de lutte est actuellement développée, basée sur la recherche et l'utilisation de molécules douées d'activité inhibitrice du quorum sensing. Le quorum sensing (QS) est un mode de communication entre les bactéries, densité dépendante et régulant l'expression de certains gènes bactériens. Par l'intermédiaire de petites molécules secrétées dans le milieu extérieur, appelées auto-inducteurs, les bactéries sont capables d'activer la transcription de gènes bactériens impliqués dans diverses fonctions physiologiques tels que la luminescence, la formation de biofilms, la conjugaison, la sporulation, la virulence : toxines, enzymes lytiques, sidérophores et molécules d'adhésion (Miller & Bassler 2001). Le mécanisme du quorum sensing n'a pas encore été clairement établi chez toutes les espèces bactériennes et le lien entre facteurs de virulence et quorum sensing reste encore obscur chez certaines souches bactériennes.

Hors, les élevages aquacoles s'effectuant principalement en milieu ouvert, il apparaît donc impossible d'éradiquer un agent infectieux à l'origine d'une maladie lorsque celui-ci est déjà présent dans le milieu naturel et beaucoup des méthodes proposées ci-dessus sont difficilement applicables en conditions naturelles et ne sont donc applicables qu'en écloséries. A l'heure actuelle, la sélection de masse pour une meilleure résistance aux mortalités sur estran constitue donc la seule méthode pour limiter les pertes ostréicoles (Dégremont, Lamy, et al. 2015).

Dans le cadre de la thèse, nous avons démontré que le virus est le facteur déclencheur du processus infectieux. Une possibilité serait donc de sélectionner des huîtres sur la base de la résistance au virus au travers d'une sélection assistée par marqueurs. Cependant d'autres

maladies d'origine bactérienne affectent les huîtres comme c'est le cas depuis 2012 chez les adultes avec l'implication de *Vibrio aestuarianus*.

Nous pourrions ainsi envisager une double sélection : sur la base de la résistance au virus et sur celle des bactéries. En ne sélectionnant que les individus résistants à la fois au virus et aux bactéries, il serait possible de produire des animaux résistants à l'ensemble des maladies. Le problème avec les mécanismes de sélection c'est qu'ils conduisent à des mécanismes de trade off (compromis). Par exemple des études sur l'huître ont montré que la sélection sur estran d'individus résistants engendrait des individus plus petits suggérant un compromis entre résistance et croissance (Dégremont, Garcia, et al. 2015).

Ainsi, ce qui semble le plus raisonnable pour répondre aux exigences d'une aquaculture durable serait de proposer une approche de sélection assistée par marqueurs en se focalisant sur un nombre limité de marqueurs clefs de la résistance au virus et aux bactéries, limitant ainsi les risques de compromis important. Il faudra également suivre ces marqueurs sur le terrain afin de les valider. Ce travail n'est pas simple d'autant plus que nous avons identifié des variants différents du virus entre l'environnement atlantique et l'environnement méditerranéen. L'identification de ces variants dans des environnements différents suggère qu'il pourrait y avoir des mécanismes de virulence différents. A ce jour, leur virulence n'a pas encore été testée. Ces aspects de variants viraux et de ses mécanismes de virulence associés au syndrome de mortalité des huîtres sont en cours d'étude dans le cadre de la thèse de J. Delmotte en association avec des chercheurs de la Tremblade.



## Conclusion générale

Les postulats de Koch ont été largement utilisés pour caractériser les agents responsables d'une série de maladies infectieuses. En vérifiant ces postulats, le lien entre un agent pathogène et une maladie a été démontré de façon expérimentale. Ces postulats ont donc façonné notre façon d'appréhender l'étude des maladies infectieuses. Ainsi, le syndrome de mortalité affectant les juvéniles d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* a été analysé par des approches réductionnistes qui n'étaient pas adaptées pour caractériser le rôle respectif et le poids des différents éléments du pathosystème.

Pour la première fois, nous avons pu élucider le mécanisme de pathogénèse affectant les juvéniles d'huîtres en approchant le paramètre diversité de la maladie. En effet, différents environnements infectieux et différents génotypes hôte ont été testés. Ceci a été rendu possible par la mise en place d'une approche holistique combinant différentes méthodes : RNAseq, barcoding 16S, suivi des agents pathogènes, analyses histologiques et infections expérimentales rationalisées. Nous avons également utilisé un modèle d'infection expérimentale écologiquement réaliste qui permet de reproduire la voie naturelle de l'infection en conditions contrôlées.

Nous avons ainsi démontré dans une première partie que le syndrome est causé par une infection multiple avec comme première étape nécessaire l'infection des cellules immunocompétentes de l'huître par un herpès virus nommé OsHV-1 $\mu$ var. La réplication du virus amène à un état immunodéprimé de l'huître qui laisse place à une infection bactérienne secondaire par des bactéries pathogènes opportunistes. Cette deuxième étape du processus infectieux mène à une septicémie entraînant la mort des huîtres. Enfin, dans une seconde partie, nous avons démontré que ce mécanisme est conservé le long des côtes françaises.

Les travaux réalisés durant cette thèse ont également permis d'identifier des biomarqueurs d'huîtres et du microbiote associés au statut de résistance et de sensibilité des huîtres. Ceci contribuera à l'émergence de nouvelles méthodes et pratiques culturelles en utilisant par exemple un microbiote protecteur ou un système immunitaire renforcé rendant les huîtres mieux adaptées à un environnement donné. D'un point de vue fondamental, l'approche holistique mise en place

durant cette thèse pourrait être applicable à d'autres pathosystèmes d'étiologie complexe qui restent inexpliqués à ce jour.

Nous avons, au travers de ce travail, caractérisé le mécanisme de pathogénèse du syndrome de mortalité des huîtres juvéniles dans des conditions permissives. On sait aujourd'hui que ce pathosystème est influencé par toute une série d'autres facteurs (température, histoire de vie, contaminants, (co) adaptation des partenaires du système, ...). De futures études devront s'atteler à analyser ces facteurs et en quoi ils jouent sur le système et ses différents éléments. Ceci permettra de compléter la compréhension de ce syndrome qui est en perpétuelle évolution et qui sévit dans un environnement soumis aux changements globaux.



## Références bibliographiques

- Abi-Khalil, C. et al., 2016. Exposure to the paralytic shellfish toxin producer *Alexandrium catenella* increases the susceptibility of the oyster *Crassostrea gigas* to pathogenic vibrios. *Toxins*, 8(1), pp.1–14.
- Abi-Khalil, C. et al., 2017. The paralytic shellfish toxin, saxitoxin, enters the cytoplasm and induces apoptosis of oyster immune cells through a caspase-dependent pathway. *Aquatic Toxicology*, 190, pp.133–141.
- Adu-Prah, S. & Kofi Tetteh, E., 2015. Spatiotemporal analysis of climate variability impacts on malaria prevalence in Ghana. *Applied Geography*, 60, pp.266–273.
- Aguiar-Pulido, V. et al., 2016. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 12, pp.5–16.
- Allam, B., Paillard, C. & Ford, S.E., 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(3), pp.221–231.
- Almand, E.A., Moore, M.D. & Jaykus, L.A., 2017. Virus-bacteria interactions: An emerging topic in human infection. *Viruses*, 9(3), pp.1–10.
- Arzul, I. et al., 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*, 84(1–2), pp.151–160.
- Arzul, I. et al., 2001. French scallops: A new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, 290(2), pp.342–349.
- Austin, B., 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), pp.310–317.
- Austin, B., Pride, A.C. & Rhodie, G.A., 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *Journal of Fish Diseases*, 26(1), pp.55–58.
- Azéma, P. et al., 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), p.23.
- Baba, M. et al., 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), pp.5698–5703.
- Bachère, E. et al., 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198(1), pp.149–168.
- Bachère, E. et al., 1990. Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and Comparative Immunology*, 14(3), pp.261–268.
- Bachère, E., Hervio, D. & Mialhe, E., 1991. Lumhol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11, pp.173–180.
- Bacterio.net.2014. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.net/vibrio.html>.

- Bai, C. et al., 2015. Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124, pp.98–106.
- Bai, C.M. et al., 2018. Dual transcriptomic analysis of Ostreid herpesvirus 1 infected *Scapharca broughtonii* with an emphasis on viral anti-apoptosis activities and host oxidative bursts. *Fish and Shellfish Immunology*, 82, pp.554–564.
- Barber, A.B.J. et al., 2016. *Haplosporidium nelsoni* ( MSX ) Epizootic in the Piscataqua River Estuary (Maine / New Hampshire). *American Society of Parasitologists*, 83(1), pp.148–150.
- Barbosa-Solomieu, V. et al., 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *Journal of Virological Methods*, 119(2), pp.65–72.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T. & Travers, M.A., 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*, 131, pp.2–10.
- Bataillon, T.M. et al. 2010. Evolution expérimentale. Thomas F, Lefèvre T, Raymond M, editors. *Biologie Evolutive : de boeck*, pp.617–646
- Berthomieu, L. et al., 2010. Malignant pertussis: 3 case reports. *Archives of pediatrics*, 17, pp.144–148.
- Bertrand, L., 2001. Plasmodium falciparum: In vitro growth inhibition by febrile temperatures. *Parasitology Research*, 87(7), pp.553–555.
- Boehm, T. & Swann, J.B., 2014. Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2(1), pp.259–283.
- Bonneaud, C. et al., 2018. Rapid antagonistic coevolution in an emerging pathogen and its vertebrate host. *Current Biology*, pp.1–6.
- Bourne, D.G. et al., 2009. Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology*, 17(12), pp.554–562.
- Bricelj, V.M. et al., 1992. Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*, 11(2), pp.331–347.
- Brogden, K. & Guthmiller, J., 2002. *Polymicrobial Diseases Washington (DC)*: ASM Press ed.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), pp.238–250.
- Brown, M.J.F. & Paxton, R.J., 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), pp.410–416.
- Bruto, M. et al., 2018. Ancestral gene acquisition as the key to virulence potential in environmental *Vibrio* populations. *The ISME Journal*, 12, pp.2954–2966.
- Bruto, M. et al., 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal*, 11(4), pp.1043–1052.
- Bulet, P., Stöcklin, R. & Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, pp.169–184.
- Burge, C.A., Strenger, R.E. & Friedman, C.S., 2011. Detection of the oyster herpesvirus in commercial bivalves in northern California, USA: Conventional and quantitative PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(2), pp.107–116.
- Cao, R. et al., 2018. The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 81, pp.456–462.
- Chou Hsin-Yiu et al., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23(3), pp.165–173.

- Chu, F. & La Peyre, J., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*. temperature effects. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16, pp.223–234.
- Cirimotich, C.M. et al., 2011. Natural microbe - mediated refractoriness to Plasmodium infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332(6031), pp.855–858.
- Cochennec-Laureau, N. et al., 2010. « Bilan des journées de surmortalité des huîtres creuses, *Crassostrea gigas* ». Aquaculture Durable des 8 et 9 décembre 2009. Ifremer, p.5.
- Collins, K.R. et al., 2002. Impact of Tuberculosis on HIV-1 Replication, Diversity and Disease Progression. *Aids Reviews*, 4, pp.165–176.
- Comps, M., 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates (*Ostrea edulis*) dans le Bassin de Marennes. *Communication présentée au Congrès International de la Mer 1970, Comité des Crustacés, coquillages et benthos*, 34, pp.317–326.
- Comps, M. et al., 1976. Une virose de l'huître portugaise (*Crassostea angulata*). *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris*, 282(22), pp.139–142.
- Comps, M. & Cochennec, N., 1993. comps1993.pdf.
- Costa, R. et al., 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture*, 164(1–4), pp.297–309.
- Creti, R. et al., 2017. Neonatal group B streptococcus infections: Prevention strategies, clinical and microbiologic characteristics in 7 years of surveillance. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(3), pp.256–262.
- Cserti, C.M. & Dzik, W.H., 2015. Review article The ABO blood group system and *Plasmodium falciparum* malaria. *Blood*, 110(7), pp.2250–2259.
- Cutler, R.G., 1991. Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 621(1), pp.1–28.
- Cyrklaff, M. et al., 2012. Host actin remodeling and protection from malaria by hemoglobinopathies. *Trends in Parasitology*, 28(11), pp.479–485.
- Dahl, S.F. et al., 2011. Effects of temperature on hard clam (*Mercenaria mercenaria*) immunity and QPX (Quahog Parasite Unknown) disease development: II. Defense parameters. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2), pp.322–332.
- Darnell, J.E.J., Kerr, I.M. & Stark, G.R., 1994. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation to IFNs Response and Other Transcriptional Activation in Extracellular Signaling Proteins. *Science*, 264(5164), pp.1415–1421.
- De Jongste, J.C. & Shields, M.D., 2003. Cough-2: Chronic cough in children. *Thorax*, 58(11), pp.998–1003.
- De Kantzow, M. et al., 2016. Effect of water temperature on mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas* associated with microvariant ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1  $\mu$ Var). *Aquaculture Environment Interactions*, 8(2010), pp.419–428.
- De La Rocque, S. & Rioux, J.A., 2008. Influence des changements climatiques sur l'épidémiologie des maladies transmissibles. *Bull Soc Pathol Exot*, 3(2), pp.213–219.
- De Lorgeril, J. et al., 2018. Inefficient immune response is associated with microbial permissiveness in juvenile oysters affected by mass mortalities on field. *Fish and Shellfish Immunology*, 77, pp.156–163.

- Dégremont, L. et al., 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture*, 408–409, pp.51–57.
- Dégremont, L., Lamy, J.-B., et al., 2015. New Insight for the Genetic Evaluation of Resistance to Ostreid Herpesvirus Infection, a Worldwide Disease, in *Crassostrea gigas*. *PloS one*, 10(6), pp.1–12
- Dégremont, L., Garcia, C. & Allen, S.K., 2015. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, pp.226–241.
- Delaporte, M., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology*, 206(17), pp.3053–3064.
- Dodson, B.L. et al., 2014. Wolbachia Enhances West Nile Virus (WNV) Infection in the Mosquito *Culex tarsalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7).
- Dollfus, R.-P., 1921. *Notes et Mémoires N°7 - Résumé de nos principales connaissances pratiques sur les Maladies et les Ennemis de l'Huître* ED. BLONDEL.
- Donaghy, L. et al., 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS ONE*, 7(10), pp.1–10.
- Duchet Niedziolka, P. et al., 2008. Vaccination antivirale des adultes immunodéprimés, revue de la littérature. *Revue de Medecine Interne*, 29(7), pp.554–567.
- Ducluzeau, R. et al., 1977. Antagonistic effect of extremely oxygen sensitive clostridia from the microflora of conventional mice and of *Escherichia coli* against *Shigella flexneri* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Infection and Immunity*, 17(2), pp.415–424.
- Duperthuy, M. 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*. *Environmental Microbiology*, 12(4), pp.951–963.
- Duperthuy, M. et al., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp.2993–8.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oysters. *European Food Safety Authority Journal*, 8(11), pp.1–60.
- Ellertsdóttir, E. & Peters, A.F., 1997. High prevalence of infection by endophytic brown algae in populations of *Laminaria spp.* (*Phaeophyceae*). *Marine Ecology Progress Series*, 146(1–3), pp.135–143.
- Elsa, M., Ilaria, S. & Oliver, H., 2018. Preventing HIV transmission through blockade of CCR5: Rationale, progress and perspectives. *Swiss Medical Weekly*, 148(3–4), pp.1–13.
- Enríquez-Díaz, M. et al., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5), pp.491–506.
- Escoubas, J.M. et al., 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*, 453(3), pp.293–298.
- Evans, A.S., 1976. Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 49(2), pp.175–195.
- Fabioux, C. et al., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(1–2), pp.458–470.
- Falkow, S., 1988. Molecular Koch's Postulates Applied to Microbial Pathogenicity. *Clinical Infectious Diseases*, pp.S274–S276.



- FAO, 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and agriculture organization of the united nations. *Fisheries and Aquaculture Department*.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Food and agriculture organization of the united nations. *Fisheries and Aquaculture Department*.
- Farley, C.A., 1978. Viruses and Viruslike Lesions in Marine Mollusks. *Marine Fisheries Review*, 40(10), pp.18–20.
- Fischetti, V.A., Nelson, D. & Schuch, R., 2006. Reinventing phage therapy: Are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology*, 24(12), pp.1508–1511.
- Ford, S.E. et al., 2002. Aquaculture-associated factors in QPX disease of hard clams: Density and seed source. *Aquaculture*, 208(1–2), pp.23–38.
- Ford, S.E., 2001. Pests, parasites, diseases and defense mechanisms of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Biology of the Hard Clam*, 31(C), pp.591–628.
- Foulon, V. et al., 2016. Colonization of Polystyrene Microparticles by *Vibrio crassostreae*: Light and Electron Microscopic Investigation. *Environmental Science and Technology*, 50(20), pp.10988–10996.
- French, L., Horton, J. & Matousek, M., 2004. Abnormal vaginal discharge: what does and does not work in treating underlying causes. *The Journal of family practice*, 53(11), pp.890–4.
- Freytmuth, F., 2004. Virus syncytial respiratoire et virus para-influenza humains: Épidémiologie. *EMC - Pédiatrie*, 1(1), pp.2–11.
- Friedman, C.S. et al., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63(1), pp.33–41.
- Fuhrmann, M. et al., 2016. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture Environment Interactions*, 8, pp.543–552.
- Galinier, R. et al., 2013. Biomphalysin, a New  $\beta$  Pore-forming Toxin Involved in Biomphalaria glabrata Immune Defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*, 9(3).
- Garnier, M., Labreuche, Y. & Nicolas, J.L., 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(5), pp.358–365.
- Gast, R.J. et al., 2008. Environmental distribution and persistence of Quahog Parasite Unknown (QPX). *Diseases of Aquatic Organisms*, 81(3), pp.219–229.
- Gay, M. et al., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(1–2), pp.65–74.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, pp.S10–S19.
- Genersch, E. et al., 2006. Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1), pp.61–63.
- Gibbs, R.S., Schrag, S. & Schuchat, A., 2004. Perinatal infections due to group B *Streptococci*. *Obstetrics and Gynecology*, 104(5 I), pp.1062–1076.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E., 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), pp.105–108.
- Gill, S. et al., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), pp.1355–1359.

- Goarant, C. et al., 1998. Acquisition of susceptibility to *Vibrio penaeicida* in *Penaeus stylirostris* postlarvae and juveniles. *Aquaculture*, 169(3–4), pp.291–296.
- Goudenège, D. et al., 2015. A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environmental Microbiology*, 17(11), pp.4189–4199.
- Goulson, D. et al., 2015. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229).
- Graystock, P. et al., 2013. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2), pp.114–119.
- Green, T.J. et al., 2014. Anti-viral gene induction is absent upon secondary challenge with double-stranded RNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 39(2), pp.492–497.
- Green, T.J. et al., 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology*, 96, pp.2471–2482.
- Green, T.J. et al., 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Veterinary Research*, 47(1), pp.1–11.
- Green, T.J. et al., 2015. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. *Fish Shellfish Immunol*, 47(1), pp.435–443.
- Green, T.J. & Montagnani, C., 2013. Poly I: C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 microvar). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(2), pp.382–388.
- Green, T.J. & Speck, P., 2018. Antiviral defense and innate immune memory in the oyster. *Viruses*, 10(3), pp.1–11.
- Grimprel, E. & Bassinet, L., 2006. Formes cliniques de la coqueluche: Du nourrisson à l'adulte. *Medecine Therapeutique Pediatrie*, 9(3), pp.138–146.
- Guillaud, J.F., 1992. Les rejets urbains en mer. *Hydrocol. Appl.*, 2, pp.159–172.
- Guo D. Hedgecock, W.K. Hershberger, K. Cooper, and S.K. Allen Jr., X., 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution*, 52(2), pp.394–402.
- Guo, X. et al., 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), pp.107–119.
- Guo, X. & Ford, S.E., 2016. Infectious diseases of marine mollusks and host responses as revealed by genomic tools. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1689).
- Gutierrez, A.P. et al., 2018. A Genome-Wide Association Study for Host Resistance to Ostreid Herpesvirus in Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *Genes|Genomes|Genetics*, 8(4), pp.1273–1280
- Hahn, U.K., Bender, R.C. & Bayne, C.J., 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 24(6–7), pp.531–541.
- Hamidou, R.L. et al., 2018. Influence des facteurs climatiques sur la morbidité palustre à Tillabéry au Niger. *Médecine d'Afrique Noire*, 65(7), pp. 388–396.
- Harris, J., 2008. Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *Aquatic Invasive Species Profile*, pp.1–12.
- Haryadi, D. et al., 2015. Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis spp.* (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 38(5), pp.419–428.

- Hasegawa, H. et al., 2008. The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), pp.4101–4110.
- Havlickova B, Czaika VA & Fredrich M, 2008. Epidemiological trends in skin mycosis worldwide. *Mycosis*, 51(4), pp.2–15.
- He, X. et al., 2011. A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6), pp.1247–1250.
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S.E., et al., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), pp.131–144.
- Hegerle, N. & Guiso, N., 2013. Epidemiology of whooping cough & typing of *Bordetella pertussis*. *Future Microbiology*, 8(11), pp.1391–1403.
- Henry, M. et al., 2017. Predictive systems models can help elucidate bee declines driven by multiple combined stressors. *Apidologie*, 48(3), pp.328–339.
- Hine, P., Wesney, B. & Hay, B., 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, pp.135–142.
- Hine, P.M. & Thorne, T., 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: An ultrastructural study. *Disease of Aquatic Organisms*, 29(3), pp.189–196.
- Hine, P.M., Wesney, B. & Besant, P., 1998. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32(3), pp.161–171.
- Huang, X. et al., 2018. Effects of copper on hemocyte parameters in the estuarine oyster *Crassostrea rivularis* under low pH conditions. *Aquatic Toxicology*, 203, pp.61–68.
- Ifremer, R., Réseau Ifremer ECOSCOPIA (Evaluer la qualité des écosystèmes conchylicoles en lien avec les pressions climatiques et anthropiques).
- Iwasa, T. et al., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), pp.371–378.
- Jakobsson-Thor, S. et al., 2018. Seagrass wasting disease varies with salinity and depth in natural *Zostera marina* populations. *Marine Ecology Progress Series*, 587, pp.105–115.
- Janvier, S. & Heveker, N., 2005. Mystère sur l' origine de la sélection du génotype CCR5  $\Delta$  32, protecteur contre le virus de l'immunodéficience humaine. *Erudit*, 21, pp.577–579.
- Ji, C. et al., 2015. A metabolomic investigation of the effects of metal pollution in oysters *Crassostrea hongkongensis*. *Marine Pollution Bulletin*, 90(1–2), pp.317–322.
- Jia, Z. et al., 2015. An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 53(1), pp.253–264.
- Jindal, S.K., 2018. Koch's postulates – Pitfalls and relevance in the 21st century. *Indian Journal of Tuberculosis*, 65(1), pp.6–7.
- Juranic Lisnic, V. et al., 2013. Dual Analysis of the Murine Cytomegalovirus and Host Cell Transcriptomes Reveal New Aspects of the Virus-Host Cell Interface. *PLoS Pathogens*, 9(9).
- Kamma, J.J., Contreras, A. & Slots, J., 2001. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(9), pp.879–885.



- Kim, K.S., 2010. Acute bacterial meningitis in infants and children. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(1), pp.32–42.
- Kipruto, E.K. et al., 2017. Effect of climatic variability on malaria trends in Baringo County, Kenya. *Malaria Journal*, 16(1), pp.1–11.
- Klein, S. et al., 2017. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(4), pp.268–278.
- Koch, R., 1876. Untersuchungen ueber Bakterien V. Die Aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begruendend auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus Anthracis*. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, pp.277–310.
- Koch Robert, 1882. The etiology of tuberculosis. *Berl Klin Wochenschr*, 15, pp.221–230.
- Koh, L.P., 2008. Assessing ecological responses to environmental change using statistical models. *Journal of Applied Ecology*, pp.1321–1329.
- Kohen, R. & Nyska, A., 2002. Toxicologic Pathology. *Toxicologic Pathology*, 30(6), pp.620–650.
- Krajcsi, P. & Wold, W.S.M., 1998. Inhibition of tumor necrosis factor and interferon triggered responses by DNA viruses. *Seminars in cell & developmental biology*, 9, pp.351–358.
- Kuss, S.K. et al., 2011. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science*, 334(6053), pp.249–252.
- Kwiatkowski, D., 1989. Febrile temperatures can synchronize the growth of *plasmodium falciparum* in vitro. *Journal of Experimental Medicine*, 169 (1), pp.357–361.
- Labreuche, Y. et al., 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5), pp.753–758.
- Lagier, J.C. et al., 2017. Koch Postulate: Why Should we Grow Bacteria? *Archives of Medical Research*, 48(8), pp.774–779.
- Lambert, C. et al., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish and Shellfish Immunology*, 15(3), pp.225–240.
- Lane, E. & Birkbeck, T.H., 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve molluscs is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *Journal of Fish Diseases*, 23(4), pp.275–279.
- Langand, A.J. & Morand, S., 1998. Heritable non-susceptibility in an allopatric host–parasite system: *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) – *Echinostoma caproni* (*platyhelminth Digenea*). *J. Parasitol*, 84(4), pp.739–742.
- Le Deuff, R.-M. & Renault, T., 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes- like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, 80(1999), pp.1317–1322.
- Le Roux, F., Wegner, K.M. & Polz, M.F., 2016. Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends Microbiol*, 24(7), pp.568–580.
- Lemire, A. et al., 2014. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *The ISME journal*, (9), pp.1–9.
- Lemire, A. et al., 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *ISME Journal*, 9(7), pp.1523–1531.
- Li, Y. et al., 2017. The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 71, pp.59–69.

- Lin, J.H.Y. et al., 2006. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachycentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture*, 255(1–4), pp.125–132.
- Lingnau, A. et al., 1993. The effect of hormones on the gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Applied Parasitology*, 34, pp.153–160.
- Loker, E.S. et al., 1982. Ultrastructure of Encapsulation of *Schistosoma mansoni* Mother Sporocysts by Hemocytes of Juveniles of the 10-R2 Strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, 68(1), pp.84–94.
- Lokmer, A., Goedknegt, M.A., et al., 2016. Spatial and temporal dynamics of pacific oyster hemolymph microbiota across multiple scales. *Frontiers in Microbiology*, 7, pp.1–18.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F., et al., 2016. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18(3), pp.970–987.
- Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F., et al., 2016. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18(3), pp.970–987.
- Lokmer, A. & Mathias Wegner, K., 2015a. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME journal*, 9(3), pp.670–82.
- Lokmer, A. & Mathias Wegner, K., 2015b. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9(3), pp.670–682.
- Lyons, M.M. et al., 2007. Epizootiology of Quahog Parasite unknown (QPX) disease in northern quahogs (=hard clams) *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Shellfish Research*, 26(2), pp.371–381.
- Maloy, A.P. et al., 2007. *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as Roseovarius Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 269(1–4), pp.71–83.
- Martenot, C. et al., 2017. Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *PLoS ONE*, 12(5), pp.1–19.
- Martenot, C. et al., 2016. In situ localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, pp.124–135.
- Martenot, C., 2013. Les variants du virus herpétique ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. *Virology*, 17(2), pp.81–87.
- Mazereeuw-Hautier, J., 2006. Formation Médicale Continue. *Ann Dermatol Venereol*, 52(4), pp.91–92.
- Mccollough, C.B. et al., 2007. Acquisition and Progression of *Perkinsus Marinus* Infections By Specific-Pathogen-Free Juvenile Oysters (*Crassostrea Virginica* Gmelin) in a Mesohaline Chesapeake Bay Tributary. *Journal of Shellfish Research*, 26(2), pp.465–477.
- McCullers, J.A., 2014. The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nature Reviews Microbiology*, 12(4), pp.252–262.
- Mermoud, I. et al., 1998. “Syndrome 93” in New Caledonian outdoor rearing ponds of *Penaeus stylirostris*: History and description of three major outbreaks. *Aquaculture*, 164(1–4), pp.323–335.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), pp.31–46.
- Meyer, J.L. et al., 2016. Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. *ISME Journal*, 10(5), pp.1204–1216.

- Miller & Bassler, 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 165–199.
- Miossec, L., Le Deuff, R.-M. & Goulletquer, P., 2009. Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Cooperative Research Report*, 299(299), p.42.
- Mitta, G. et al., 2017. *The Compatibility Between Biomphalaria glabrata Snails and Schistosoma mansoni: An Increasingly Complex Puzzle*. *Advances in Parasitology*, 97, pp. 111–145
- Moazeni, M. & Khademolhoseini, A.A., 2016. Ovicidal effect of the methanolic extract of ginger (*Zingiber officinale*) on *Fasciola hepatica* eggs: an in vitro study. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3), pp.662–666.
- Mogensen, T.H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), pp.240–273.
- Mohney, L.L., Lightner, D. V. & Bell, T.A., 1994. An Epizootic of Vibriosis in Ecuadorian Pond-Reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). *Journal of the World Aquaculture Society*, 25(1), pp.116–125.
- Moné, Y. et al., 2010. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9).
- Montagnani, C. et al., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF- $\kappa$ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*, 561(1–3), pp.75–82.
- Montagnani, C., Labreuche, Y. & Escoubas, J.M., 2008. Cg-I $\kappa$ B, a new member of the I $\kappa$ B protein family characterized in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(3), pp.182–190.
- Mordecai, E.A. et al., 2013. Optimal temperature for malaria transmission is dramatically lower than previously predicted. *Ecology Letters*, 16(1), pp.22–30.
- Morga, B. et al., 2017. Contribution of in Vivo Experimental Challenges to Understanding Flat Oyster *Ostrea edulis* Resistance to *Bonamia ostreae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, pp.1–13.
- Nakai, T. & Park, S.C., 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*, 153, pp.13–18.
- Nazzi, F. et al., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathogens*, 8(6), pp.e1002737.
- Neijens, H.J. et al., 2012. Pneumococcal Meningitis in Children: Prognostic Indicators and Outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 21(6), pp.1390–1397.
- Nunn, K.L. et al., 2015. Enhanced trapping of HIV-1 by human cervicovaginal mucus is associated with *Lactobacillus crispatus*-dominant microbiota. *mBio*, 6(5), pp.1–9.
- Nyirjesy, P., 2001. Chronic vulvovaginal candidiasis. *American Family Physician*, 63(4), pp.697–702.
- Ogimura, T. et al., 2012. Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria. *Fisheries Science*, 78(6), pp.1255–1262.
- Paillard, C., 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources*, 17(4), pp.467–475.
- Paillard, C. et al., 2014. A theoretical individual-based model of Brown Ring Disease in Manila clams, *Venerupis philippinarum*. *Journal of Sea Research*, 91, pp.15–34.
- Paillard, C. & Maes, P., 1994. Brown ring disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: Establishment of a classification system. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19(2), pp.137–146.

- Paquet, C. & Yudin, M.H., 2016. Toxoplasmose pendant la grossesse : Prévention, dépistage et traitement. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 38(12), pp.S189–S196.
- Parizadeh, L. et al., 2018. Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology*.
- Paul-pont, I., Dhand, N.K. & Whittington, R.J., 2013. Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 413, pp.202–214.
- Pawlowski, A. et al., 2012. Tuberculosis and HIV co-infection. *PLoS Pathogens*, 8(2).
- Pernet, 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. *Aquaculture Environment Interactions*, 2(3), pp.215–237.
- Pernet, F. et al., 2011. Mortalités massives de l’Huître creuse: causes et perspectives. *Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’huîtres creuses Crassostrea gigas dans l’étang de Thau*, p.77.
- Pernet, F. et al., 2014. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS ONE*, 9(2).
- Pernet, F., Tamayo, D. & Petton, B., 2015. Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture*, 445(August 2009), pp.57–62.
- Petton, B., Bruto, M., et al., 2015. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Frontiers in microbiology*, 6, p.686.
- Petton, B., Boudry, P., et al., 2015. Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 6(3), pp.205–222.
- Petton, B. et al., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environment*, 3(3), pp.257–273.
- Petton, B. et al., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 3(3), pp.257–273.
- Pichot, Y. et al., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l’huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue des Travaux de l’Institut des Pêches Maritimes*, 43(1), pp.131–140.
- Pilling, E.D. & Jepson, P.C., 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science*, 39(4), pp.293–297.
- Ploquin, E.F., Herrera, J.M. & Obeso, J.R., 2013. Bumblebee community homogenization after uphill shifts in montane areas of northern Spain. *Oecologia*, 173(4), pp.1649–1660.
- Potts, S.G. et al., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6), pp.345–353.
- Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), pp.59–65.
- Qu, T. et al., 2015. Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in *Crassostrea gigas* clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 51(1), pp.74–78.



- Randall, R.E. & Goodbourn, S., 2008. Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 89(1), pp.1–47.
- Renault, T. et al., 2000. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42(3), pp.173–183.
- Renault, T. et al., 2014. Genotyping of a microsatellite locus to differentiate clinical Ostreid herpesvirus 1 specimens. *Veterinary Research*, 45(1), p.3.
- Renault, T., Lipart, C. & Arzul, I., 2001. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases*, 24(6), pp.369–376.
- Roberts, M.R. & Paul, N.D., 2006. Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist*, 170, pp.677–699.
- Rodrigues, P. de S. et al., 2015. Are herpes virus associated to aggressive periodontitis? A review of literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 19(3), p.348.
- Rodríguez-Díaz, J. et al., 2017. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. *Scientific Reports*, 7, pp.1–10.
- Roger, E. et al., 2008. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: New candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157(2), pp.205–216.
- Roizman, B. & Sears, A.E., 1987. Herpes simplex virus latency. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 41, pp.543–71.
- Rosa, R.D. et al., 2012. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC genomics*, 13(1), p.252.
- Rosani, U. et al., 2015. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology*, 17(11), pp.4200–4212.
- Rosani, U. & Venier, P., 2017. Oyster RNA-seq Data Support the Development of Malacoherpesviridae Genomics. *Front Microbiol*, 8, p.1515.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), pp.S96–S119.
- Rubio, T. 2014-2017. Diversité des mécanismes d'interactions des vibrios du clade Splendidus et de leur hôte, l'huître creuse *Crassostrea giga*. Thèse de Doctorat en Biologie des interactions. Université de Montpellier.
- Sachs, J.D. & Malaney, P., 2002. The economic and social burden of malaria. *Nature*, 415(6872), pp.680–685.
- Samain, J.-F. & Helen, M., 2007. *Mortalités estivales de l'huître creuse Crassostrea gigas*. QUAE ed.
- Samain, J.-F. & Mc Combie, H., 2008. *Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. The MOREST project*. QUAE ed.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K., 2014. Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE*, 9(4), pp.94442.
- Sauvage, C. et al., 2010. QTL for resistance to summer mortality and OSHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics*, 41(4), pp.390–399.

- Sawabe, T. 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. *Frontiers in Microbiology*, 4, pp.1–14.
- Schmitt, P. et al., 2012. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In *Oysters*. pp. 227–273.
- Schmuck, R., Stadler, T. & Schmidt, H.W., 2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, *Hymenoptera*). *Pest Management Science*, 59(3), pp.279–286.
- Segarra, A. et al., 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153(1), pp.92–99.
- Segarra, A. et al., 2016. Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 133, pp.59–65.
- Shannon, B., Yi, T.J., et al., 2017. Association of HPV infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunology*, 10(5), pp.1310–1319.
- Shannon, B., Gajer, P., et al., 2017. Distinct effects of the cervicovaginal microbiota and herpes simplex type 2 infection on female genital tract immunology. *Journal of Infectious Diseases*, 215(9), pp.1366–1375.
- Sih, A., Bell, A.M. & Kerby, J.L., 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(6), pp.274–276.
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology*, 6(2), pp.197–208.
- Teodoro, J.G. & Branton, P.E., 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of virology*, 71(3), pp.1739–1746.
- Terahara, K. et al., 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(8), pp.667–683.
- Theron, A. et al., 2008. Effects of laboratory culture on compatibility between snails and schistosomes. *Parasitology*, 135(10), pp.1179–1188.
- Théron, A. & Coustau, C., 2005. Are Biomphalaria snails resistant to *Schistosoma mansoni* ? *Journal of Helminthology*, 79(3), pp.187–191.
- Thomspon, F., Lida, T. & Swings, J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Journal of Clinical Microbiology*, 68(1), pp.403–431.
- Tikunov, A.P. et al., 2010. Metabolomic investigations of American oysters using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Marine Drugs*, 8(10), pp.2578–2596.
- Tosti, A., Shaurya, K. & Piraccini, B.M., 2015. Dermatophyte infections. *European Handbook of Dermatological Treatments, Third Edition*, pp.209–217.
- Travers, M. et al., 2014. Archimer Characterization of isolates and detection during mortality events. , 123, pp.38–48.
- Travers, M.A. et al., 2017. Several strains, one disease: Experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research*, 48(1), pp.1–8.
- Travers, M.A. et al., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(6), pp.800–808.

- Travers, M.A.S. et al., 2009. Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: An example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology*, 15(6), pp.1365–1376.
- Vanbergen, A.J. et al., 2013. Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(5), pp.251–259.
- Vanhove, A.S. et al., 2016. Copper homeostasis at the host vibrio interface: Lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environmental Microbiology*, 18(3), pp.875–888.
- Vanhove, A.S. et al., 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental Microbiology*, 17(4), pp.1152–1165.
- Verschuere, L. et al., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp.655–671.
- Villegas, L.E.M. et al., 2018. Zika virus infection modulates the bacterial diversity associated with *Aedes aegypti* as revealed by metagenomic analysis. *PLoS ONE*, 13(1), p.e0190352.
- Vonaesch, P., Anderson, M. & Sansonetti, P.J., 2018. Pathogens, microbiome and the host: Emergence of the ecological Koch's postulates. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), pp.273–292.
- Wamaitha, M.J. et al., 2018. Metagenomic analysis of viruses associated with maize lethal necrosis in Kenya. *Virology Journal*, 15(1), pp.1–19.
- Wang, W. et al., 2016. A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, pp.182–190.
- Webster, J.P. & Davies, C.M., 2001. Coevolution and compatibility in the snail schistosome system. *Parasitology*, 123(2001), pp.S41–S56.
- Wegner, K.M. et al., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol*, 13, p.252.
- Wei, L. et al., 2015. Combined metabolome and proteome analysis of the mantle tissue from Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to elevated pCO<sub>2</sub>. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 13(1), pp.16–23. Available at:
- Wendling, C.C., Batista, F.M. & Wegner, K.M., 2014. Persistence, seasonal dynamics and pathogenic potential of vibrio communities from pacific oyster hemolymph. *PLoS ONE*, 9(4), pp.94256.
- Wendling, C.C. & Mathias Wegner, K., 2015. Adaptation to enemy shifts: Rapid resistance evolution to local vibrio spp. in invasive pacific oysters. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1804), pp.2014–2244.
- Wilson, J., 2004. Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sexually Transmitted Infections*, 80(1), pp.8–11.
- Wira, C.R. & Fahey, J. V, 2009. A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle. *National Institutes of Health*, 22(15), pp.1909–1917.
- Wu, G.D. et al., 2016. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut*, 65(1), pp.63–72.
- Xu, J. et al., 2007. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biology*, 5(7), pp.1574–1586.
- Xue, S. et al., 2017. Effects of total ammonia, temperature and salinity on the mortality and viral replication of WSSV-infected Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Aquaculture Research*, 48(1), pp.236–245.



- Yinon, Y. et al., 2010. Infection à cytomégalo­virus pendant la grossesse. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32(4), pp.355–362.
- Zhang, G. et al., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418), pp.49–54.
- Zhang, L. et al., 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports*, 5, pp.1–11.
- Zhang, L., Li, L. & Zhang, G., 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(2), pp.653–660.
- Zhang, L., Li, L. & Zhang, G., 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(5), pp.603–610.
- Zhang, T. et al., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), pp.141–150.
- Zhang, Y. et al., 2013. Characteristic and Functional Analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity. *PLoS ONE*, 8(10), pp.1–15.
- Zhou, Y. et al., 2016. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to Rice black-streaked dwarf virus in maize. *Journal of Experimental Botany*, 67(15), pp.4593–4609.
- Zimmer, B.L. et al., 2014. Quorum sensing signal production and microbial interactions in a polymicrobial disease of corals and the coral surface mucopolysaccharide layer. *PLoS ONE*, 9(9), p.e108541.
- Zipperer, A. et al., 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature*, 535(7613), pp.511–516.

# Annexes

## Annexe 1

Supplementary Informations : « Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in Pacific oysters ».

## Annexe 2

Supplementary Files : « The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments ».

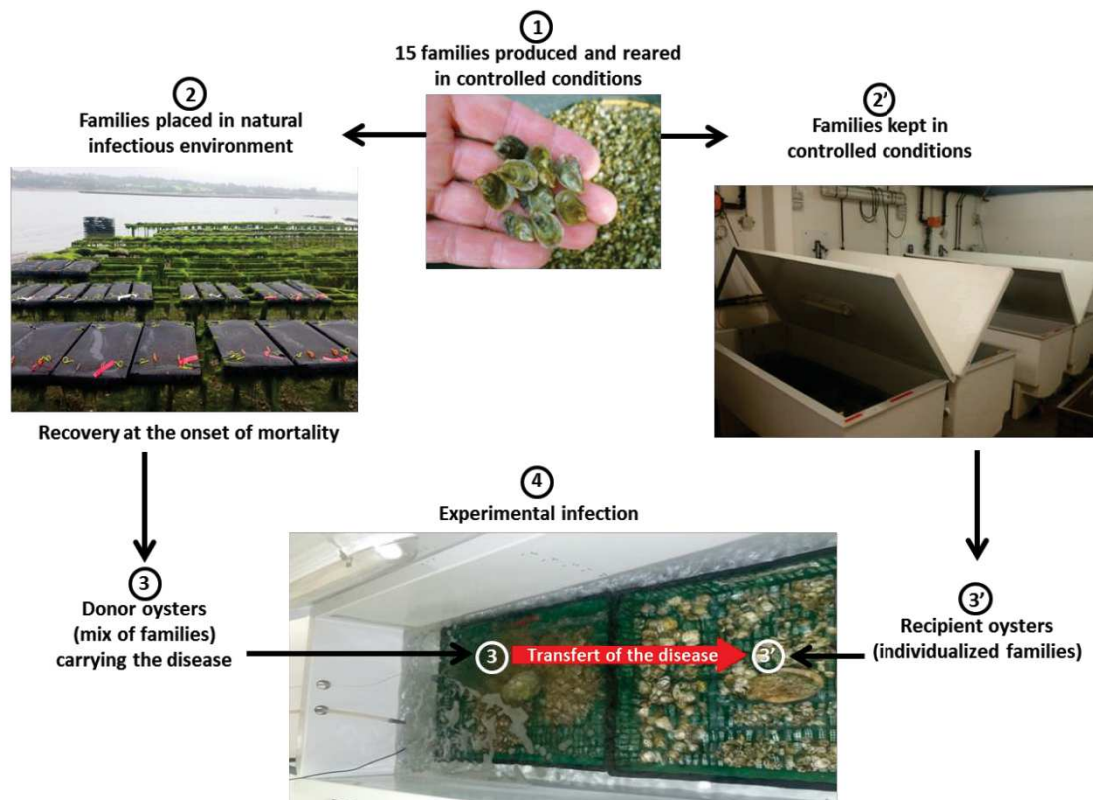
## Annexe 3

Publication en co-auteur : « Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters ».

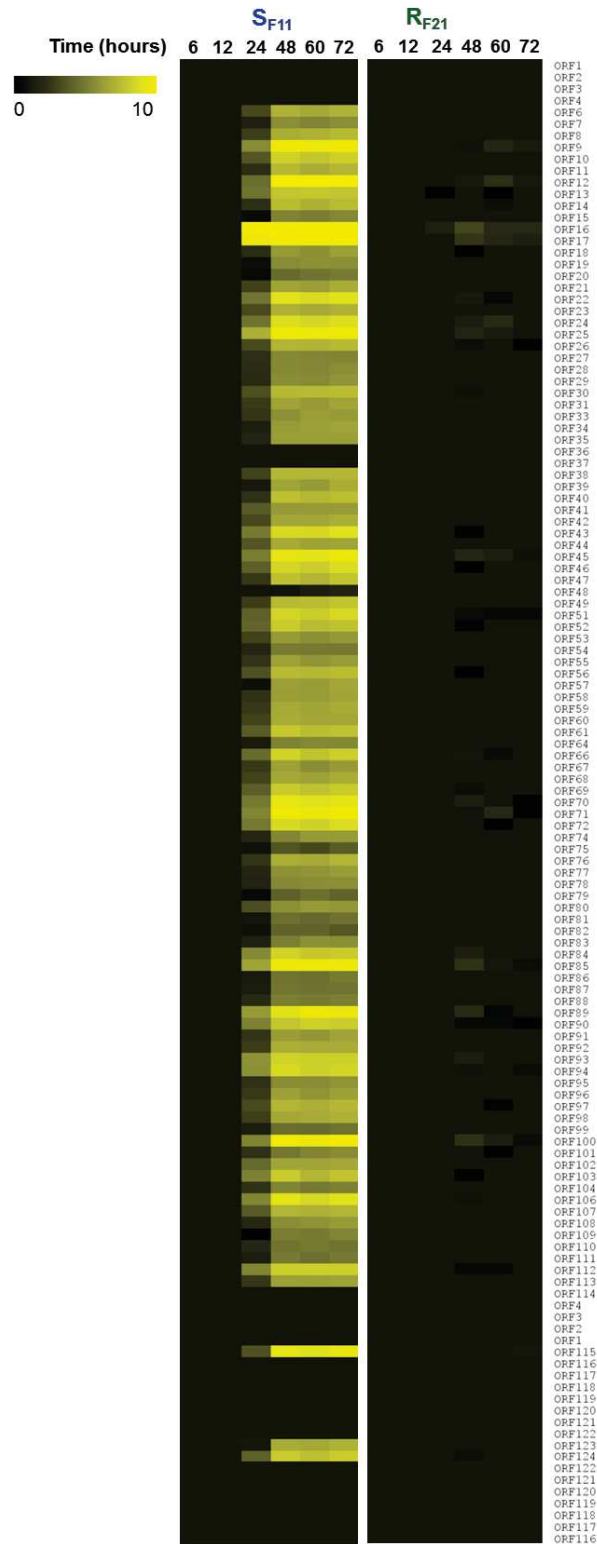
## **Supplementary Information**

**Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteremia in  
Pacific oysters**

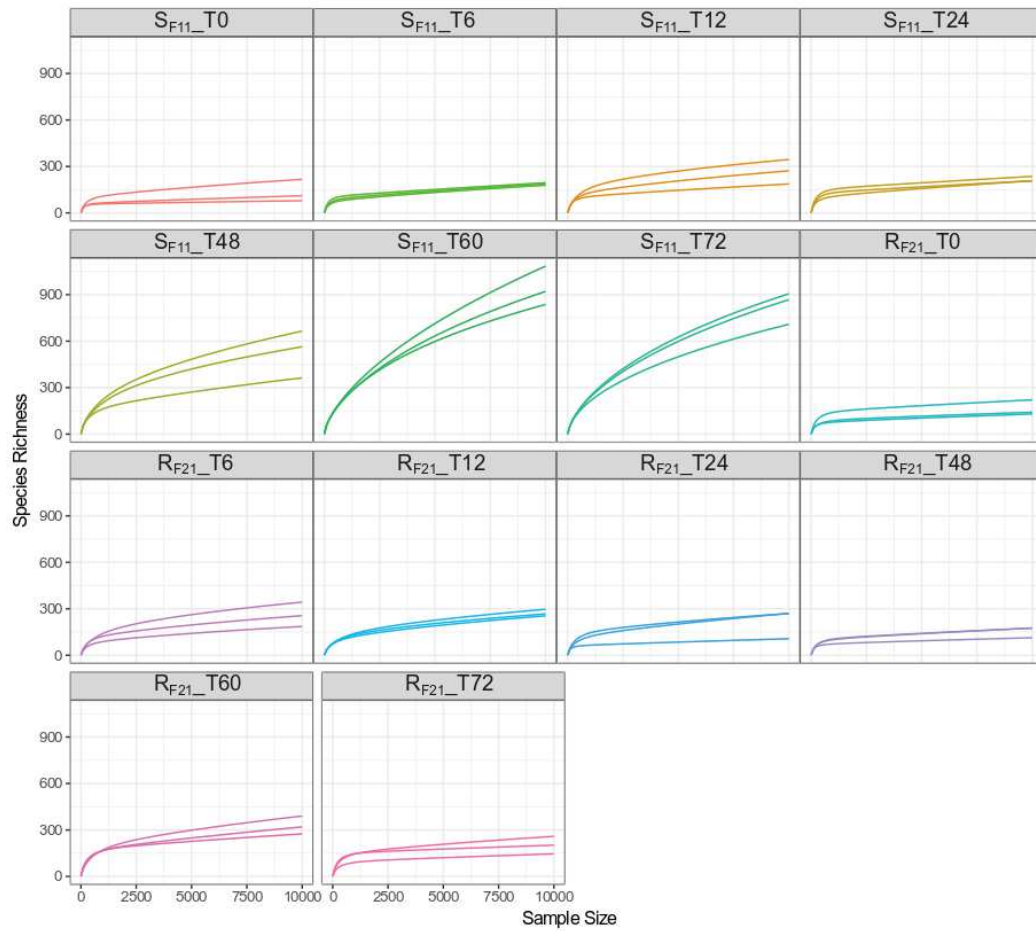
**de Lorgeril et al.**



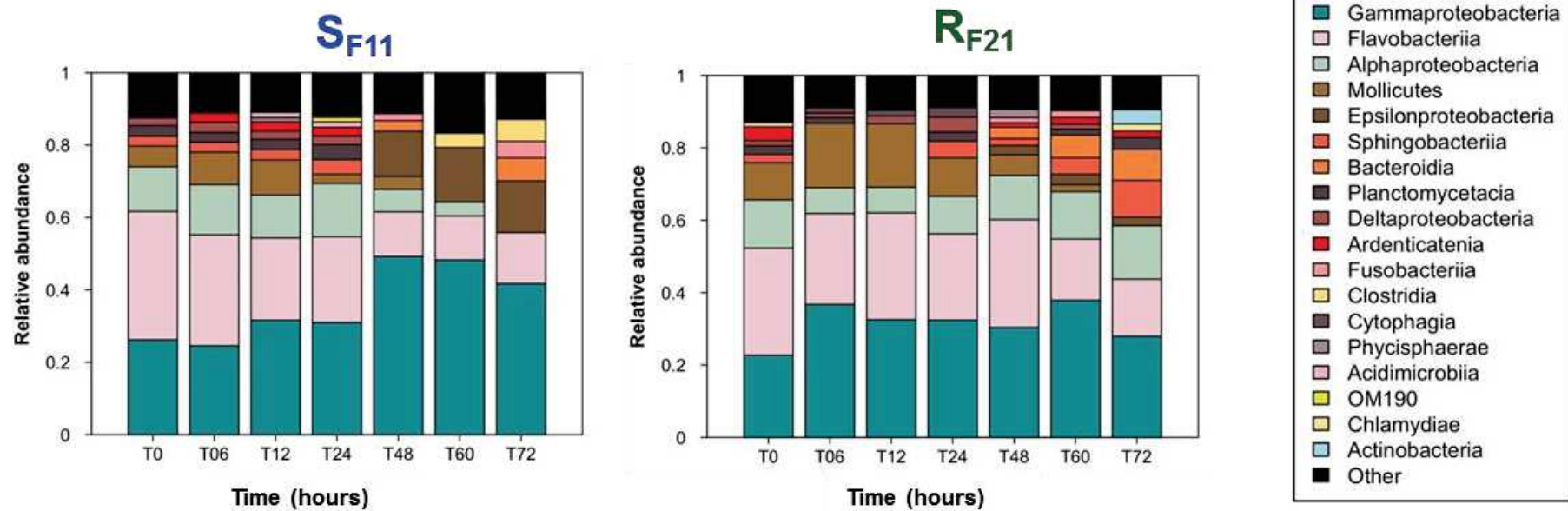
**Supplementary Figure 1: Description of the natural experimental infection.** The protocol was derived from those used in previous studies <sup>1,2</sup>. The oysters were from the families produced and maintained in controlled and biosecured conditions until experimental infection (1). Half of the oysters were placed in a farming area during an infectious period (2) and became the donor oysters carrying the disease (3), while the other half remained in controlled and biosecured conditions (2') and were used as recipient oysters (3'). As soon as mortalities occurred among the donor oysters placed in the natural environment, they were transferred back to the laboratory. During the infection, the transfer of disease was performed by placing recipient oysters ( $n=1000$ ) from each family in a tank with a mixture of donor oysters ( $n=1000$ ) from the 15 families carrying the disease (4). A control was created by placing each of the 15 families in contact with a mixture of oysters that were not exposed to the infectious environment. During the natural experimental infection, 3 triplicates of 10 oysters were sampled from each tank and each time (0, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 60 h and 72 h) of the kinetics for further molecular analysis.



**Supplementary Figure 2: Time-course of OsHV-1 ORF expression during the natural experimental infection in S<sub>F11</sub> and R<sub>F21</sub> oysters.** The fold changes in OsHV-1 ORF expression were calculated between each time point of the kinetics and the T0. Analyses were conducted with RNA-seq data through mapping against the OsHV-1 genome<sup>3</sup>. The intensity of the colour indicates the magnitude of the differential expression (log2 fold change). The heat map was constructed with Multiple Array Viewer software. ORF numbers from the reference genotype are indicated.

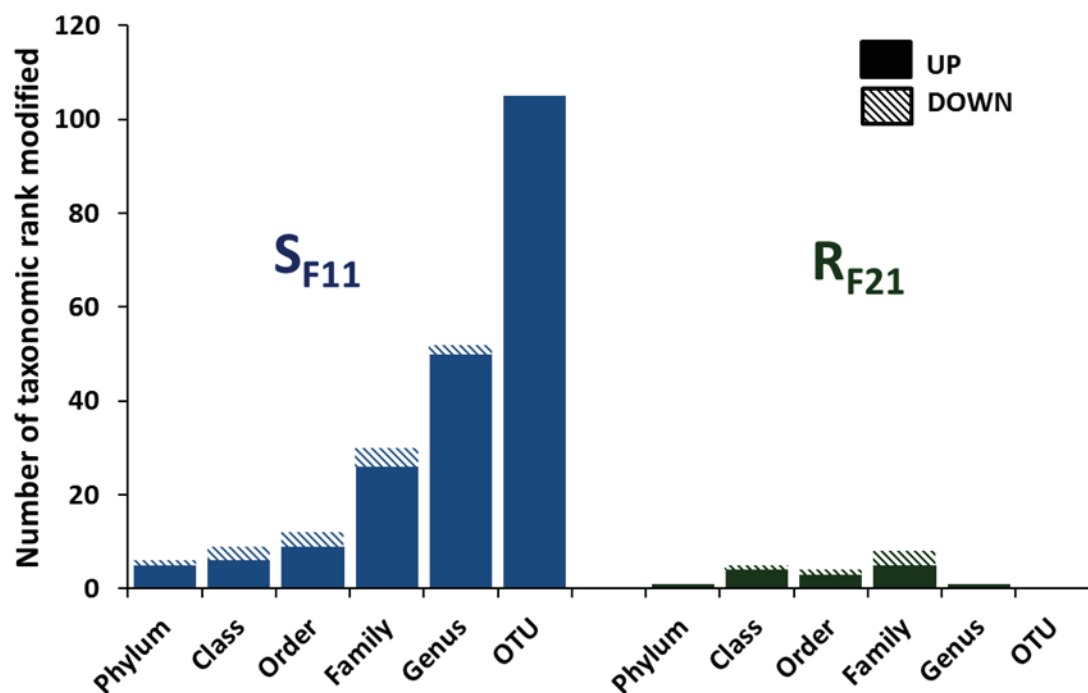


**Supplementary Figure 3: Richness rarefaction curves of the sub-sampled 16S rDNA dataset (10000 reads per sample) for susceptible  $S_{F11}$  and resistant  $R_{F21}$  oysters showing the number of OTUs as a function of the number of sequences analysed (sample size). T0, T6, T12, T24, T48, T60 and T72 correspond to the different sampling times (in hours) during the kinetics of the natural experimental infections. Triplicate results are shown for each time point.**

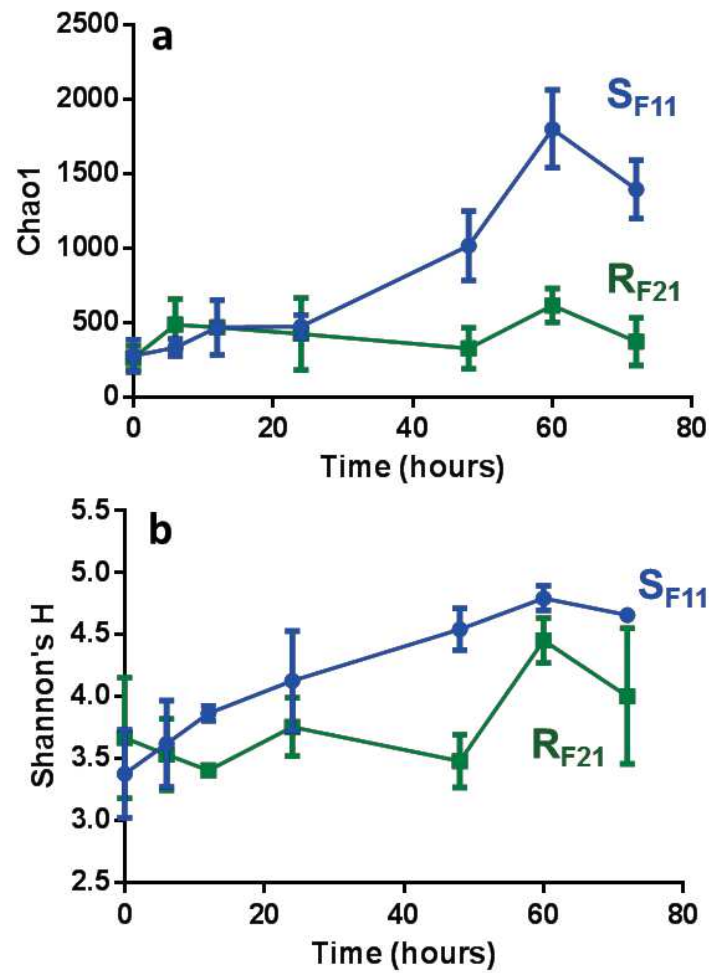


**Supplementary Figure 4: Relative proportions of bacteria (class level) for susceptible S<sub>F11</sub> and resistant R<sub>F21</sub> oysters.** T0, T06, T12, T24, T48, T60 and T72 correspond to the different sampling times (in hours) during the kinetics of the natural experimental infections. The average percentages of reads obtained for the three distinct pools of 10 oysters are shown at each time.

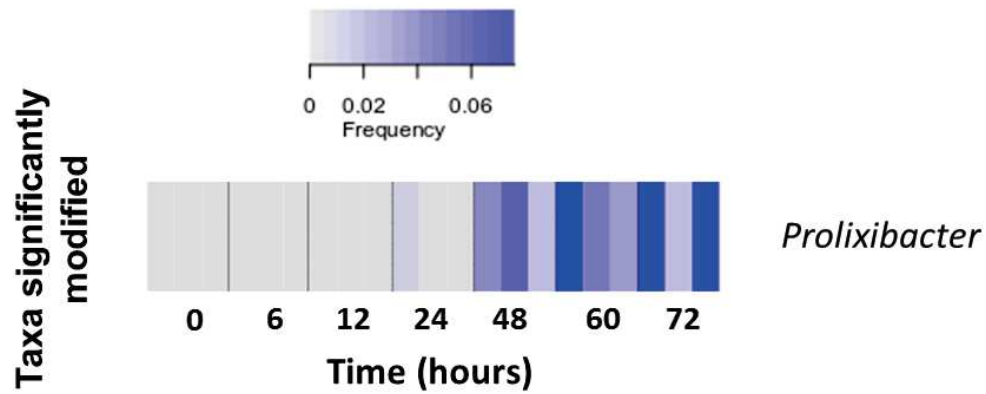




**Supplementary Figure 5: Microbiota modifications analysed by 16S rDNA metabarcoding in  $S_{F11}$  and  $R_{F21}$  oysters during the natural experimental infection.** Significant modifications (up and down; DESeq2,  $p < 0.05$ ) between the initial and the final time point of the kinetics were much more important at each taxonomic rank (from the phylum to the OTU level) for susceptible  $S_{F11}$  compared with resistant  $R_{F21}$  oysters.

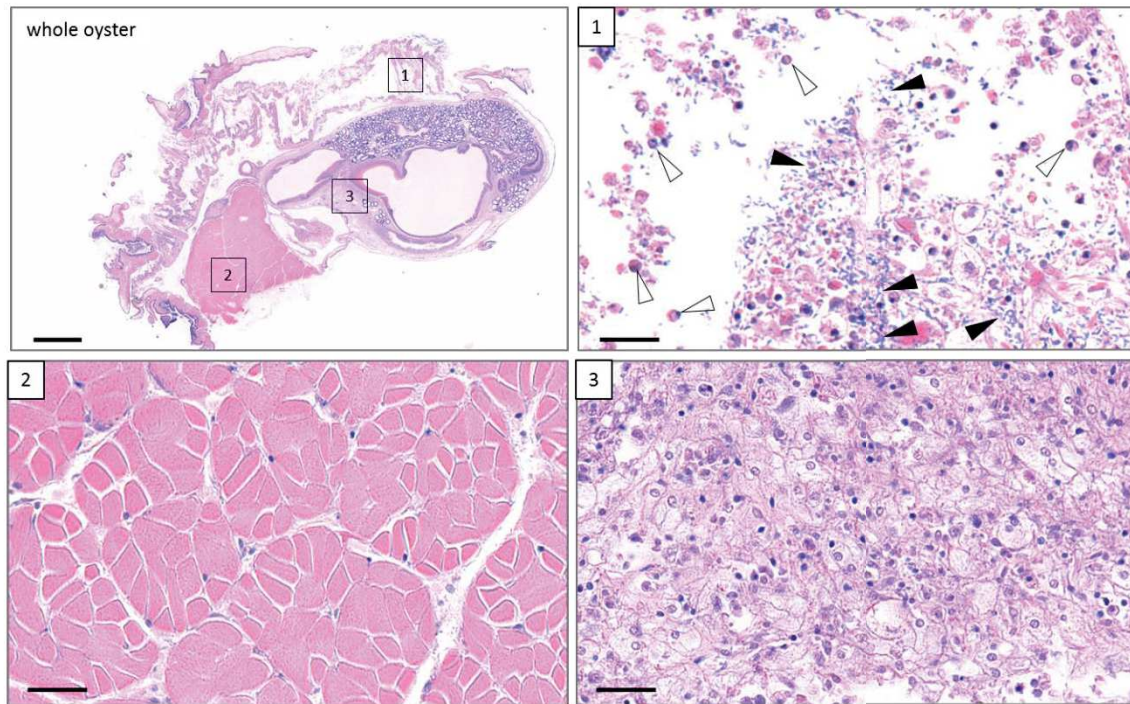


**Supplementary Figure 6: Temporal dynamics of alpha diversity during the natural experimental infection.** Chao1 (a) and Shannon's H index (b) for susceptible  $S_{F11}$  (in blue) and resistant  $R_{F21}$  (in green) oyster families. The data (obtained for the three distinct pools of 10 oysters) are presented as mean  $\pm$  S.D

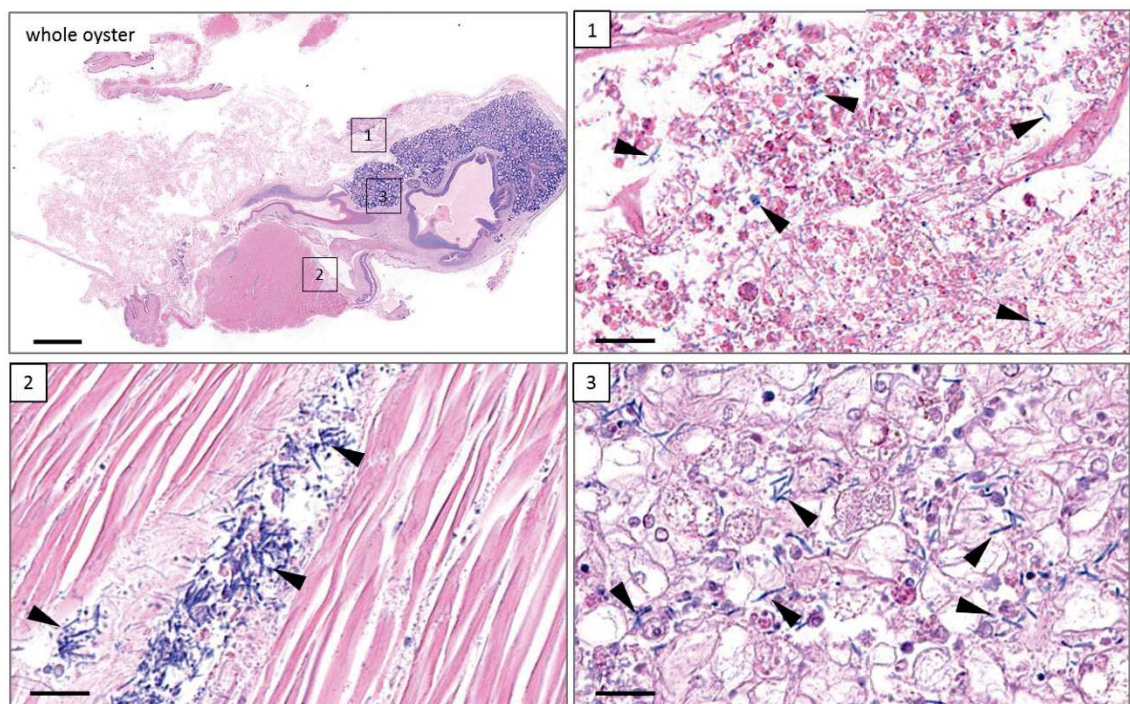


**Supplementary Figure 7: Heatmap of the only bacterial genus (*prolixibacter*) that is significantly modified in  $R_{F21}$  oysters during the natural experimental infection.** The intensity level of blue represents the relative abundance of this genus (frequency) at different time points of the kinetics. At each time, the analysis was performed on 3 distinct pools of 10 oysters.

**a**

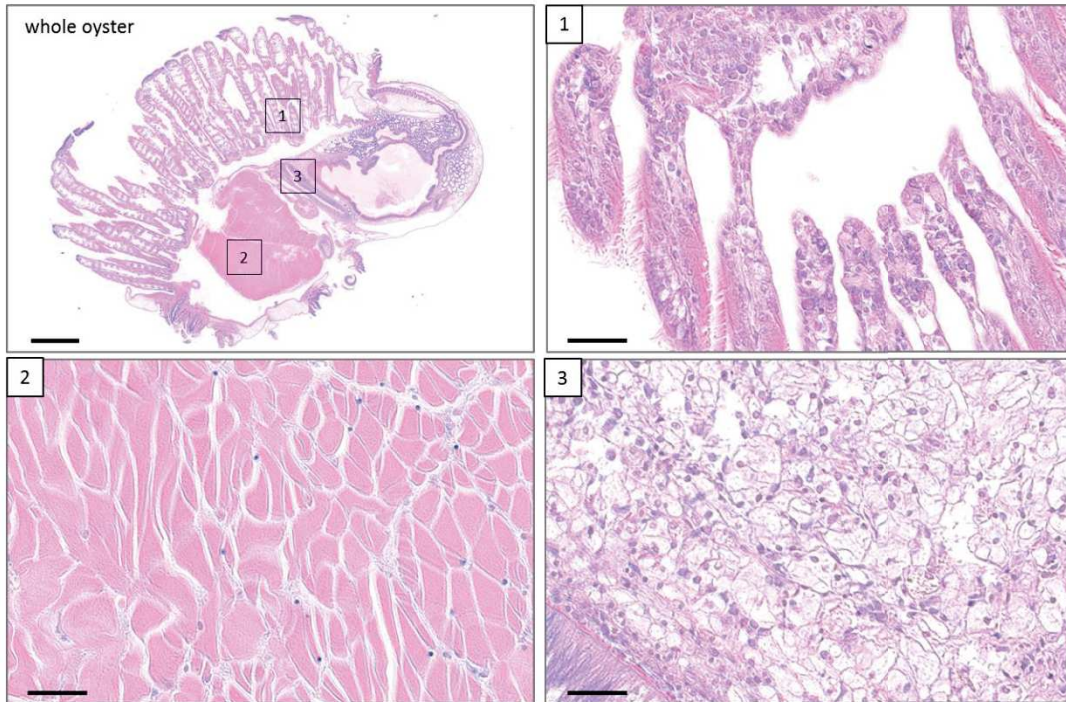


**b**

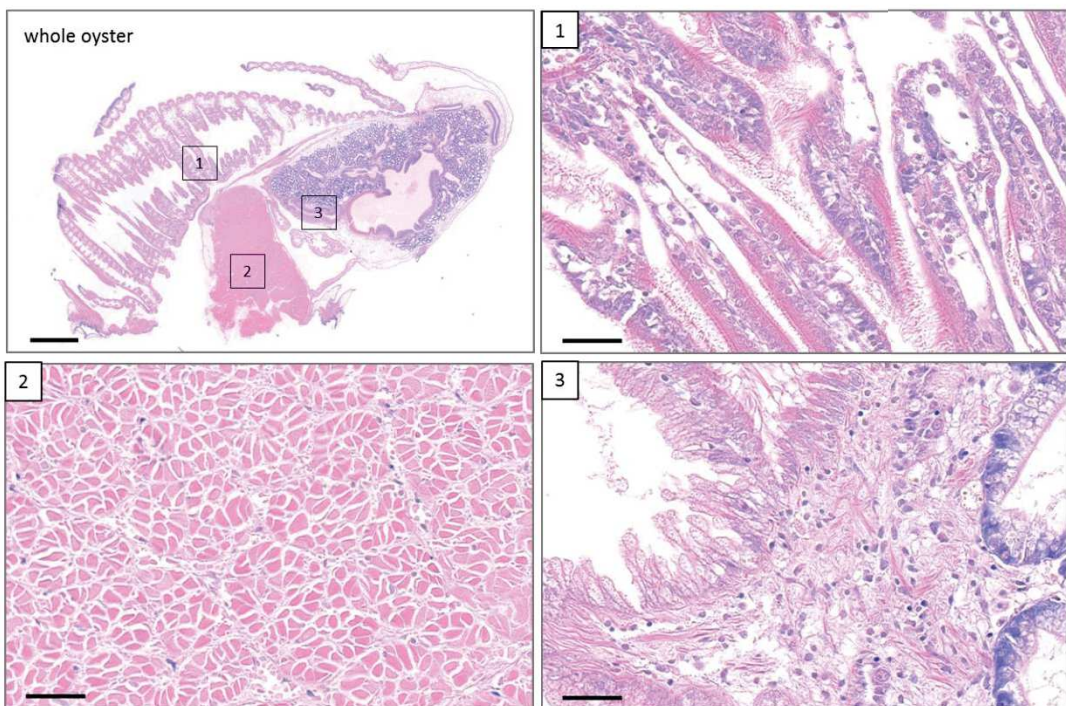




**c**

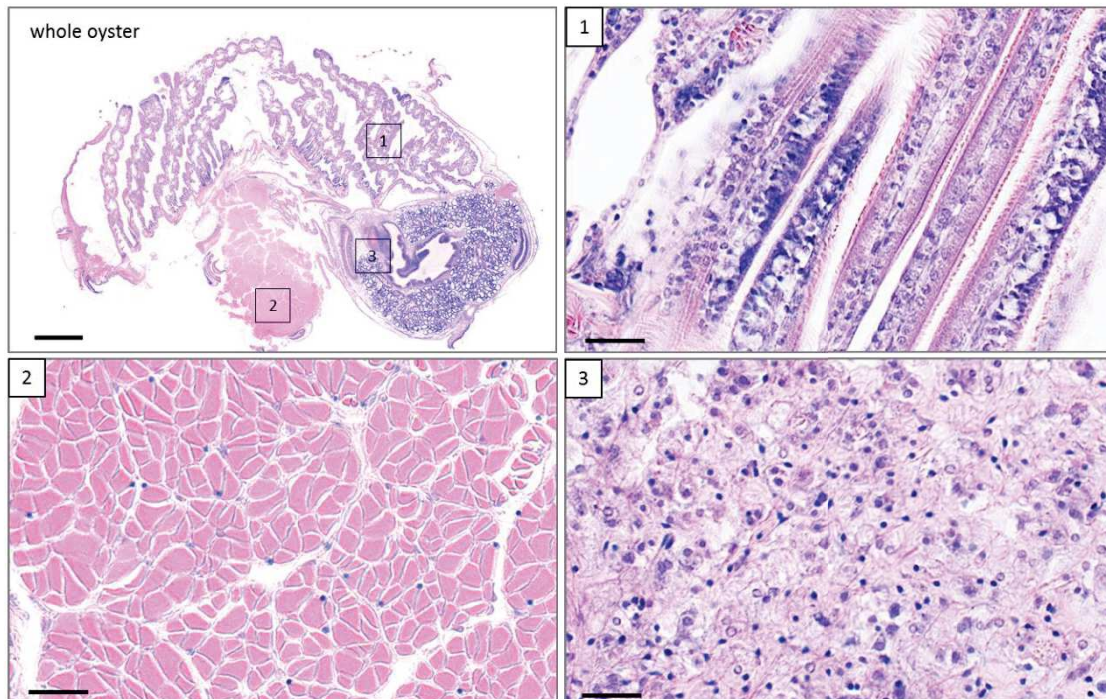


**d**

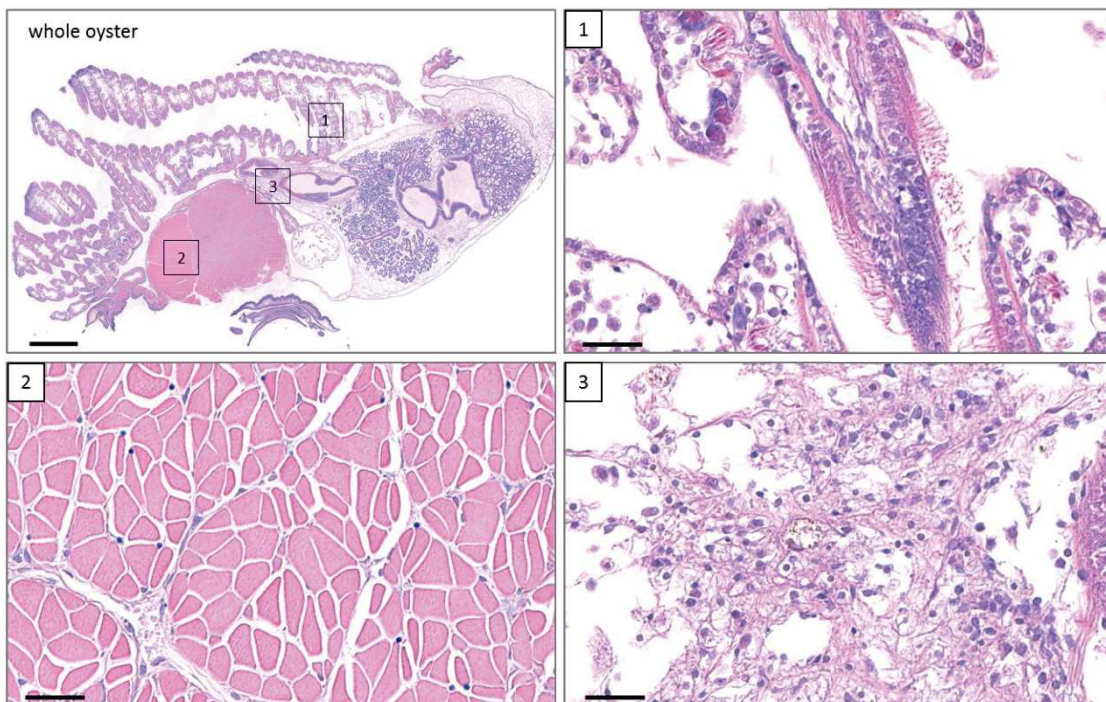




**e**

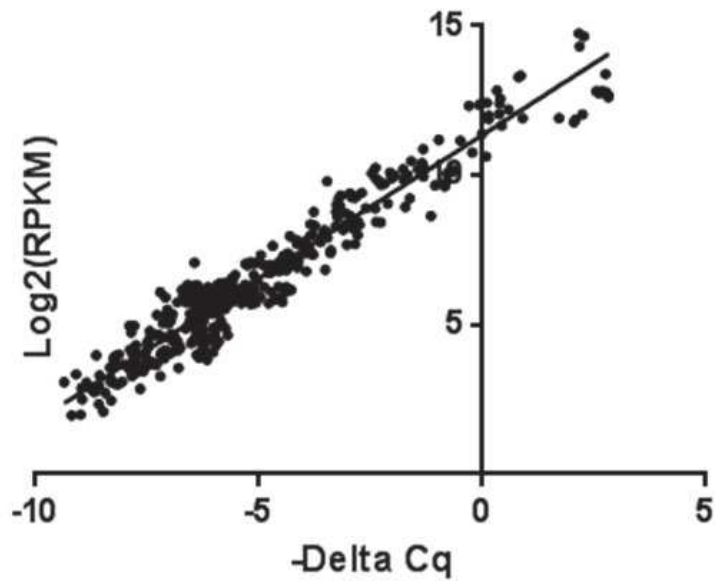


**f**

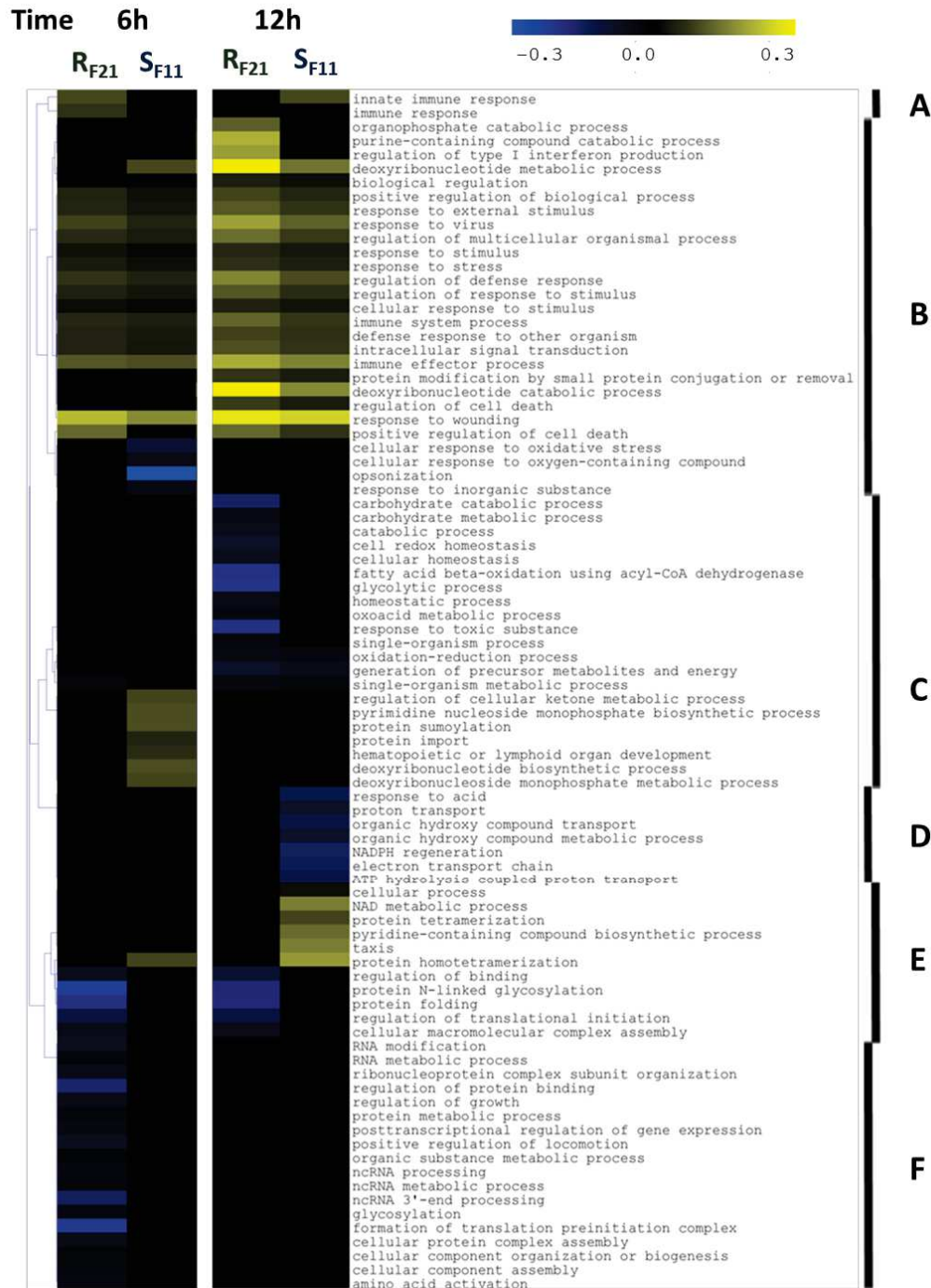


**Supplementary Figure 8: Histological tissue analysis by Giemsa staining showing bacteraemia in susceptible  $S_{F11}$  but not in resistant  $R_{F21}$  oysters during the natural experimental infection.** Giemsa staining was performed on paraffin wax-embedded sections of animals that were sampled at different time points to visualize tissue colonised by bacteria. Oyster tissues and cells were coloured in shades of pink to purple, and most bacteria were coloured in deep blue by Giemsa staining. **(a)** At 54 h after the beginning of the experiment, bacteria started to accumulate at the interfaces of the gills and the mantle epithelia in  $S_{F11}$  animals (filled arrowheads). Rounded cells reminiscent of typical haemocytes were observed both in gill tissues and outside any tissues associated with bacteria (open arrowheads). The gills and mantle epithelia appeared damaged at many different sites, with altered tissue integrity. **(b)** At 78 h after the beginning of the experiment, gill tissues appeared massively degraded (see whole oyster and gill images), and bacteria were found in most of the tissues of the  $S_{F11}$  animals, for example, the adductor muscle or the interstitial tissue near the digestive tract. No bacteria or tissue damage were observed in animal sections of  $S_{F11}$  **(c)** or  $R_{F21}$  **(d)** at the beginning of the infection or at any time points for the  $R_{F21}$  sections **(e, f)**. In **(a-f)** panels, (1) gill, (2) muscle and (3) interstitial tissues are magnified (scale bars = 1mm for whole oyster panel and = 20 $\mu$ M for 1, 2 and 3panels).

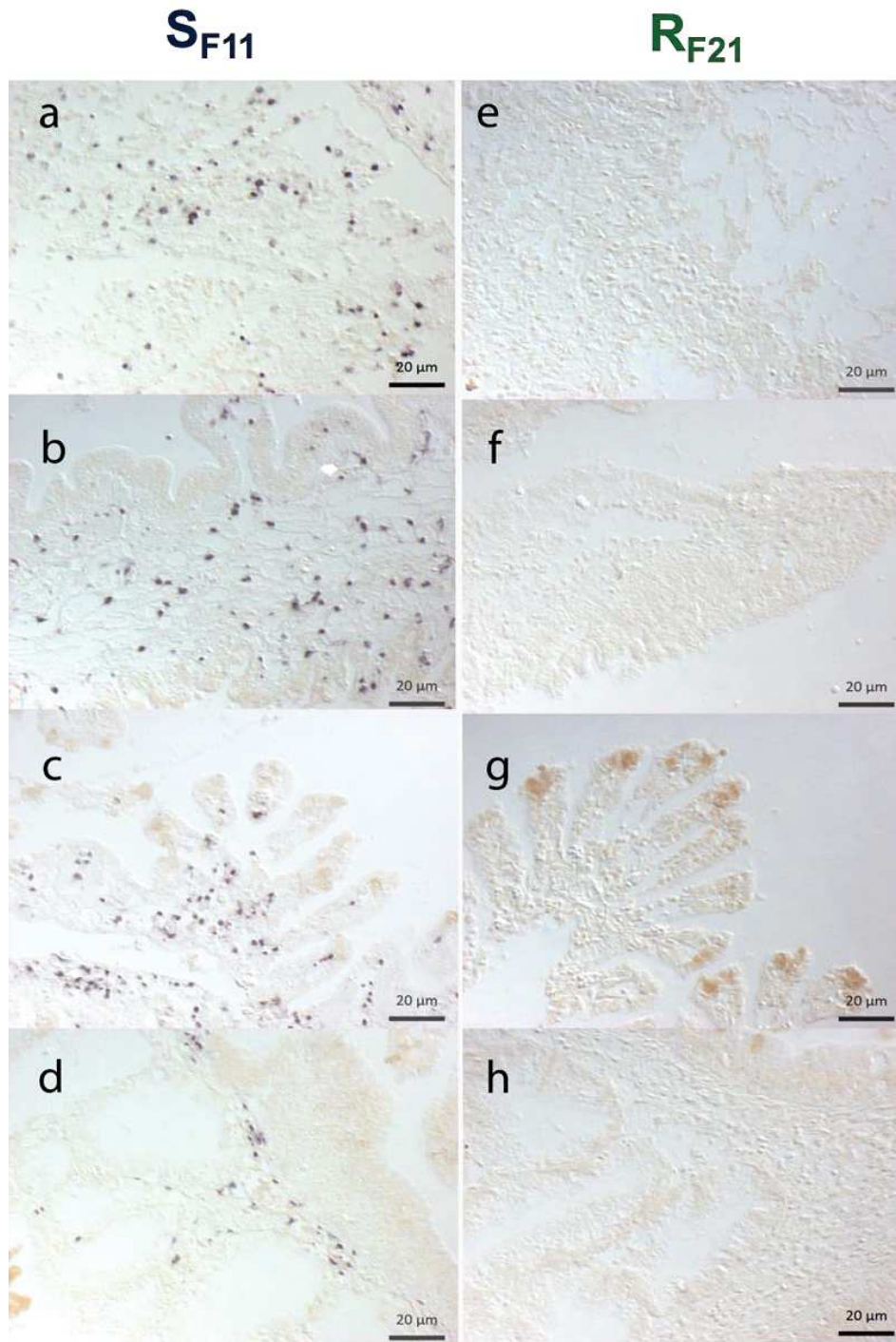




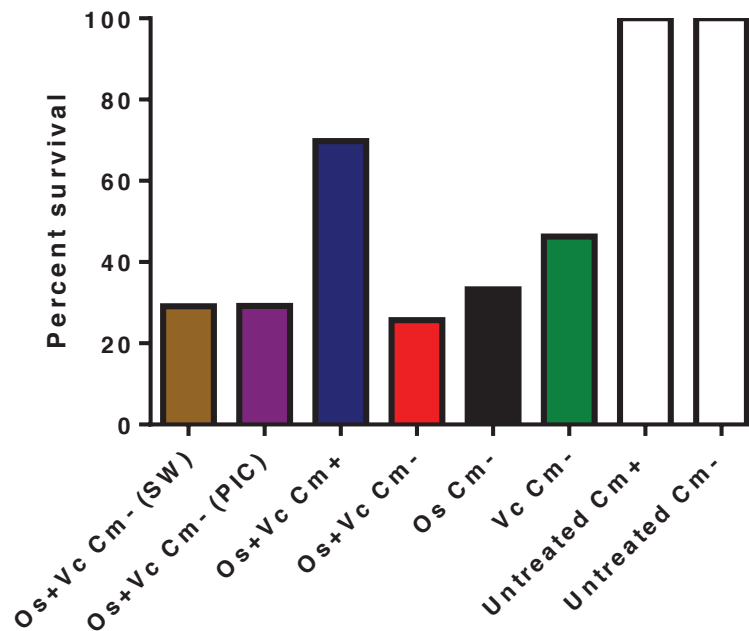
**Supplementary Figure 9: Validation of the RNA-seq data by RT-qPCR.** Thirty genes with contrasting expression levels were selected (the list of primers and PCR efficiencies are shown in Supplementary Table 2), and their relative expression levels were quantified by RT-qPCR using the same RNA used for the RNA-seq approach. These results, expressed as  $-\Delta Cq$ , were plotted against the  $\log_2(\text{RPKM})$  obtained by the RNA-seq approach. The regression line ( $y = 0.9595x + 11.36$ ) displaying  $r$  of 0.936 indicates a high level of correlation between the two methods.



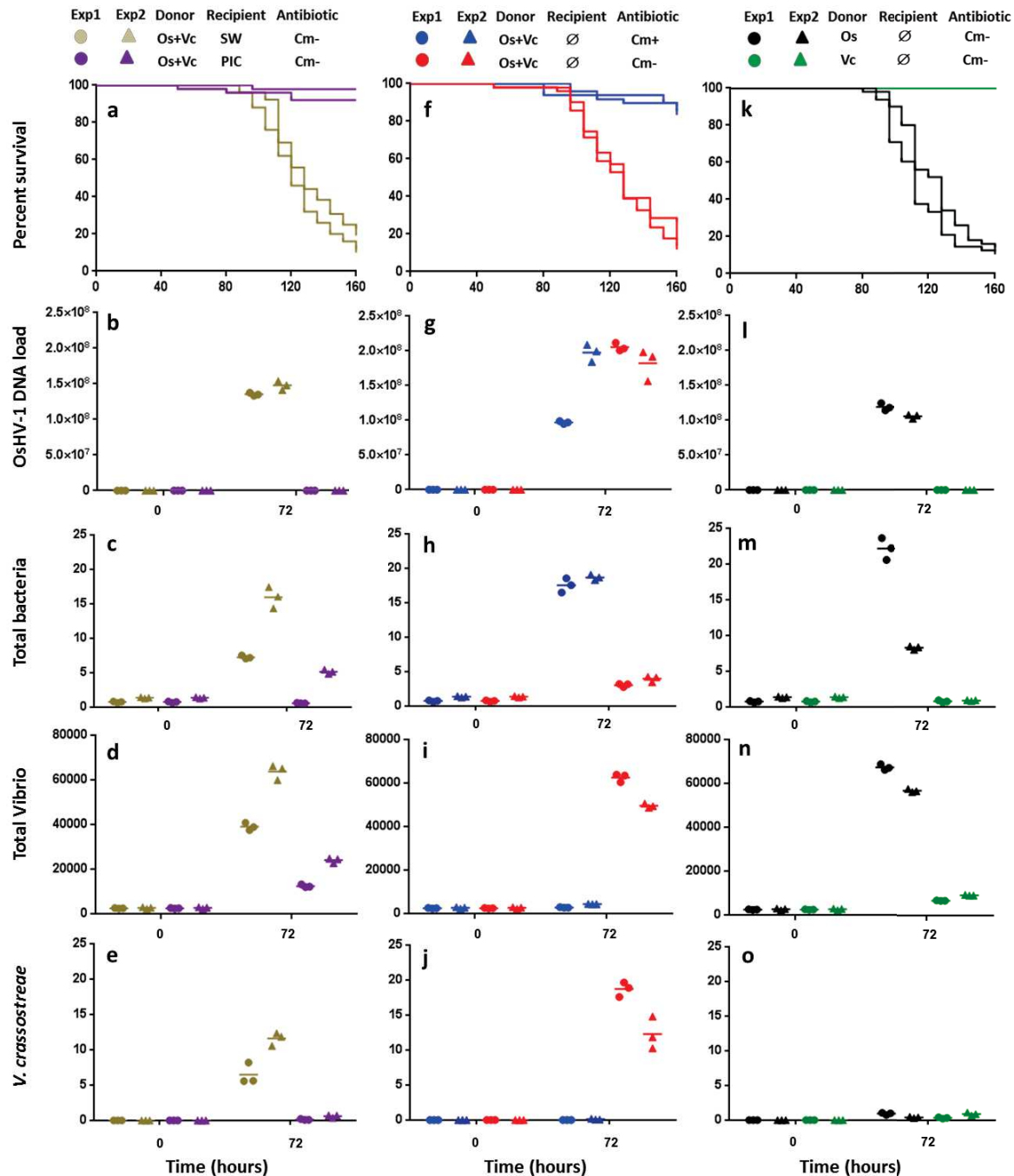
**Supplementary Figure 10: Heat map of enriched gene ontology categories for S<sub>F11</sub> and R<sub>F21</sub> oysters at 6 and 12 hours after the beginning of the natural experimental infection.** The intensity of the enrichment is expressed as the ratio between the number of genes that were significantly up (yellow heat) or down (blue heat) regulated in the category/total number of genes in the category. If the intensity was equal to zero, the enrichment was not significant for the corresponding condition (black heat). GO categories were clustered (A to F) according to the Pearson correlation (black filled bar).



**Supplementary Figure 11: *In situ* localization of virus-infected cells in  $S_{F11}$  (a-d) and  $R_{F21}$  (e-h) oysters at 54 h after the beginning of the natural experimental infection.** OsHV-1 was detected by *in situ* hybridization. Paraffin wax-embedded sections of oysters fixed 54 h after infection were hybridized with a specific probe labelled with digoxigenin and revealed using alkaline phosphatase-conjugated antibodies and NBT/BCIP (dark blue precipitate). Labelling was observed only in  $S_{F11}$  tissues (**a,e**: heart; **b,f**: mantle; **c,g**: gills; **d,h**: digestive gland and connective tissue). Scale bars = 20µm.



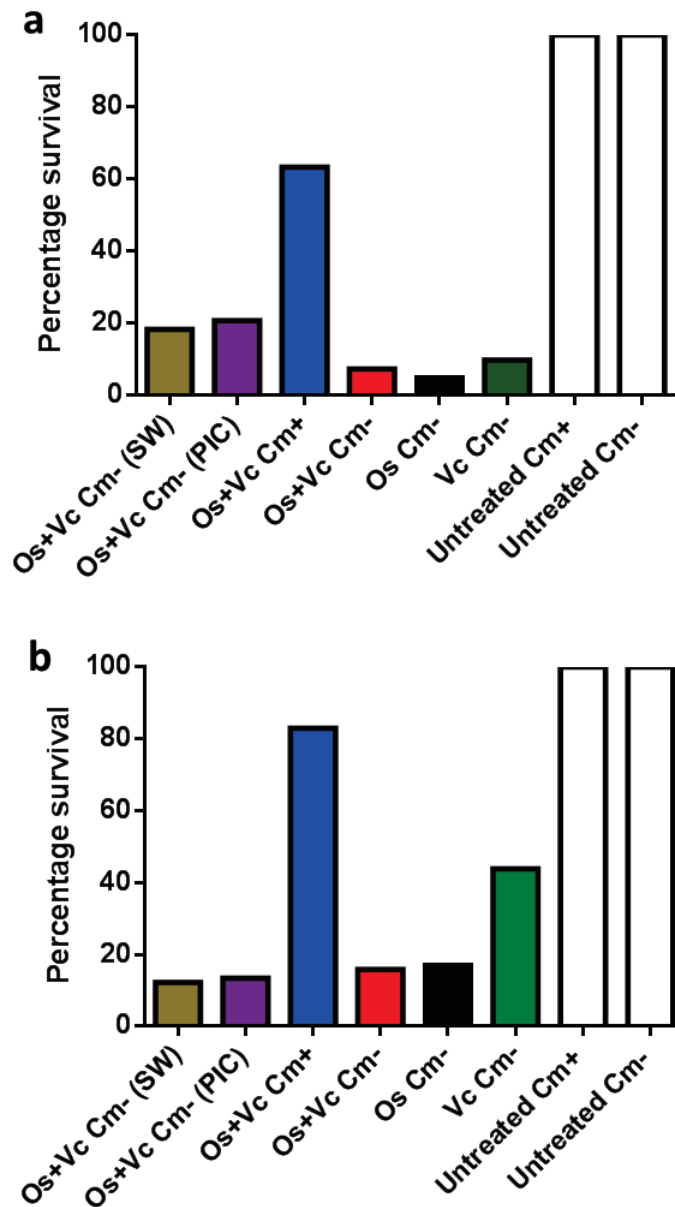
**Supplementary Figure 12: Percent survival of donor oysters (genetically diversified) at the end of the rationalized experimental infections (72 h) by OsHV-1 and/or *V. crassostreae*.** Donor oysters ( $n=100$ ) were injected with either  $3.88 \times 10^8$  genomic units of OsHV-1 (Os) or with  $5 \times 10^7$  cfu of *V. crassostreae* (Vc). Recipient oysters ( $n=100$ ) were injected with poly(I:C) (PIC) or sterile seawater (SW) before exposure to both Os and Vc donors (Os+Vc). Recipients were exposed to both Os and Vc donors (Os+Vc) in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol in the tanks. Recipients were exposed to Os or Vc donors in the absence of chloramphenicol (Cm-). Recipients were exposed to untreated donors in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol. Histograms represent the percent survival of donors in these different experiments.



**Supplementary Figure 13: Rationalized infection experiments using susceptible oysters from the H12 biparental family.** Two additional rationalized infections (Exp1 and Exp2) by OsHV-1 and/or *V. crassostreae* were performed: oyster donors ( $n=100$ ) were injected with  $3.88 \times 10^8$  genomic units of OsHV-1 (Os) or  $5 \times 10^7$  cfu *V. crassostreae* (Vc). (a-e) Recipient oysters ( $n=100$ ) were injected with poly(I:C) (PIC) or sterile seawater (SW) before exposure to both Os and Vc donors (Os+Vc). (f-j) Recipients oysters ( $n=100$ ) were exposed to both Os and Vc donors (Os+Vc) in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol in the tanks. (k-o) oysters ( $n=100$ ) were exposed to Os or Vc donors (Os+Vc). Mortalities and pathogen loads of recipient oysters were monitored during disease development. The OsHV-1 DNA load (viral genomic units per ng of total oyster DNA) and relative or absolute quantification of total bacteria, total *Vibrio* and *V. crassostreae* abundance were measured by

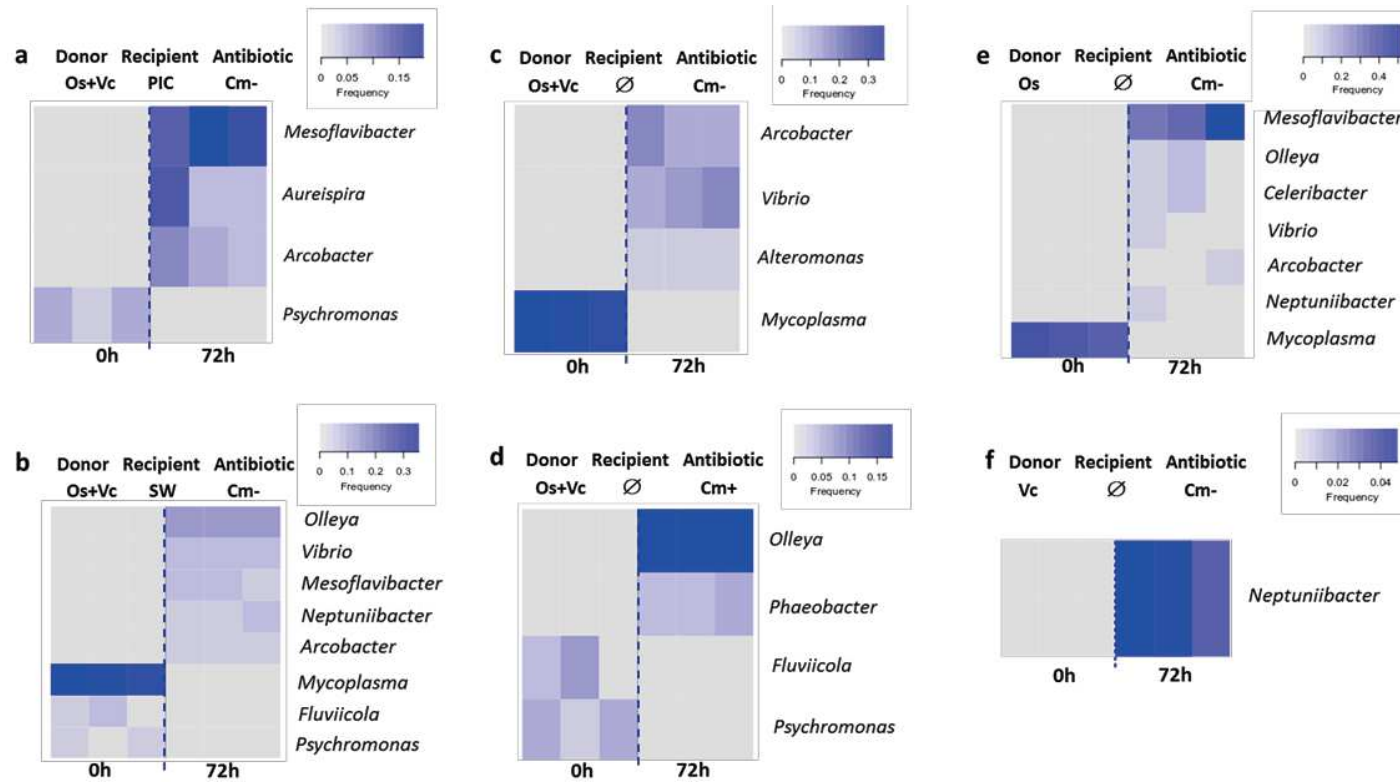
qPCR. Injection of poly(I:C), as opposed to SW, was sufficient to completely block OsHV-1 replication (**b**), bacterial colonization (**c-e**) and death of recipient oysters (**a**). Moreover, antibiotic treatment significantly reduced the load of vibrios (**i**, pairwise *t.test* at T72h; d.f.=10;  $p < 0.0001$ ), including *V. crassostreae* (**j**, pairwise *t.test* at T72h; d.f.=10;  $p < 0.0001$ ) and oyster mortality (**f**, Mantel-Cox log-rank test,  $p < 0.0001$ ) without affecting OsHV-1 replication (**g**). When only one pathogen was injected into donor oysters (**k-o**), recipient oyster mortality was observed only when they were exposed to virus-injected donors (**k**). In this condition, viral replication (**l**) was accompanied by an increase both in the total bacterial load (**m**, pairwise *t.test* at T72h; d.f.=10;  $p < 0.001$ ) and in the total vibrio load (**n**, pairwise *t.test* at T72h; d.f.=10;  $p < 0.0001$ ). Nevertheless, *V. crassostreae*, which was not included in this last experimental infection set-up, was not detected in oyster flesh (**o**). No mortality was observed, and no OsHV-1 DNA was detected in recipient oysters when untreated donors were used as a control.



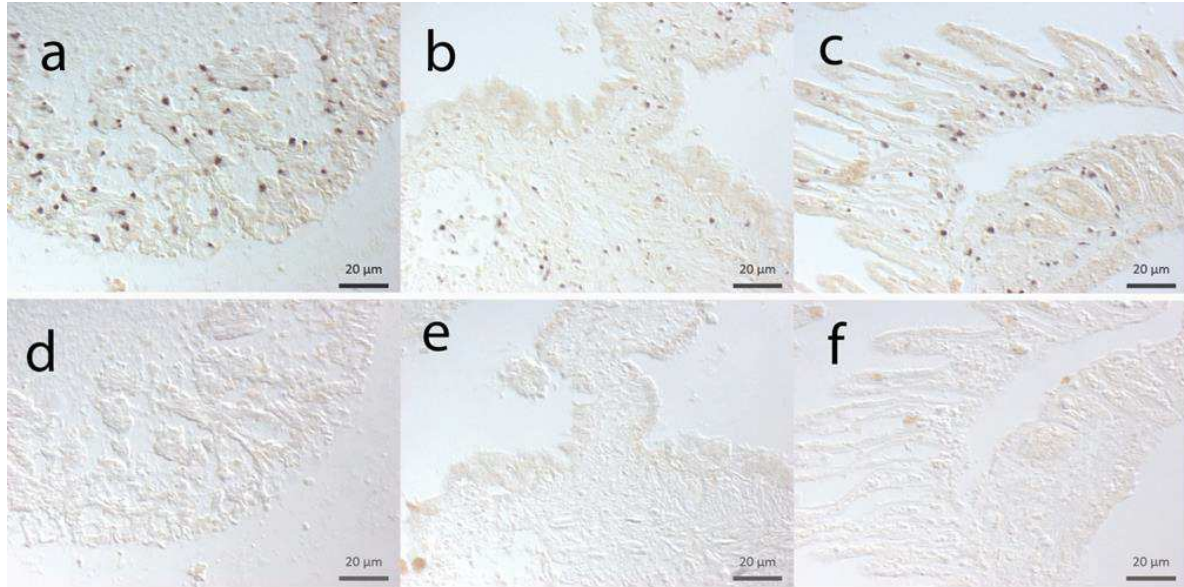


**Supplementary Figure 14: Percent survival of donor oysters (H12 biparental family) at the end of two independent rationalized experimental infections (72 h) by OsHV-1 and/or *V. crassostreae*.** Panel (a) and (b) represent the results of experimentation 1 (Exp 1) and 2 (Exp 2), respectively (Supplementary Figure 13). Donor oysters ( $n=100$ ) were injected with either  $3.88 \times 10^8$  genomic units of OsHV-1 (Os) or with  $5 \times 10^7$  cfu of *V. crassostreae* (Vc). Recipient oysters ( $n=100$ ) were injected with poly(I:C) (PIC) or sterile seawater (SW) before exposition to both Os and Vc donors (Os+Vc). Recipients ( $n=100$ ) were exposed to both Os and Vc donors (Os+Vc) in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol in the tanks. Recipients were exposed to Os or Vc donors in the absence of chloramphenicol (Cm-). Recipients ( $n=100$ ) were exposed to untreated donors in the presence (Cm+) or absence (Cm-) of chloramphenicol. Histograms represent the percent survival of donors in these different experiments.

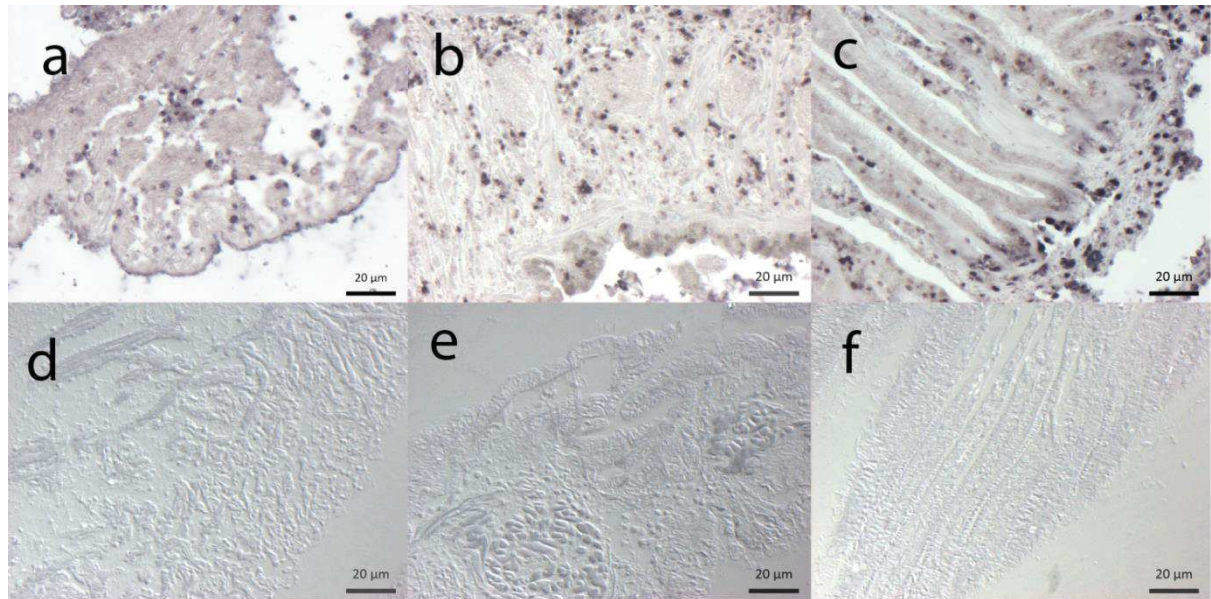




**Supplementary Figure 15: Heatmaps of bacterial communities that are significantly modified during the rationalized experimental infections by OsHV-1 and/or *V. crassostreae*.** Donor and recipient “pathogen-free” oysters were used for these experiments. Donor oysters were injected with either  $3.88 \times 10^8$  genomic units of OsHV-1 (Os) or  $5 \times 10^7$  cfu of *V. crassostreae* (Vc). Recipient oysters were injected with (a) polyI:C (PIC) or (b) sterile seawater (SW) before exposition to both Os and Vc donors (Os+Vc). Recipient oysters were exposed to both Os and Vc donors in the (c) absence (Cm-) or (d) presence (Cm+) of chloramphenicol in the tanks. Recipient oysters were exposed to Os donors (e). Recipient oysters were exposed to non-injected donors (f, control). Analyses were performed at the genus level. Only genera with a relative proportion superior to 4% in one sample are shown. The intensity level of blue represents the relative abundance of genera. No significant modification of the bacterial taxa was observed for the recipient oysters exposed to Vc donors. At each time, the analysis was performed on 3 distinct pools of 10 oysters.



**Supplementary Figure 16: Controls for *in situ* localization of virus-infected-cells.** OsHV-1 was detected in susceptible oysters ( $S_{F11}$ ) by *in situ* hybridization. Paraffin wax-embedded consecutive sections of oysters that were fixed 54 h after infection were hybridized with (a-c) a virus-specific or (d-f) a GFP-specific probe as a control. The probes were labelled with digoxigenin and revealed using alkaline phosphatase-conjugated antibodies and NBT/BCIP (dark blue precipitate). In all tissues, labelling was observed only with the virus-specific probe (a,d: heart; b,e: mantle; c,f: gills). Scale bars = 20µm.



**Supplementary Figure 17: Controls for *Cg*-EcSOD immuno-localization.** SOD was detected in susceptible oysters ( $S_{F11}$ ) by immunostaining. Paraffin wax-embedded sections of oysters were incubated (**a-c**) with an antibody specific to the SOD haemocytic protein or (**d-f**) without any primary antibody as a control. Immunostaining was revealed using alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies and NBT/BCIP (dark blue precipitate). In all tissues, labelling was observed only in cells interpreted as haemocytes with the SOD antibody (**a,d**: heart; **b,e**: mantle; **c,f**: gills). Scale bars = 20µm.

**Supplementary Table 1 : Oysters broodstock origin**

<b>Family</b>	<b>broodstock origin</b>	<b>Site</b>	<b>Geographical coordinate</b>
<b>F1</b>	Natural environment – farming area	Atlantic	Logonna Daoulas (lat 48.335263 – long -4.317922)
<b>F2</b>	Natural environment – farming area	Atlantic	Logonna Daoulas (lat 48.335263 - long - 4.317922)
<b>F9</b>	Natural environment – farming area	Atlantic	Logonna Daoulas (lat 48.335263 - long - 4.317922)
<b>F11</b>	Natural environment – non farming area	Atlantic	Dellec (lat 48.353970, long - 4.566123)
<b>F14</b>	Natural environment – non farming area	Atlantic	Dellec (lat 48.353970, long - 4.566123)
<b>F15</b>	Natural environment – non farming area	Atlantic	Dellec (lat 48.353970, long - 4.566123)
<b>F21</b>	Breeding program	Atlantic	Charente Maritime- La Tremblade (lat 45.781741, long - 1.121910)
<b>F23</b>	Breeding program	Atlantic	Charente Maritime- La Tremblade (lat 45.781741, long - 1.121910)
<b>F28</b>	Breeding program	Atlantic	Charente Maritime- La Tremblade (lat 45.781741, long - 1.121910)
<b>F32</b>	Natural environment – non farming area	Mediterranean	Vidourle (lat 43.553906, long 4.095175)
<b>F33</b>	Natural environment – non farming area	Mediterranean	Vidourle (lat 43.553906, long 4.095175)
<b>F37</b>	Natural environment – non farming area	Mediterranean	Vidourle (lat 43.553906, long 4.095175)
<b>F42</b>	Natural environment – farming area	Mediterranean	Thau lagoon (lat 43.418736, long 3.622620)
<b>F44</b>	Natural environment – farming area	Mediterranean	Thau lagoon (lat 43.418736, long 3.622620)
<b>F48</b>	Natural environment – farming area	Mediterranean	Thau lagoon (lat 43.418736, long 3.622620)

**Supplementary Table 2** : Primers used to validate RNA-seq data by RT-qPCR.

Gene name	ID in genbank or <i>C. gigas</i> genome	PCR efficiency	Sense and antisens primers (5'-3')
Cg-EF1	AB122066	1.97	GAGCGTGAACGTGGTATCAC
			ACAGCACAGTCAGCCTGTGA
Cg-RPL40	FP004478	2.02	AATCTTGCACCGTCATGCAG
			AATCAATCTCTGCTGATCTGG
Cg-RPS6	HS119070	2.01	CAGAAGTGCCAGCTGACAGTC
			AGAAGCAATCTCACACGGAC
Bactericidal permeability- increasing protein (BPI)	ACQ72939.1	2.04	ACGGTACAGAACGGATCTACG
			AATCGTGGCTGACATCGTAGC
Apoptosis Inducing factor1	CGI_10005410	2.06	AACAACCAGGTGGAACCTAACC
			GACATTGCCTCCAGTTCAGC
Dicer-like protein 1	CGI_10020752	2	ACGTCGGTAGCAGAGGAAGG
			CTTCCTCCATCTTCTCACTGC
Ribonuclease 3	CGI_10005763	1.89	CCATTGTCTGTGATGACCTGG
			TCACAGAACTTGTAGCACACC
Epididymal secretory glutathione peroxidase-like	CGI_10025106	1.97	AGATCCGAGATGTCGTCTGG
			CAGACATGAGTTGCAGGATGG
60 kDa heat shock protein	CGI_10011081	1.9	AGGCTCTGGATAACGTCAAGG
			TCCAAAGTCTCCCTCGTTGC
Heat shock protein 83-like	CGI_10017621	2.02	TGGTTGGTCAGCAAACATGG
			TGTCTGCCTCAGCCTTATCC
Integrin beta-1-B-like	CGI_10009280	1.94	CACGACTACCCTCTGTAACGG
			TGTCCACGACTCAGACCTCC
Type I interferon receptor beta chain-associated protein	CGI_10017476	2.01	AGGGAACTCCTCAGTCTGG
			GGGCTGCTGGAATGATTTCG
Piwi-like protein 1	CGI_10008757	1.87	TGGTGAGGAGTTGGTCAACG
			AGCATTCGTTGAGCTGAGGG
Stress-activated protein kinase JNK (JNK)	CGI_10020378	1.94	ATTCCCTCAGGACAGTCAGG
			CGTTGACTTCCTGCTCATCG
Superoxide dismutase (SOD)	CGI_10018833	1.91	TGGAACATGGCTGTGACACC
			TCTGTATGTCCGATGGTGAGC
TRAF-type zinc finger domain-containing 1	CGI_10022144	2.11	CTGCGAGTTCTGTGATGACC
			TTTGGCACGTGAAGCATTGG
complement component 3/4/5 (C3/4/5)	CGI_10014037	1.92	GTGTGCAGAATCATGGGATGC
			TGACAGTGGCTGAGAACACC
Krueppel-like factor 5	CGI_10000441	1.9	CCCAGGCTGCTCAACAATCA
			TGTGTTTTTCGTATGTGGCGC
neuronal acetylcholine	CGI_10000478	2.04	GACGACCCTATCCCAACACC



receptor subunit alpha-6-like			ATCTCGCCGATCCTTTTCCC
metalloreductase STEAP4-like	CGI_10003627	2.1	AGATTGCCTGTCCAGTCACG
			AAACTTCATGGCTCCCTCCG
hypothetical protein	CGI_10019038	2.06	TGGCCACATTGTCCCTTCAG
			CGAAGGACCAGTTGAGGAGG
Complement C1q 2	CGI_10020815	2.08	TGGCCAACATGAACATGTCC
			TGCTCCCACTGTTGTACCAA
p38- $\alpha$ (MAPK14)	CGI_10004156	1.9	CACAGAAGCCCTGGCTCATC
			TGGTATAGTGAGTTCCATGTC
IRF-8	CGI_10003270	1.98	AGTCTGATCCAAATCTTGCAC
			GTCATCTGGGTATACTCCTC
TRAIL	CGI_10005109	1.99	GCAGAACGGCATGGAGTTTC
			CATAGGACTGGTAGAGGTC
STING	CGI_10003079	1.96	CTGCTATTGTCCGCCATC
			GAATGGGCGTGGCATACTC
ADAR2	CGI_10012998	2.05	CTCTGGGACTCACAGCAAC
			GTGTTTCCGTGTTCAATCATC
SOC	CGI_10019528	1.95	CAAGAGAGAATCTGTGGGAAC
			GCATCTTAGCACTAATTCTCTC
Interleukin Receptor	CGI_10003267	2.02	CAGAGGGAACCCAGGAATC
			CATCATTCGGTTGGCTGTGAC
Natterin-3	CGI_10014616	1.96	AGAATGTGGCGATCTTACACG
			ATTGGAAGCAAGCATCTGACG
Collagen alpha-5(VI) chain	CGI_10012008	2.03	AGCGAGCTGGGTCTTATTTCC
			TCTCCTTGAGGTCCCATTTGG
BTG1	CGI_10015210	1.9	TCCATTCGACGTGTCCTACC
			ACATCATGGACATGGGTGAGG
major egg antigen-like isoform X1	CGI_10017582	2.02	TTCGGTGAGTGATGGGATGG
			ATAAAGCAGTGCACCTTGCC

**Supplementary Table 3:** Primers used for RT-qPCR of the S<sub>F14</sub>, S<sub>F15</sub>, R<sub>F23</sub> and R<sub>F48</sub> oyster families during the course of the natural infection experiment.

Gene name	ID in genbank or <i>C. gigas</i> genome	PCR efficiency	Forward and reverse primers (5'-3')
Viral IAP (ORF106)	NC_005881	1.94	AGGAGGATTGTGGTCATTGC
			TCATCGTCAGAGTCGTCGTC
cGAS	CGI_10023476	1.92	TGGCTGAGAGAGCTATGCAA
			GCCTTTCTTCCTCTGGGACT
IRF	CGI_10021171	2.06	AAGAGGTGGAAGGCCAACTT
			TCGTTTCGTTCTGCAGTCTTG
TNF	CGI_10005109	2.04	GCAGAACGGCATGGAGTTTC
			CATAGGACTGGTAGAGGTC
Viperin	CGI_10018396	1.92	TCAAGGACTTCTGCGAACG
			CCCGACATCTAGCAAAGAGC
Cg-IAP	CGI_10005393	2.08	TGGAACATAATGTGCGAGACG
			TCCATCTGCTGAATCAGTCC
SOC2	CGI_10019528	1.92	GGGGGACCACTAGTGTGAGG
			TCAAACGGGCATAGAAGTCC
Cg-BigDef2	JF703146	1.96	GGAGAGAAAATTCTGACCATGAC
			CATAGTTTATCCCCTCCGTC
Cg-PRP	JF766786	2.06	CACCATGTTCTCTCGGAGGA
			ATCTGCAATGTCAACCCTCTG
Cg-SOD	XM_011416094	1.97	AGAGGTGAATGCTACCAGG
			AGGCCAAGAATTCCGTCTG

## References

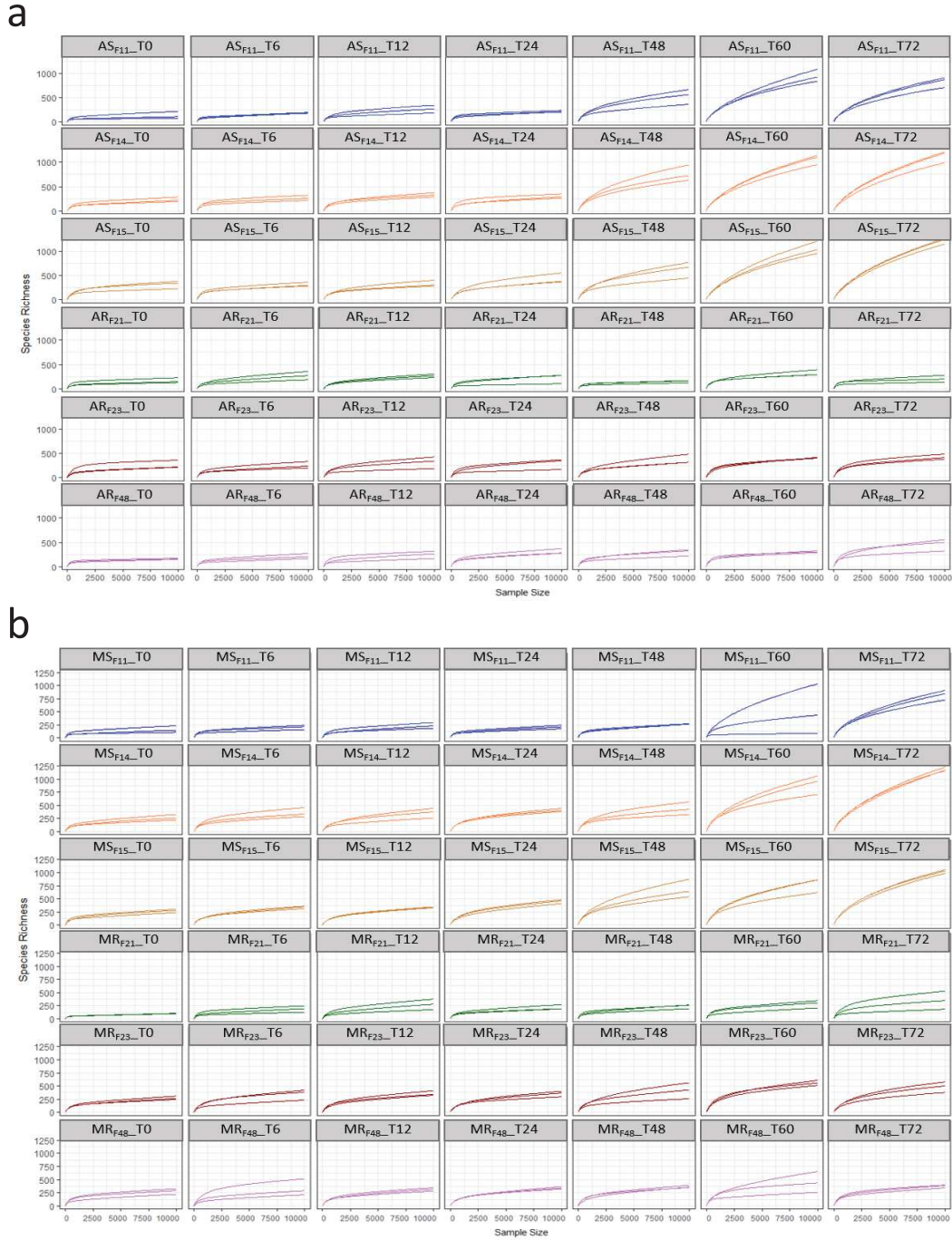
- Petton, B. *et al.* Crassostrea gigas mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol* **6**, 686, (2015).
- Le Roux, F., Wegner, K. M. & Polz, M. F. Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends Microbiol* **24**, 568-580, (2016).
- Davison, A. J. *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**, 41-53, (2005).



## **Supplementary Files**

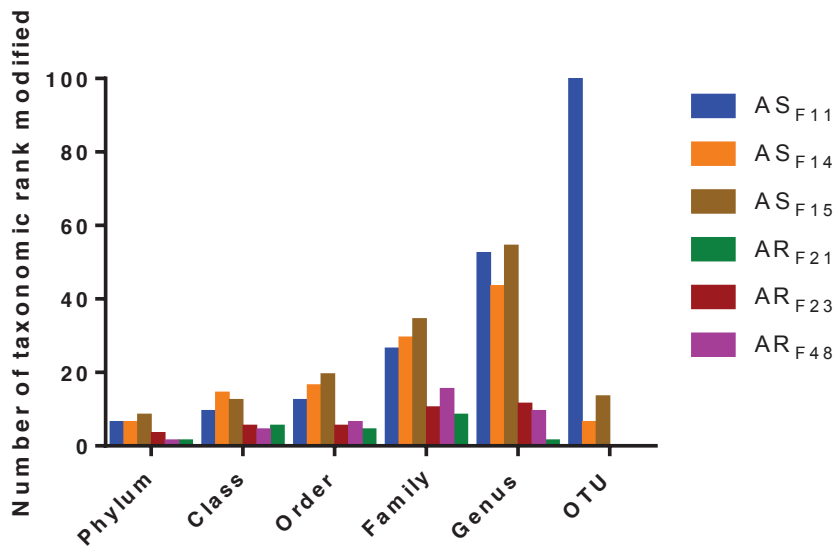
**The mechanism of the polymicrobial disease affecting Pacific oyster juveniles is conserved between oyster genotypes and infectious environments**

**Supplementary Figure 1: Rarefaction curves of the sub-sampled 16S rDNA dataset (10000 reads per sample) for susceptible and resistant oysters in (a) Atlantic infectious environment  $AS_{F11}$ ,  $AS_{F14}$ ,  $AS_{F15}$  and  $AR_{F21}$ ,  $AR_{F23}$ ,  $AR_{F48}$  and in (b) Mediterranean infectious environment  $MS_{F11}$ ,  $MS_{F14}$ ,  $MS_{F15}$  and  $MR_{F21}$ ,  $MR_{F23}$ ,  $MR_{F48}$ . T0, T6, T12, T24, T48, T60 and T72 correspond to the different sampling times (in hours) during the kinetics of the experimental infections. Triplicate results are shown for each time point.**

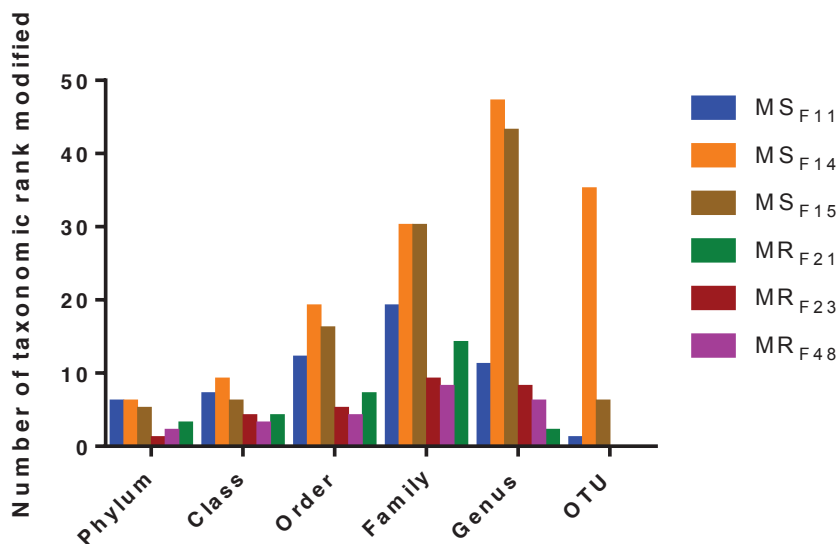


**Supplementary Figure 2 : Microbiota modifications analysed by 16S rDNA metabarcoding in susceptible and resistant oyster families confronted to two different infectious environments.** Susceptible oyster families ( $S_{F11}$ ,  $S_{F14}$  and  $S_{F15}$ ) and resistant oyster families ( $R_{F21}$ ,  $R_{F23}$  and  $R_{F48}$ ) confronted to (a) Atlantic or (b) Mediterranean infectious environments. Significant modifications (up and down; DESeq2,  $p < 0.05$ ) between the initial and the final time point of the kinetics were much more important at each taxonomic rank (from the phylum to the OTU level) for susceptible oyster families compared with resistant oyster families. Data for  $AS_{F11}$  and  $AR_{F21}$  were extracted from (De longeril et al., 2018).

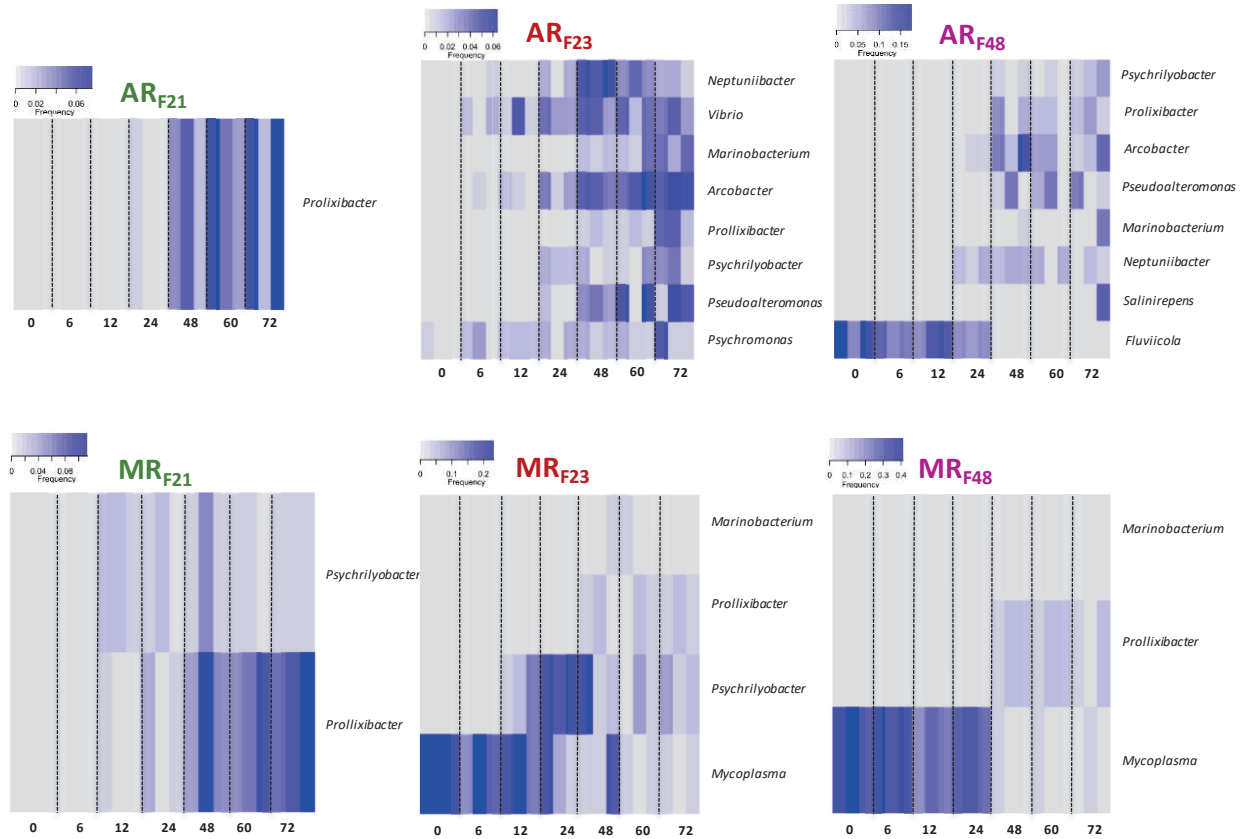
a



b



**Supplementary Figure 3: Heatmaps of bacterial communities that are significantly modified during the kinetics in resistant oysters in Atlantic infectious environment AR<sub>F11</sub>, AR<sub>F14</sub>, AR<sub>F15</sub> and in Mediterranean infectious environment MR<sub>F11</sub>, MR<sub>F14</sub>, MR<sub>F15</sub>. Analyses were performed at the genus level. Only genera with a relative proportion superior to 2% in at least one sample are shown. The intensity level of the blue represents the relative abundance of genera. Data for AR<sub>F21</sub> were extracted from (De longeril et al., 2018).**



**Supplementary Table 1: Absolute abundance of Operational Taxonomic Units (*ie* clusters) and their corresponding taxonomic affiliations in susceptible and resistant oyster families confronted to two different infectious environments.** Susceptible oyster families are S<sub>F11</sub>, S<sub>F14</sub> and S<sub>F15</sub>, resistant oyster families are R<sub>F21</sub>, R<sub>F23</sub> and R<sub>F48</sub> and the origin of infectious environments is indicated with A for Atlantic and M for Mediterranean. T0, T6, T12, T24, T48, T60 and T72 correspond to the different sampling times (in hour) during the kinetics of the “natural” experimental infections. R1, R2, R3 correspond to the results of each replicate. Data for AS<sub>F11</sub> and AR<sub>F21</sub> were extracted from (De longeril et al., 2018) (Excel file).

**Supplementary Table 2 : Frequencies of bacterial taxa that are significantly modified over the course of the both experimental infections (Atlantic and Mediterranean) in susceptible and resistant oyster families.** Susceptible oyster families are S<sub>F11</sub>, S<sub>F14</sub> and S<sub>F15</sub>, resistant oyster families are R<sub>F21</sub>, R<sub>F23</sub> and R<sub>F48</sub> and the origin of infectious environments is indicated with A for Atlantic and M for Mediterranean. T0, T6, T12, T24, T48, T60 and T72 correspond to the different sampling times (in hours) during the kinetics of the experimental infections. R1, R2, and R3 correspond to the results obtained for the different replicates. Data for AS<sub>F11</sub> and AR<sub>F21</sub> were extracted from (De longeril et al., 2018) (Excel file).



**1 Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased**  
**2 *Crassostrea gigas* oysters**

**3 Running title: Links between oyster fitness and microbiota composition**

**4**  
**5 Camille Clerissi<sup>\*1,2,3</sup>, Julien de Lorgeril<sup>1,3</sup>, Bruno Petton<sup>4</sup>, Aude Lucasson<sup>1,3</sup>, Jean-Michel**  
**6 Escoubas<sup>1,2</sup>, Yannick Gueguen<sup>1,3</sup>, Guillaume Mitta<sup>1</sup>, Eve Toulza<sup>\*1,2</sup>.**

**7**  
**8 1, IHPE UMR 5244, CNRS, Ifremer, Université de Montpellier, Université de Perpignan Via**  
**9 Domitia, France**

**10 2, CNRS, IHPE UMR 5244, Ifremer, Université de Montpellier, Université de Perpignan Via**  
**11 Domitia, France**

**12 3, Ifremer, IHPE UMR 5244, CNRS, Université de Perpignan Via Domitia, Université de**  
**13 Montpellier, CC80, F-34095, Montpellier, France**

**14 4, Ifremer, LEMAR UMR 6539 (Univ. Bretagne Occidentale, CNRS, IRD, Ifremer), 11**  
**15 presqu'île du Vivier, 29840 Argenton-en-Landunvez, France**

**16**

**17 \*Corresponding author: Eve Toulza. Mailing address: IHPE UMR 5244, Université de**  
**18 Perpignan via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, F-66860 Perpignan Cedex, France. Phone:**  
**19 +33 468 662 187. Fax: +33 468 662 281. E-mail: [eve.toulza@univ-perp.fr](mailto:eve.toulza@univ-perp.fr)**

**20 Camille Clerissi. Mailing address: IHPE UMR 5244, Université de Perpignan via Domitia, 52**  
**21 Avenue Paul Alduy, F-66860 Perpignan Cedex, France. Phone: +33 468 662 050. Fax: +33**  
**22 468 662 281. E-mail: [camille.clerissi@univ-perp.fr](mailto:camille.clerissi@univ-perp.fr)**

**23**

**24 311 words for the abstract and 4508 words for the text**

**25 Keywords: holobiont, microbiome, metabarcoding, fitness, bacteria.**

**26**



27

## Abstract

28 Associations between micro- and macro-organisms (forming holobionts) are common and  
29 mostly specific in nature. Although microbes might contribute to the holobiont homeostasis,  
30 their role in the adaptive capacities of the holobiont remains unclear in most of the living  
31 species, and studies testing the links between host fitness and microbiota characteristics are  
32 still lacking.

33 To tackle this issue, we analyzed the microbiota of full-sib progenies from five biparental  
34 oyster families in a controlled condition (hatchery) and after transplantation during non-  
35 stressful or stressful periods in two geographic regions (Atlantic Ocean and Mediterranean  
36 Sea). We used 16S rRNA gene-metabarcoding to study taxonomic compositions of microbial  
37 communities. First, comparisons of microbial assemblages showed that environmental  
38 conditions highly influenced oyster microbiota. However, different ecological niches existed  
39 between oyster tissues and seawater, and even between the five families. Secondly, because  
40 two oyster families displayed high mortalities in both stressful periods, we compared their  
41 microbiota characteristics to the three other families. All oyster microbiota were highly  
42 modified after transplantation and no clear microbiota dysbiosis was observed for the two  
43 susceptible families. Moreover, despite similar levels of mortalities in both geographic  
44 regions, we identified many differences of microbial assemblages between resistant and  
45 susceptible families in the Atlantic Ocean, but few in the Mediterranean Sea. Particularly,  
46 susceptible families showed lower diversity of their microbiota than the resistant ones in  
47 stressful periods. Secondly, we highlighted that microbiota of susceptible oyster families had  
48 higher variability than the resistant ones at the scale of bacterial orders, but also less  
49 variability at the scale of OTUs. Lastly, while resistant families had increased relative  
50 abundances of cyanobacteria (Subsection III, family I) during the stressful period, susceptible  
51 oysters had low stability of Rhodospirillales, Rhodobacterales, Flavobacteriaceae and  
52 Erythrobacteraceae.

53 This study highlighted links between microbiota diversity and low variability of microbial  
54 assemblages at higher taxonomic ranks with oyster mortalities. We also identified bacterial  
55 taxa related to oyster fitness.

56

## Introduction

57 Interactions between micro- and macroorganisms are ubiquitous on Earth, from host-pathogen  
58 relationships [1] to the widely distributed commensalism or mutualism [2,3]. Previous  
59 observations suggested that composition of host-associated microbial communities (hereafter  
60 named microbiota) are not random, but might be linked to host taxonomy and physiology.  
61 Indeed, specific associations were found for microbiota of phylogenetically distant species of  
62 mice, flies, mosquitoes, wasps and hominids [4], but also for microbiota of closely related  
63 species of corals [5], hydra [6], or oysters [7]. Moreover, many studies showed that these  
64 interactions were not stable when hosts were in stressful conditions or in different  
65 physiological conditions. For example, microbiota compositions were found to be very  
66 different between healthy and diseased corals [8], or between oysters exposed to different  
67 temperatures [9].

68 Microbial associates might provide benefits to their hosts for survival, but also homeostasis  
69 and development [10]. First, a stable microbiota can play a role of physical barriers against  
70 pathogens. For example, healthy mice developed *Salmonella* infection after antibiotic  
71 treatments [11]. Other studies highlighted protective effects of (i) secondary endosymbiont of  
72 aphids against parasitoid wasps [12], (ii) toxic alkaloids produced by endophytic fungi of  
73 grasses against herbivores [13], or (iii) symbiotic bacteria of frogs against pathogenic fungi  
74 [14]. Secondly, because microbiota composition can change rapidly, they might represent  
75 mechanisms for rapid acclimation of the holobiont to changing environments [15]. In  
76 particular, fine-scale modifications of *Nematostella vectensis* microbiota were observed with  
77 environmental variations [16], suggesting that microbiota might participate to the  
78 maintenance of holobiont homeostasis. Hence, structure of microbiota might be multilayered  
79 with at least two populations of microbes: a stable host-adapted core microbiota and a more  
80 variable microbial pool [17]. However, the balance between stability and variability is still  
81 poorly studied. In particular, lack of knowledge concerns links between microbiota  
82 characteristics and fitness of holobionts facing environmental changes.

83 To tackle this issue, the farmed oyster *Crassostrea gigas* is a relevant model, as it filters  
84 seawater to feed. As a consequence, all oysters are in contact with the same environmental  
85 microbial communities, and microbiota variations are not biased towards different diets [18–  
86 20]. In addition, oysters are affected by recurrent mortality syndromes affecting mainly  
87 juveniles [21,22]. These mortalities are multifactorial processes due to water temperature and

quality, but also development of viral and bacterial pathogens [23–27]. Particularly, different susceptibilities were observed according to oyster physiology and/or genetic backgrounds [28–30], in association with microbiota dysbiosis [9]. Although oyster genetics and microbiota dysbiosis were associated to mortalities, no studies tried to disentangle the links between oyster fitness and microbiota characteristics.

Thus we produced full-sib progenies from five biparental oyster families (see Methods for more details) using genitors from different origins. In particular, males and female genitors were isolated from different geographic regions in France (Atlantic Ocean and Mediterranean Sea), and in different areas (farming areas or sites with lower densities of oysters, and potentially lower concentrations of pathogens). Then we transplanted progenies of each biparental family at two time periods in the Atlantic Ocean or in the Mediterranean Sea. These two time periods were selected according to seawater temperatures in order to study oysters in non-stressful and stressful periods. Particularly, it was previously observed that 16°C was a relevant threshold to define periods of stress, because high mortality rates were observed above this temperature [24,25]. After five days of transplantation, oysters were sampled, seawater was filtered, and we analyzed oyster-associated and seawater bacterial communities using 16S rRNA gene-metabarcoding.

This study aimed at (i) testing environmental effects on oyster microbiota, (ii) comparing oyster microbiota between resistant and susceptible phenotypes for periods of stress, and (iii) testing the balance between stability and variability of microbiota in changing environment.

The identification of such bacterial candidates might help to develop new production techniques for oyster farming in the future.

## Methods

### Genitors from different geographic origins

Biparental *C. gigas* oysters families were produced using a recently developed methodology that allowed the production of pathogen-free juveniles [25,27,31]. Four oysters families (F09, F15, F32 and F44) were produced from wild genitor sampled in farming and non-farming area in two geographic regions, the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean (Fig. S1). In addition, family F21 was produced using genitors from a massal breeding program aiming at increasing the resistance of *C. gigas* oysters against OsHV1-virus. It was performed by breeding disease survivors throughout four generations of selection [32]. Each family (cohort) thus corresponded to the offspring of a biparental reproduction (full-sib progenies). Maturation induction, reproduction and larval breeding were performed as described previously [25,33]. In the larval and post-larval stages, the oysters were fed with the same diet as the genitors at a concentration between 1500-2000  $\mu\text{m}^3 \mu\text{L}^{-1}$  [34]. Before experiments, all oyster families were maintained in controlled condition at the laboratory (Argenton, France) using seawater treated with UV, filtered through 1  $\mu\text{m}$  mesh, and enriched with a bi-specific phytoplankton diet made of *Tisochrysis lutea* (CCAP 927/14) and *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3) (in equal biomass proportion) at a ratio equivalent to 6% of the oyster dry mass [34]. Finally, all oysters remained free of any abnormal mortality.

### Experimental design

About 140 individuals of each oyster family were either kept in the controlled condition or placed in one out of four natural environments for five days. The four natural environments corresponded to two geographic site (Atlantic Ocean and Mediterranean Sea, see Fig. 1), and two time periods. These two time periods coincided to non-stressful and stressful periods according to seawater temperatures (below and above 16°C, respectively) (Table S1), and were confirmed by the observed mortality rates. After five days of transplantation, no mortality occurred and about 15 individuals of each family were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. In addition, 125 oysters per family were also placed in controlled condition to monitor mortality rates. The number of dead oysters was estimated at day 13 (*i.e.*, eight days after the end of transplantation). Moreover, serial filtrations of 5 liters of seawater were performed for the five conditions using porosity of 10  $\mu\text{m}$  (Whatman<sup>TM</sup>

111115 Nucleopore™ Track-Etch Polycarbonate Membrane filter, 47 mm diameter), 5 µm (Whatman™ 111113 Nucleopore™ Track-Etch Polycarbonate Membrane filter, 47 mm diameter), 0.8 µm (Whatman™ 111109 Nucleopore™ Track-Etch Polycarbonate Membrane filter, 47 mm diameter), and 0.2 µm (Whatman™ 111106 Nucleopore™ Track-Etch Polycarbonate Membrane filter, 47 mm diameter).

## DNA extraction, PCR and sequencing

Frozen oysters were ground in liquid nitrogen in 50 ml stainless steel bowls using 20 mm diameter grinding balls (Retsch MM400 mill). The powders were stored at -80°C, and were then used for DNA extractions using the DNA from tissue Macherey-Nagel kit (reference 740952.250) according to the manufacturer's protocol. In order to improve DNA extractions, we nevertheless added a crushing step, that consisted in an additional 12 minutes mechanical lysis using zirconium beads before the 90 min enzymatic lysis in the presence of proteinase K. The same lysis and DNA extraction protocol was used for the different filters. DNA concentration and quality were checked with Epoch microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.).

Then, the 16S rRNA gene of bacterial communities was amplified and sequenced using the variable V3V4 loops (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; 805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') [35]. Paired-end sequencing (250 bp read length) was performed at the McGill University (Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada) on the MiSeq system (Illumina) using the v2 chemistry according to the manufacturer's protocol. Raw sequence data are available in the SRA database (BioProject ID PRJNA419907).

## Sequence analyses

The FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented into a galaxy instance (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) was used to define Operational Taxonomic Units (OTU), and computed taxonomic affiliations [36]. Briefly, paired reads were merged using FLASH [37]. After denoising and primer/adapters removal with cutadapt [38], *de novo* clustering was performed using SWARM that uses a local clustering threshold,

with aggregation distance  $d=3$  [39]. Chimera were removed using VSEARCH (*de novo* chimera detection) [40]. Particularly, this method divided each sequence into four fragments, and then looked for similarity with putative parents in the whole set of OTUs. We filtered the dataset for singletons and we annotated OTUs using Blast+ against the Silva database (release 123, September 2015) to produce an OTU and affiliation table in standard BIOM format. Rarefaction curves of species richness were produced using the {phyloseq} R package, and the rarefy\_even\_depth and ggrare functions [41]. The alpha diversity metrics (Chao1, Simpson and Shannon) were estimated at the OTU level with the estimate\_richness function. Moreover, Pielou's measure of species evenness was computed using the diversity function in {vegan}. We also used phyloseq to obtain abundances at different taxonomic ranks (from genus to phylum) (tax\_glom function). Multi-affiliation and unknown taxa were removed for the different taxonomic ranks if they corresponded to the addition of multiple OTUs having the same annotation. Because samples had different sequencing depths, we used relative abundances of OTUs and the different taxonomic ranks for subsequent analyses. We computed Bray-Curtis dissimilarities to study beta diversity, *i.e.*, distances between samples for OTU compositions (vegdist function, {vegan}).

## Statistical and multivariate analyses

All statistical analyses were done using R v3.3.1 (R: a language and environment for statistical computing, 2008; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.R-project.org>]).

Clustering and ordination methods were used to describe and compare composition of microbial communities between samples. Hierarchical clustering (average linkage (hclust {stats})) and principal coordinate analyses (hereafter named PCoA) of microbial communities were computed using Bray-Curtis dissimilarities (vegdist {vegan}). Factors associated to each sample were plotted face to clustering using the heatmap.2 function and the {gplots} package. Variability of oyster microbiota for stressful and non-stressful periods was estimated using PCoA and distances to centroid using betadisper {vegan}.

In order to explain modifications of microbial assemblages, we used redundancy analysis [42] which investigate the variations of the different OTUs under the constraint of different factors. OTUs were Hellinger-transformed [43] before testing their links with the following



variables: family, period (stressful or non-stressful) and site (Atlantic Ocean or Mediterranean Sea) of transplantation. In particular, we estimated the influence of these variables on microbial assemblages using rda and anova.cca functions (`{vegan}`).

We performed Student's t-test (`t.test {stats}`) or non-parametric Wilcoxon test (`wilcox.test {stats}`) (when normality was rejected with the Shapiro-Wilk test, (`shapiro.test {stats}`)) to compare oyster families for (i) alpha diversity metrics (Chao1, Simpson, evenness and Shannon), and (ii) distances to centroid.

Wilcoxon tests were used to identify candidates (OTUs or orders) related to (i) seawater or oysters, and to (ii) stressful or non-stressful periods.

Finally, we computed enrichment analyses of the significant OTUs to identify over-represented higher taxonomic ranks using Fisher's exact tests at each taxonomic rank.

For all analyses, the threshold significance level was set at 0.05. P-values were corrected for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg's method [44] (`p.adjust, {stats}`).

## Results

### **Environmental conditions highly influenced oyster microbiota**

Oyster families were produced using wild genitors sampled from sites of high and low density of oyster populations. Full-sib progenies of five biparental families (F09, F15, F21, F32 and F44) were produced and maintained in a controlled condition (laboratory of Argenton, France). In order to study microbiota compositions in changing environments, individuals of each oyster family were then transplanted from the controlled condition into two natural environments at two time periods (non-stressful or stressful) for five days (Fig. 1). For the five conditions of this study, microbial communities were sequenced using the 16S rRNA gene from about 14 individuals of each oyster families (347 oyster-associated microbiota), and from seawater (19 filters). In average, each sample contained ~17,550 sequences representing ~1,140 OTUs (Fig. S2-S4, Table S2 and S3).

First, oyster microbiota were highly variable between the different conditions (Fig. 2 and Fig. S5). Particularly, we used redundancy analyses to identify factors (oyster family, period (non-stressful or stressful) and site (Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea) of transplantation) that significantly explained microbiota changes in the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. We found that the period and site of transplantation were the most important factors ( $p=0.001$ ) (Fig. 3A and Fig. S5). Hence, the environment highly influenced the composition of oyster microbiota.

### **Oyster tissues nevertheless exhibited different ecological niches from seawater**

Although environmental conditions highly influenced oyster microbiota, we found that oyster tissues constituted different ecological niches from seawater.

First, redundancy analysis also highlighted the effect of oyster family on oyster microbiota ( $p=0.001$ ) (Fig. 3A). In particular, this variable significantly constrained bacterial assemblages within the five conditions (Fig. 3B). Secondly, analyses of oyster-associated and seawater bacterial communities revealed that both types clustered separately within the five conditions (Fig. 2). Notably, the most abundant OTUs for seawater and oysters belonged to bacterial families Rhodobacteraceae (~16% of total sequences) and Mycoplasmataceae (~11.4% of total sequences), respectively. To identify significant differences between

seawater and oysters for OTUs, we computed non-parametric Wilcoxon tests. While we found OTUs with significantly higher relative abundances in seawater compared to oysters (Table S4 and Fig. S6), we did not observed OTUs significantly associated with oysters. This lack of significance might result from our stringent analysis procedure. Indeed, the combination of Wilcoxon tests and p-values corrections for multiple comparisons only kept highly significant OTUs. However, it suggested that most oyster OTUs came from the environment, although oyster tissues constrained their growth. Among them, 48 OTUs from the Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria and Chloroflexi phyla were significantly higher in seawater for the four natural environments. Then we performed enrichment analyses of significant OTUs in each condition to identify taxonomic ranks that were over-represented in seawater. We found in particular that Proteobacteria from Rhodobacteraceae, Litoricolaceae, SAR86 and SAR116 families were enriched in seawater of natural environments.

Overall, these results suggested that oyster tissues constrained bacterial assemblages differently (i) from seawater, and even (ii) between oyster families having different genetic backgrounds.

# **Oyster families derived from farming area showed low mortality rates**

Then we particularly focused our attention on oyster microbiota and mortality rates in response to period of stress.

While no mortalities were observed for control and non-stressful periods in both the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea, many oysters died during stressful periods (in May and July for the Mediterranean and Atlantic sites, respectively). In particular, two oyster families (F15 and F32) displayed high mortality rates (hereafter named HM) (from 87 to 100%, n=125 oysters per family) in both geographic regions, whereas the three others (F09, F21 and F44) showed lower mortality rates (hereafter named LM) (from 0 to 52%, n=125 oysters per family) (Fig. 4). Notably, these two clusters of phenotypes were not linked to geographic origin of genitors (Atlantic Ocean or Mediterranean Sea), but rather to the fact that they originated or not from farming areas. This suggested that selective pressures by pathogens were higher in farming areas.

## **Microbiota of LM oysters were more diverse and stable in stressful periods**

Although high mortality rates affected HM oyster families, no clear pattern of microbiota dysbiosis was observed during stressful periods (Fig. 2). Oysters were placed for five days in the field, because previous observations showed that this time period was long enough for disease development, but not for mortality [27]. As a consequence, disease possibly just started after five days in our experiment, and we expected to find fine-scale changes of microbial communities rather than complete dysbiosis. We thus studied more precisely microbiota of LM and HM using alpha (Chao1, Simpson, evenness and Shannon) and beta (Bray-Curtis dissimilarities) diversity indices.

First, analyses of alpha diversity (Table S5) showed that LM had higher values of Simpson, evenness, and Shannon indices than HM in control, and in the stressful period for the Atlantic Ocean (Table 1). Moreover, LM had also higher values of evenness in the Mediterranean Sea, but we did not identify significant differences for Simpson and Shannon.

Secondly, we used Bray-Curtis dissimilarities and PCoA to estimate the variability of bacterial assemblages for LM and HM at different taxonomic ranks using distances to centroid as a proxy. We found that oyster-associated microbiota were less variable for LM than HM in controlled condition for many taxonomic ranks ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test; except for family, class and phylum) (Table 2). Furthermore, while no significant differences were observed between LM and HM during the stressful period in the Mediterranean Sea, LM microbiota were also less variable than HM for the stressful period in the Atlantic Ocean considering higher taxonomic ranks (from order to class;  $p < 0.01$ , Wilcoxon test), but the opposite trend was observed for OTUs in the same region ( $p = 0.02$ , Wilcoxon test).

Hence, all these results suggested that although no clear pattern of microbiota dysbiosis was observed during stressful periods, microbiota of HM families had lower diversity than LM in the Atlantic Ocean. In addition, HM microbiota assemblages were more variable than LM at higher taxonomic ranks, and less variable for OTUs within this region. In contrast, few significant differences were observed in the Mediterranean Sea for microbiota diversity and assemblage variability. It suggested that disease development did not start before oysters were sampled after five days of transplantation in this region.

## **Microbiota of LM oysters had significant increase of cyanobacteria**

Our results revealed that oyster microbiota of LM showed higher variability and stability than HM in the Atlantic Ocean for OTU and orders, respectively. As a consequence, we used Wilcoxon tests to compare taxa of non-stressful and stressful periods within this region. In particular, we tried to identify parallel changes between oyster families of both LM and HM.

First, LM shared increased abundances of 16 OTUs in stressful period (Fig. 5A and Table S4), and HM had similar decreases for 29 OTUs (Table S4). In particular among them, five cyanobacteria and three Flavobacteriaceae were significant for LM, and 13 Flavobacteriaceae and five Erythrobacteraceae significantly decreased for HM. Then enrichment analyses of the significant OTUs for each oyster family highlighted that variability mostly concerned cyanobacteria (Subsection III, Family I) for all LM. In contrast, decreased OTUs over-represented Flavobacteriaceae and Erythrobacteraceae families for all HM. Furthermore, we found that although LM had similar increases for 3 bacterial orders in stressful period (Acidobacteria Subgroup 3, Holophagae Subgroup 10, Phycisphaerales), 4 other orders were stable compared to HM (Fig. 5B). Particularly, the relative abundances of Rhodospirillales increased in stressful period for HM, and the fraction of Rhodobacterales, Sphingomonadales, and Cytophagia (Order II) significantly decreased.

## Discussion

### Oyster microbiota were influenced by the environmental conditions

We found that the environment highly constrained oyster microbiota. This was not surprising because oysters are sessile organisms that filter seawater to feed. Hence, because they face continuous environmental changes, it is expected that microbiota reaches different stable states [45]. Moreover, stable interactions across environments may not be favored in oysters, because they do not have specialized anatomical structures hosting microbiota [17], such as nodules of legume plant [46], or light organ of bobtail squid [47]. As a consequence and according to our observations that oyster microbiota is highly variable, we hypothesize that oyster bacterial assemblages have high diversity, high horizontal transmission of facultative symbionts, high efficiency to purge deleterious mutations, and that they may facilitate rapid acclimation to environmental changes [17].

### Mortality rates were linked to the origin of genitors

Oysters were transplanted for five days in the field. According to previous observations [27], this time period was considered sufficient for disease development during stressful periods, and no mortalities were observed before oysters were sampled. As a consequence, we could analyze microbiota modifications linked to perturbations (*i.e.*, environmental changes), and not to moribund individuals.

To date, most oyster diseases were associated to *Vibrio* strains and *herpesvirus* (OsHV-1  $\mu$ var) [27,48,49], although other studies highlighted the role of *Roseovarius crassostreae* [50,51], *Tenacibaculum soleae* [52], and possibly Chlamydiales [53] and *Arcobacter* sp. [9,52]. Here we did not analyze the causal origin of diseases, but we observed similar mortality rates in both geographic regions. In particular, the five oyster families formed two clusters of low and high mortality rates during stressful periods in both the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea. Moreover, this clustering was highly associated to the origin of genitors from farming areas or sites with lower oyster densities. Thus these results highlighted that resistance to mortalities was (i) as previously observed influenced by oyster genetics [29], (ii) replicable between two French coastal regions, and (iii) higher for oyster families derived from genitors sampled in farming areas. Because aquaculture uses very high oyster densities, and is affected by many mortality syndroms [21,54], it is likely that selective pressures from

pathogens are higher in these areas. The low mortalities observed in this study for oyster progenies derived from genitors of farming areas thus suggested that past events might influence their current immune responses. In particular, these different mortality levels might be linked to transgenerational immune priming [55], and/or to natural selection of genetic variants.

# **Stability for bacterial orders and variability of OTUs were linked to oyster mortalities**

No clear patterns of microbiota dysbiosis were observed in both stressful periods for HM oyster families, suggesting that oysters were sampled before the massive community structure disruption that occurred for moribund and dead oysters [9]. In order to identify fine-scale modifications of oyster microbiota during disease development, we thus performed analyses of alpha diversity indices and variability of microbial assemblages using distances to centroid as a proxy.

Higher values of alpha diversity indices (Simpson, evenness, Shannon) was the most striking parallel found for LM compared to HM for the stressful period of the Atlantic Ocean. Particularly, this result highlighted that OTU abundances within LM microbiota were more equally distributed than HM microbiota. For example, evenness may possibly have important effects on oyster fitness, because it was already found to be positively linked to ecosystem productivity [56,57], functional stability [58,59], and invasion resistance [60,61]. Furthermore, for the stressful period of the Atlantic Ocean, LM were more stable than HM for higher taxonomic ranks, and more variable for OTUs. Similar results of stability were also obtained for hydra [16], and in oyster hemolymph [9]. However, we precisely identified the stable taxonomic ranks in this study (*i.e.*, from order to class).

Surprisingly, we did not find significant differences between HM and LM in the Mediterranean Sea for variability of microbial assemblages, and only evenness and Chao1 were significant for alpha diversity indices. Because oysters were all sampled after five days of transplantation, it is very likely that disease development was different between both geographic regions, and even between oyster families. Thus first signs of microbiota dysbiosis were possibly missed in this study if they occurred later in the Mediterranean Sea. For instance, it was observed in a previous work that primate microbiota was altered at the very last stages of a viral infection [62].



# **Rhodospirillales, Rhodobacterales, Flavobacteriaceae, Erythrobacteraceae and cyanobacteria are putative candidates associated to oyster fitness**

Because stability and variability of microbiota are putative beneficial characteristics of the holobiont [11,16], we tried to identify taxa related to LM and HM in the Atlantic Ocean where differences for microbiota diversity and stability were observed. We particularly focused our attention on parallel changes between oyster families, as they could point out factors involved in adaptive processes [63–65]. Furthermore, parallels are likely to be reproducible in future studies.

Similarly to *C. virginica* oysters from Hackberry Bay [66], Mycoplasmataceae was the dominant taxa of oyster microbiota in this study. Despite this dominance, stability of the Rhodospirillales and Rhodobacterales orders, and Erythrobacteraceae and Flavobacteriaceae families might be the most important factor for oyster fitness. Indeed, HM had high significant changes for both orders between non-stressful and stressful periods. Moreover, enrichment analysis showed that Erythrobacteraceae and Flavobacteriaceae families were over-represented by OTUs that significantly decreased between both time periods. Among them, Erythrobacteraceae were already isolated from marine invertebrates [67], and Rhodospirillales were found in diseased tissues of *Platygyra carnosus* corals [68]. Conversely, presence and variability of cyanobacteria OTUs might be linked to rapid acclimation of oyster holobiont to environmental changes. Indeed, increased OTUs in stressful period for LM over-represented cyanobacteria (Subsection III, Family I). Although cyanobacteria had a negative effect on other marine invertebrates such as scleractinian corals [69], they were already observed at high relative abundances within oyster microbiota [70]. Particularly, they were abundant in the digestive gland, connective tissue, mantle, and gonad of oysters [71]. Because cyanobacteria persisted in oyster tissues without signs of alterations, a possible endosymbiotic relationship was even proposed [71]. Notably, cyanobacteria were also negatively correlated to culturable *Vibrio* abundance in free-living microbial communities [72]. Hence, cyanobacteria might play a role of barrier for competitors/pathogens, because vibrios are the main bacterial pathogens of oysters [54]. In particular, photosynthetic activity of cyanobacteria could inhibited pathogen growth through the production of reactive oxygen species, such as observed for *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae* [73].

## Conclusions

Our study highlighted that oyster microbiota were highly influenced by environmental conditions. However, different ecological niches existed for bacterial communities between seawater and oyster tissues, and even between oyster families having different genetic backgrounds. Although similar mortality rates were observed for each family in the two geographic regions 12 days after transplantation, disease development during stressful periods were possibly more advanced at the time of sampling in the Atlantic Ocean compared to the Mediterranean Sea. Thus, we recommended that future studies control disease development in order to compare microbiota of different individuals at the same stage of infection. For the Atlantic Ocean, we identified many links between microbiota characteristics and oyster mortalities, and particularly that LM had higher diversity, higher variability of bacterial OTUs and higher stability of bacterial orders and classes compared to HM. Furthermore, Rhodospiralles and Rhodobacterales orders, as well as Erythrobacteraceae, Flavobacteriaceae, and cyanobacteria (Subsection III, Family I) families were putative candidates associated with oyster fitness.

However, we did not know whether these differences were causes or consequences of the observed mortalities. Hence, experimental microbiota manipulations might help in the future to understand if such modifications favored oysters facing recurrent mortality syndroms. For example, they might lead to develop farming procedures using bacterial probiotics.

## Declarations

Ethics approval and consent to participate: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Availability of data and materials: The datasets generated during the current study are available in the Sequence Read Archive repository under BioProject ID PRJNA419907 (to be released upon publication).

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: CC benefited of post-doctoral fellowships from CNRS and IFREMER. This work was supported by the French National Research Agency ANR, project ANR-14-CE19-0023

DECIPHER (coordinator G. Mitta) and the DHOF program of the UMR5244/IHPE (<http://ihpe.univ-perp.fr/en/ihpe-transversal-holobiont/>). This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and innovation programme under grant agreement N° 678589.

Authors' contributions: CC, JDL, JME, YG, GM and ET were involved in the study concept and design. BP was involved in the generation and maintaining of all animals used in this study. JDL, BP, JME, YG, GM and ET were involved in the collection of samples. CC, JDL, AL and ET were involved in data acquisition and analysis. CC and ET drafted the manuscript and all authors contributed to critical revisions and approved the final manuscript.

Acknowledgements: We thank IHPE members for stimulating discussions. We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing help and computing resources thanks to Galaxy instance <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>.

461

# References

- 462 1. Guidot A, Jiang W, Ferdy J-B, Thebaud C, Barberis P, Gouzy J, et al. Multihost  
463 experimental evolution of the pathogen *Ralstonia solanacearum* unveils genes involved in  
464 adaptation to plants. *Mol Biol Evol.* 2014;31:2913–28.
- 465 2. Wilkinson CR. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and  
466 water bacterial populations. *Mar Biol.* 1978;49:169–176.
- 467 3. Epstein B, Branca A, Mudge J, Bharti AK, Briskine R, Farmer AD, et al. Population  
468 genomics of the facultatively mutualistic bacteria *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae*.  
469 *PLoS Genet.* 2012;8:e1002868.
- 470 4. Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, van Opstal EJ, Bordenstein SR. Phyllosymbiosis:  
471 relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary  
472 history. *PLOS Biol.* 2016;14:e2000225.
- 473 5. Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N, others. Diversity and distribution of coral-  
474 associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser.* 2002;243:1–10.
- 475 6. Fraune S, Bosch TC. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the  
476 basal metazoan *Hydra*. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:13146–13151.
- 477 7. Roterman YR, Benayahu Y, Reshef L, Gophna U. The gill microbiota of invasive and  
478 indigenous *Spondylus* oysters from the Mediterranean Sea and northern Red Sea. *Environ*  
479 *Microbiol Rep.* 2015;7:860–7.
- 480 8. Cárdenas A, Rodríguez-R LM, Pizarro V, Cadavid LF, Arévalo-Ferro C. Shifts in bacterial  
481 communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease.  
482 *ISME J.* 2012;6:502–512.
- 483 9. Lokmer A, Wegner KM. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to  
484 temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* 2015;9:670–682.
- 485 10. McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TC, Carey HV, Domazet-Lošo T, Douglas AE, et  
486 al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci.*  
487 2013;110:3229–3236.
- 488 11. Miller CP, Bohnhoff M, Rifkind D. The effect of an antibiotic on the susceptibility of the  
489 mouse's intestinal tract to *Salmonella* infection. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1957;68:51.
- 490 12. Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. Facultative bacterial symbionts in aphids  
491 confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:1803–1807.
- 492 13. Clay K. Fungal endophytes of grasses. *Annu Rev Ecol Syst.* 1990;21:275–97.
- 493 14. Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon M-A, Billheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, et al.  
494 Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-  
495 legged frog, *Rana muscosa*. *Biol Conserv.* 2007;138:390–8.
- 496 15. Fraune S, Forêt S, Reitzel AM. Using *Nematostella vectensis* to study the interactions  
497 between genome, epigenome, and bacteria in a changing environment. *Front Mar Sci.*  
498 2016;3:148.
- 499 16. Mortzfeld BM, Urbanski S, Reitzel AM, Künzel S, Technau U, Fraune S. Response of  
500 bacterial colonization in *Nematostella vectensis* to development, environment and  
501 biogeography. *Environ Microbiol.* 2016;18:1764–1781.
- 502 17. Shapira M. Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends Ecol Evol.*  
503 2016;31:539–49.
- 504 18. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota - masters of host development and physiology.  
505 *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:227–38.
- 506 19. Wang J, Linnenbrink M, Künzel S, Fernandes R, Nadeau M-J, Rosenstiel P, et al. Dietary  
507 history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the  
508 intestinal microbiome of wild mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:E2703–10.
- 509 20. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet

dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*. 2015;17:72–84.

21. Barbosa Solomieu V, Renault T, Travers M-A. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*. 2015;131:2–10.

22. Pernet F, Lupo C, Bacher C, Whittington RJ. Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371:20150213.

23. Malham SK, Cotter E, O’Keeffe S, Lynch S, Culloty SC, King JW, et al. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*. 2009;287:128–38.

24. Pernet F, Barret J, Le Gall P, Corporeau C, Dégremont L, Lagarde F, et al. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquac Environ Interact*. 2012;2:215–37.

25. Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac Environ Interact*. 2013;3:257–73.

26. Dégremont L, Lamy J-B, Pépin J-F, Travers M-A, Renault T. New insight for the genetic evaluation of resistance to Ostreid herpesvirus infection, a worldwide disease, in *Crassostrea gigas*. *PloS One*. 2015;10:e0127917.

27. Petton B, Bruto M, James A, Labreuche Y, Alunno-Bruscia M, Le Roux F. *Crassostrea gigas* mortality in France: the usual suspect, a herpes virus, may not be the killer in this polymicrobial opportunistic disease. *Front Microbiol*. 2015;6:686.

28. Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, Ropert M, Huvet A, Moal J, et al. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 2005;249:213–29.

29. Samain JF, Dégremont L, Soletchnik P, Haure J, Bédier E, Ropert M, et al. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 2007;268:227–43.

30. Wendling CC, Fabritzek AG, Wegner KM. Population-specific genotype x genotype x environment interactions in bacterial disease of early life stages of Pacific oyster larvae. *Evol Appl*. 2017;10:338–47.

31. Le Roux F. Diagnosis of vibriosis in the era of genomics: lessons from invertebrates. *Rev Sci Tech OIE*. 2016;35:259–69.

32. Dégremont L, Nourry M, Maurouard E. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture*. 2015;446:111–21.

33. Bruto M, James A, Petton B, Labreuche Y, Chenivesse S, Alunno-Bruscia M, et al. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME J*. 2017;11:1043–52.

34. Rico-Villa B, Pouvreau S, Robert R. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 2009;287:395–401.

35. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:e1–e1.

36. Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*. 2017;doi:10.1093/bioinformatics/btx791.

37. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome

assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27:2957–63.

38. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011;17:pp–10.

39. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*. 2015;3:e1420.

40. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016;4:e2584.

41. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. Watson M, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e61217.

42. Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;62:142–60.

43. Legendre P, Gallagher E. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*. 2001;129:271–80.

44. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B*. 1995;289–300.

45. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15:630–8.

46. Udvardi M, Poole PS. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64:781–805.

47. McFall-Ngai MJ. The importance of microbes in animal development: lessons from the squid-*Vibrio* symbiosis. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:177–94.

48. Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, Lambert C, Nicolas J. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*. 2006;30:367–79.

49. Batista FM, López-Sanmartín M, Grade A, Morgado I, Valente M, Navas JI, et al. Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: insights into viral origin and spread. *Aquaculture*. 2015;435:43–51.

50. Boettcher KJ. *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:1531–7.

51. Maloy AP, Ford SE, Karney RC, Boettcher KJ. *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 2007;269:71–83.

52. Burioli EAV, Varello K, Trancart S, Bozzetta E, Gorla A, Prearo M, et al. First description of a mortality event in adult Pacific oysters in Italy associated with infection by a *Tenacibaculum soleae* strain. *J Fish Dis*. 2017;1–7.

53. Renault T, Cochenne N. Chlamydia-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis Aquat Organ*. 1995;23:153–9.

54. Le Roux F, Wegner KM, Polz MF. Oysters and vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. *Trends Microbiol*. 2016;24:568–80.

55. Wang L, Yue F, Song X, Song L. Maternal immune transfer in mollusc. *Dev Comp Immunol*. 2015;48:354–9.

56. Wilsey BJ, Potvin C. Biodiversity and ecosystem functioning: importance of species evenness in an old field. *Ecology*. 2000;81:887–892.

57. Zhang Y, Chen HYH, Reich PB. Forest productivity increases with evenness, species richness and trait variation: a global meta-analysis. *J Ecol*. 2012;100:742–9.

58. Balvanera P, Kremen C, Martínez-Ramos M. Applying community structure analysis to ecosystem function: examples from pollination and carbon storage. *Ecol Appl*. 2005;15:360–



375.

59. Wittebolle L, Marzorati M, Clement L, Balloi A, Daffonchio D, Heylen K, et al. Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature*. 2009;458:623–6.

60. Wilsey BJ, Polley HW. Reductions in grassland species evenness increase dicot seedling invasion and spittle bug infestation. *Ecol Lett*. 2002;5:676–684.

61. De Roy K, Marzorati M, Negroni A, Thas O, Balloi A, Fava F, et al. Environmental conditions and community evenness determine the outcome of biological invasion. *Nat Commun*. 2013;4:1383.

62. Barbian HJ, Li Y, Ramirez M, Klase Z, Lipende I, Mjungu D, et al. Destabilization of the gut microbiome marks the end-stage of simian immunodeficiency virus infection in wild chimpanzees. *Am J Primatol*. 2015;doi:10.1002/ajp.22515.

63. Tenaillon O, Rodriguez-Verdugo A, Gaut RL, McDonald P, Bennett AF, Long AD, et al. The molecular diversity of adaptive convergence. *Science*. 2012;335:457–61.

64. Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet*. 2014;47:57–64.

65. Harrison E, Guymer D, Spiers AJ, Paterson S, Brockhurst MA. Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum. *Curr Biol*. 2015;25:2034–9.

66. King GM, Judd C, Kuske CR, Smith C. Analysis of stomach and gut microbiomes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. Neufeld J, editor. *PLoS ONE*. 2012;7:e51475.

67. Ivanova EP, Bowman JP, Lysenko AM, Zhukova NV, Gorshkova NM, Kuznetsova TA, et al. *Erythrobacter vulgaris* sp. nov., a novel organism isolated from the marine invertebrates. *Syst Appl Microbiol*. 2005;28:123–30.

68. Ng JCY, Chan Y, Tun HM, Leung FCC, Shin PKS, Chiu JMY. Pyrosequencing of the bacteria associated with *Platygyra carnosus* corals with skeletal growth anomalies reveals differences in bacterial community composition in apparently healthy and diseased tissues. *Front Microbiol*. 2015;6:1142.

69. Meyer JL, Gunasekera SP, Scott RM, Paul VJ, Teplitski M. Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. *ISME J*. 2016;10:1204–1216.

70. Chauhan A, Wafula D, Lewis DE, Pathak A. Metagenomic assessment of the Eastern oyster-associated microbiota. *Genome Announc*. 2014;2:e01083-14-e01083-14.

71. Avila-Poveda OH, Torres-Ariño A, Girón-Cruz DA, Cuevas-Aguirre A. Evidence for accumulation of *Synechococcus elongatus* (Cyanobacteria: Cyanophyceae) in the tissues of the oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Tissue Cell*. 2014;46:379–87.

72. Turner JW, Good B, Cole D, Lipp EK. Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME J*. 2009;3:1082.

73. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, et al. Natural microbe-mediated refractoriness to plasmodium infection in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2011;332:855–8.



## Legends of figures

**FIG. 1. Experimental design.** Five oyster full-sib families produced with genitors from different origins in terms of geography (Atlantic Ocean or Mediterranean Sea) and area (from farming area or sites where densities of oyster populations were lower) were produced in controlled condition (hatchery), and placed for five days in natural conditions in the Atlantic Ocean (latitude: 48.335263; longitude: 4.317922) or the Mediterranean Sea (latitude: 43.379087; longitude: 3.571483) at two time periods (non-stressful or stressful). Then, oysters were flash frozen, DNA were extracted, and microbiota were sequenced using 16S rRNA gene-metabarcoding.

**FIG. 2. Clustering analyses of microbial communities in the five conditions.** Dark blue, light blue, black, light green, dark green, and orange boxes correspond to F09, F15, F21, F32, F44 and seawater, respectively. Clustering were computed using Bray-Curtis dissimilarities based on relative abundances of OTUs, and the average linkage method.

**FIG. 3. Redundancy analyses of oyster microbiota.** Plots show cumulative variations explained by the addition of variables using redundancy analysis. Period: period of transplantation (stressful or non-stressful). Site: site of transplantation (Atlantic Ocean or Mediterranean Sea). Family: oyster families. Residuals: fraction not explained by the variables used in this study. **A.** Analyses based on the microbiota samples from Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. **B.** Analyses of the five conditions.

**FIG. 4. Mortalities rates (%) for the five oyster families recorded for the transplantation experiments realized during stressful periods.** Mortalities were estimated 12 days after individuals were placed in the Atlantic Ocean or in the Mediterranean Sea sites.

**FIG. 5. Variability and stability of LM microbiota compared to HM in the Atlantic Ocean.** **A.** Significant increased OTUs for all LM and no HM. **B.** Significant changes of bacterial orders for all HM and no LM.

## 678 Tables

679 **Table 1. Comparison of alpha diversity indices between LM and HM.** Numbers into  
680 brackets are p-values. NS: not significant. LM or HM indicate which group had significantly  
681 higher values.

Index	Hatchery (control)	Med. Sea (non- stressful)	Atl. Ocean (non- stressful)	Med. Sea (stressful)	Atl. Ocean (stressful)
Chao1	NS (0.74)	LM (0.042)	NS (0.199)	HM (0.033)	NS (0.080)
Simpson	LM (0.005)	NS (0.848)	HM (0.024)	NS (0.059)	LM (<0.001)
Evenness	LM (0.003)	NS (0.722)	NS (0.918)	LM (0.039)	LM (<0.001)
Shannon	LM (0.004)	NS (0.565)	NS (0.913)	NS (0.085)	LM (<0.001)

682

683 **Table 2. Comparison of microbiota variability between LM and HM.** Numbers into  
684 brackets are p-values. NS: not significant. LM and HM indicate which group had significantly  
685 higher values.

Taxonomic rank	Hatchery (control)	Med. Sea (non- stressful)	Atl. Ocean (non- stressful)	Med. Sea (stressful)	Atl. Ocean (stressful)
OTU	HM (0.044)	HM (0.036)	NS (0.427)	NS (0.278)	LM (0.023)
Genus	HM (0.026)	NS (0.889)	NS (0.358)	NS (0.730)	NS (0.507)
Family	NS (0.925)	NS (0.676)	NS (0.385)	NS (0.694)	NS (0.944)
Order	HM (0.036)	NS (0.676)	NS (0.376)	NS (0.793)	HM (0.012)
Class	NS (0.828)	NS (0.464)	NS (0.239)	NS (0.909)	HM (0.001)
Phylum	NS (0.844)	NS (0.076)	LM (0.020)	NS (0.938)	NS (0.865)

686

687

## Supplementary informations

**FIG. S1. Origin of the five oyster full-sib families.** F09, F21 and F44 were isolated in farming area, where densities of oyster populations and pathogens are expected to be high. F09: Logonna Daoulas (latitude: 48.335263; longitude: -4.317922); F15: Dellec (latitude: 48.353970; longitude: -4.566123); F21: Charente Maritime (latitude: 45.781741; longitude: -1.121910); F32: Vidourle (latitude: 43.553906; longitude: 4.095175); F44: pond of Thau (latitude: 43.418736; longitude: 3.622620).

**FIG. S2. Rarefaction analysis of species richness for oyster microbiota and filters in the controlled condition (hatchery).**

**FIG. S3. Rarefaction analysis of species richness for oyster microbiota and filters in the Mediterranean Sea.** SW: seawater.

**FIG. S4. Rarefaction analysis of species richness for oyster microbiota and filters in the Atlantic Ocean.** SW: seawater.

**FIG. S5. Clustering analyses of oyster microbiota from the whole samples of natural environments.** For the family variable, dark blue, light blue, black, light green, and dark green boxes correspond to F09, F15, F21, F32, and F44, respectively. For the geographic origin, dark and light blue correspond to Atlantic Ocean and Mediterranean Sea, respectively. For area of origin, dark and light blue correspond to farming and non-farming areas, respectively. For transplantation site, dark and light blue correspond to Atlantic Ocean and Mediterranean Sea, respectively. For period of transplantation, dark and light blue correspond to stressful and non-stressful periods, respectively. Mortality rates (%) and temperatures from low to high are indicated by light to dark red. Clustering were computed using Bray-Curtis dissimilarities based on relative abundances of OTUs, and the average linkage method.

**FIG. S6. Similarities for significant OTUs between the five conditions (A) and oyster families (B).** Black numbers indicate seawater- and stressful-associated OTUs for the five conditions and oyster families, respectively. Red numbers indicate oyster- and non-stressful-associated OTUs for the five conditions and oyster families, respectively. This figure summarizes informations given in Table S4.

718 **TABLE S1. Temperatures in the five conditions.**

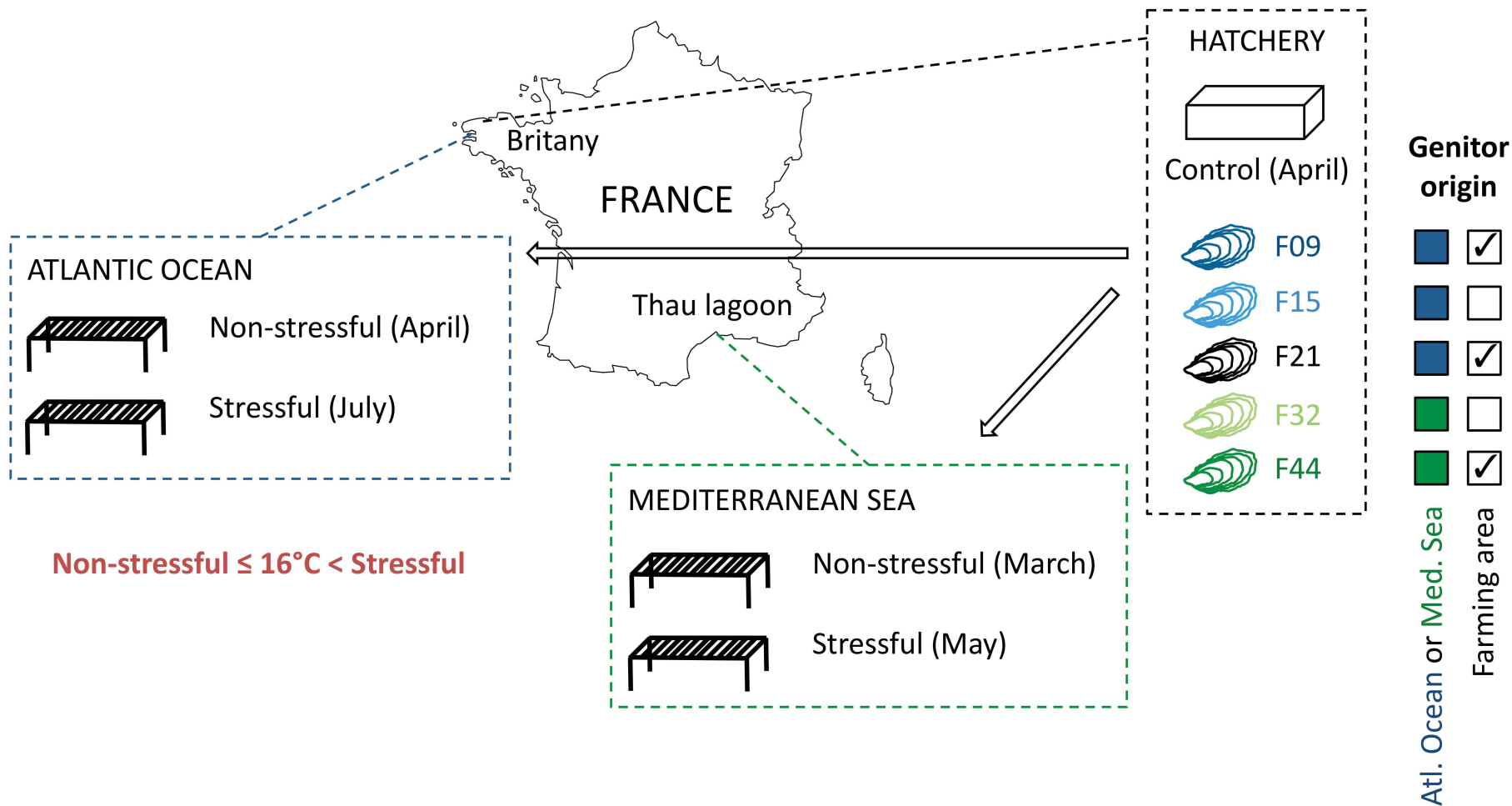
719 **TABLE S2. Number of sequences and OTUs.**

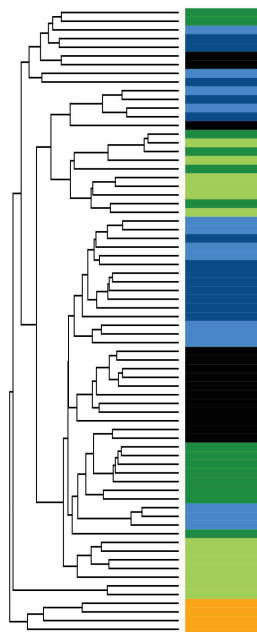
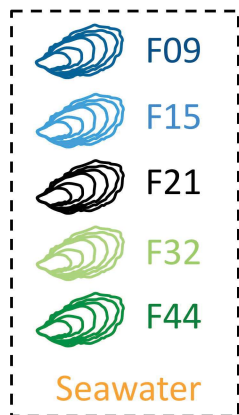
720 **TABLE S3. OTU annotations and abundances in the 347 oyster microbiota and on the**  
721 **19 filters of seawater microbial communities.**

722 **TABLE S4. Significant OTUs.** For columns *Seawater- or oyster-associated*, *seawater* and  
723 *oyster* indicate if abundances of each OTU were higher in seawater or within oysters,  
724 respectively ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test). For columns *Stressful- or non-stressful-associated*,  
725 *stressful* and *non-stressful* indicate if abundances of each OTU were higher in stressful or  
726 non-stressful periods for each oyster family, respectively ( $p < 0.05$ , Wilcoxon test). NS: not  
727 significant. NT: not tested (absent from the dataset).

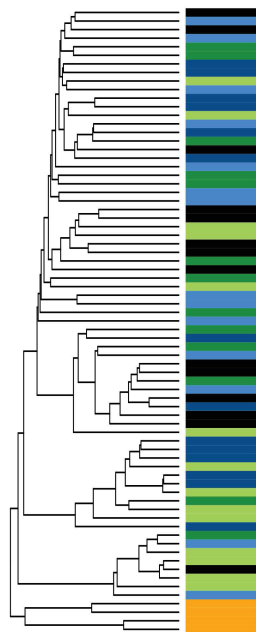
728 **TABLE S5. Metadata and alpha diversity indices.**

729

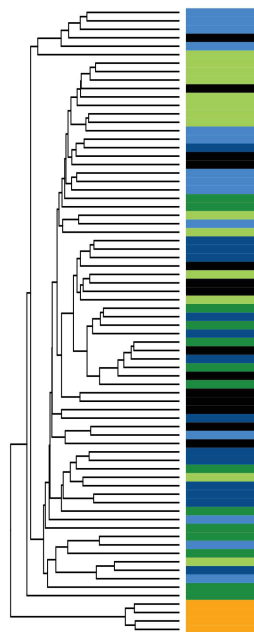




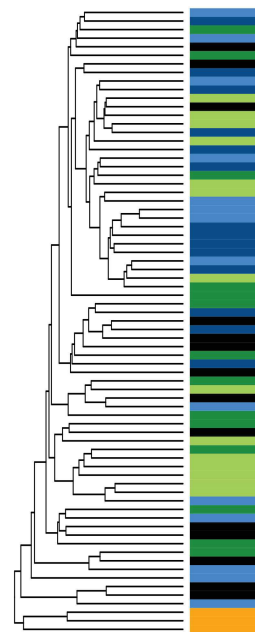
Hatchery  
(control)



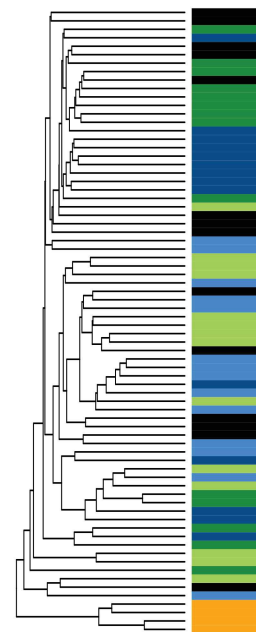
Med. Sea  
(non-stressful)



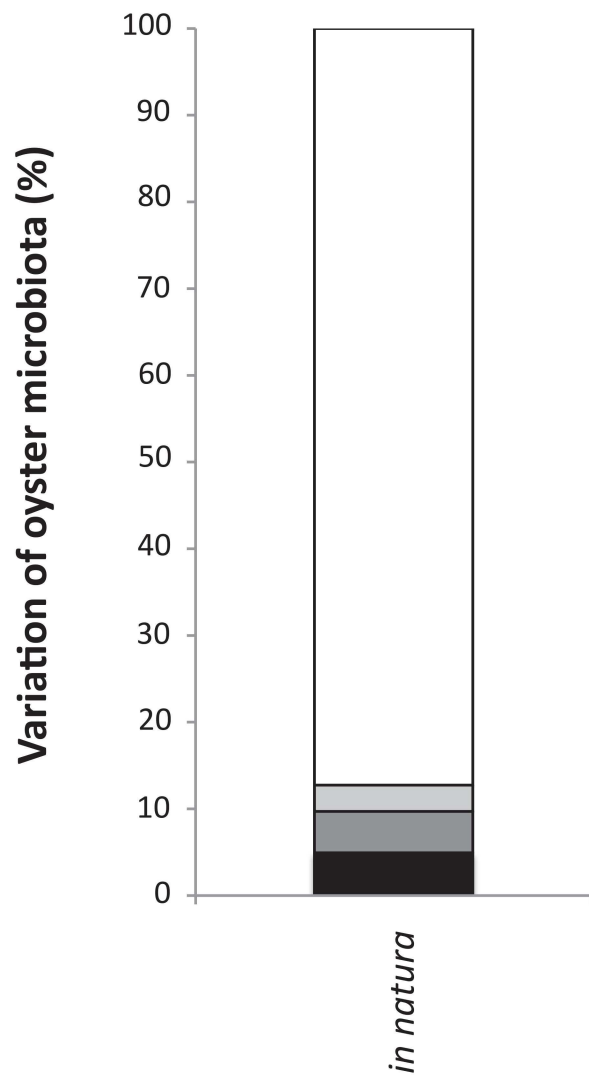
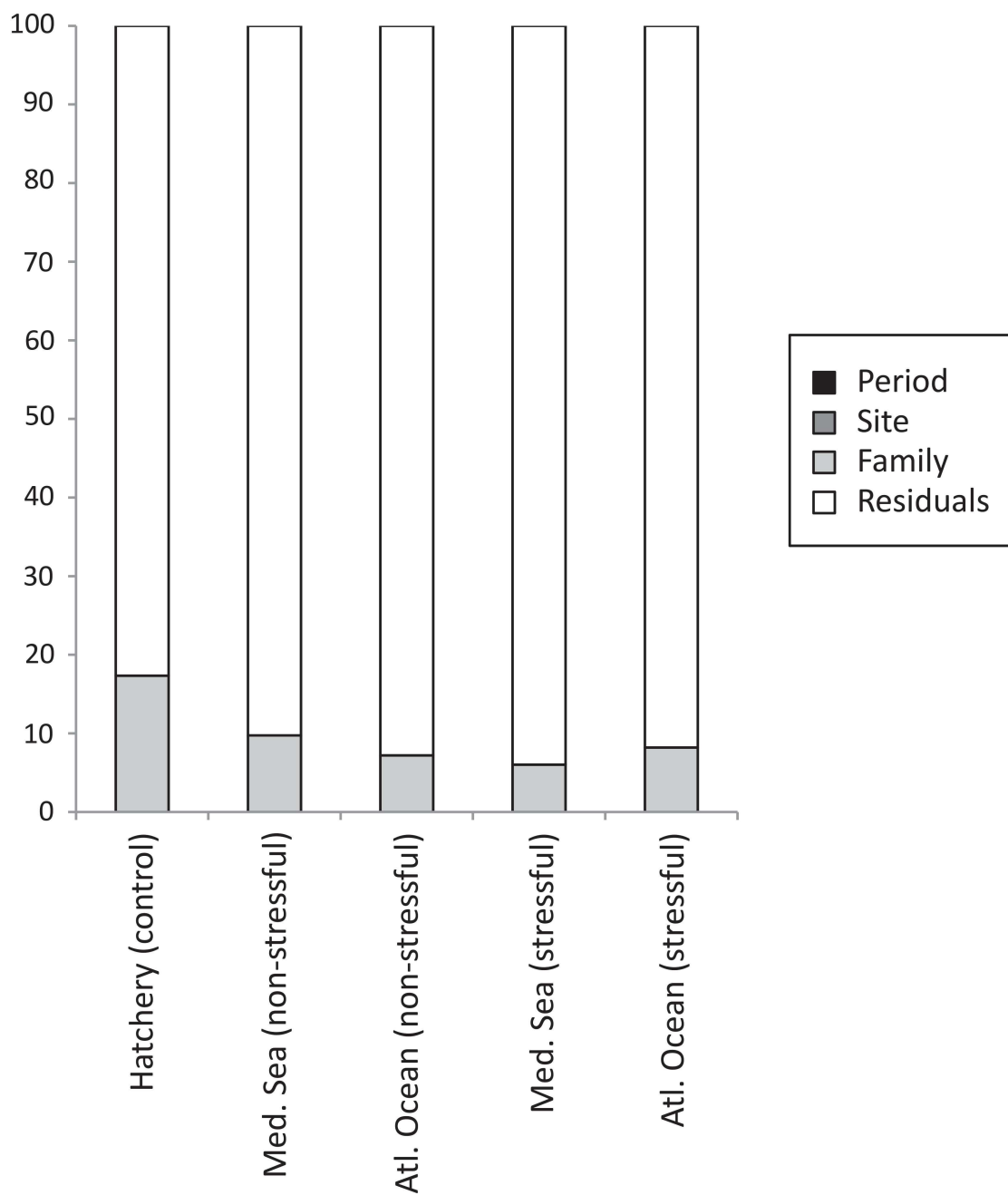
Atl. Ocean  
(non-stressful)



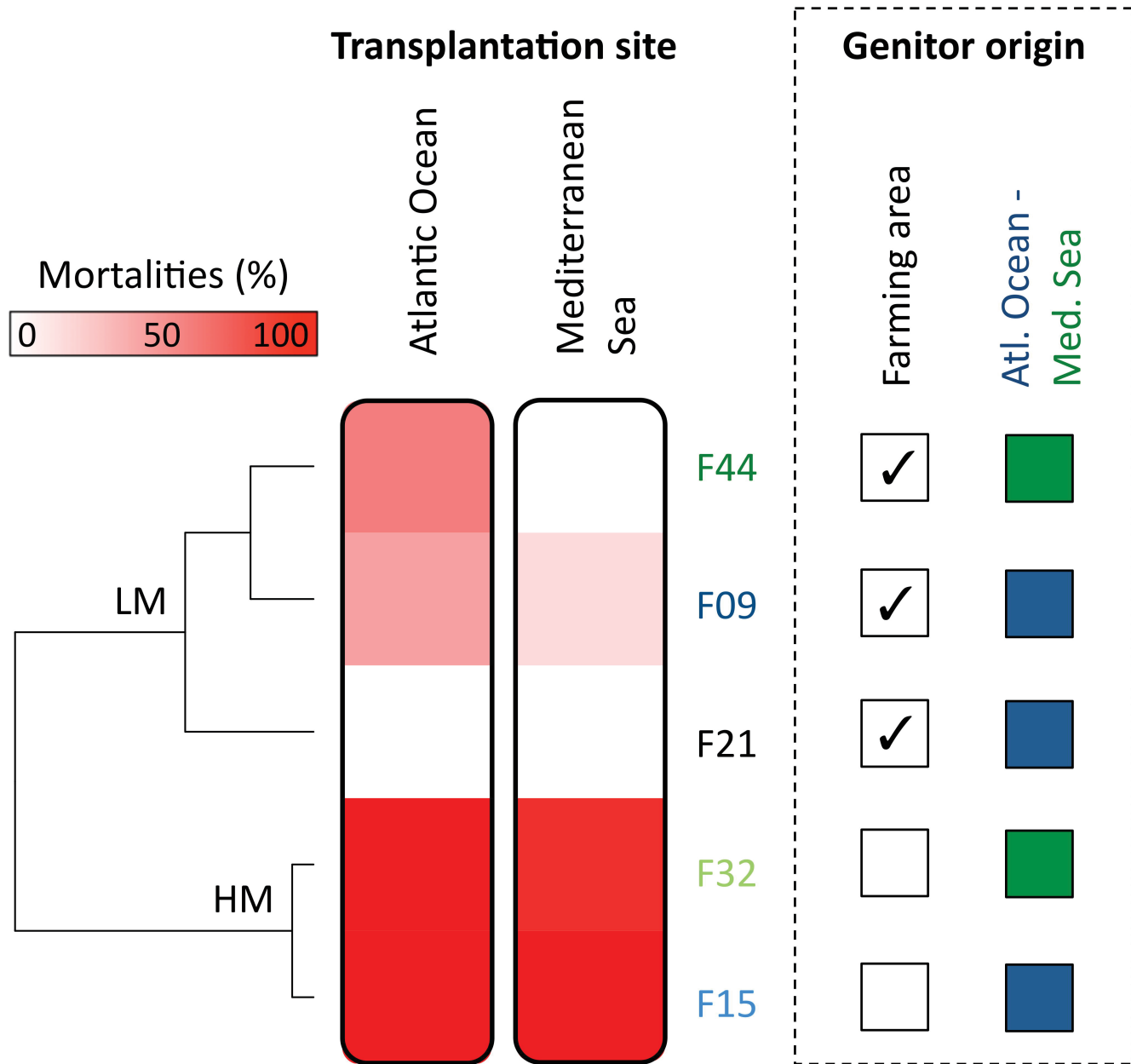
Med. Sea  
(stressful)



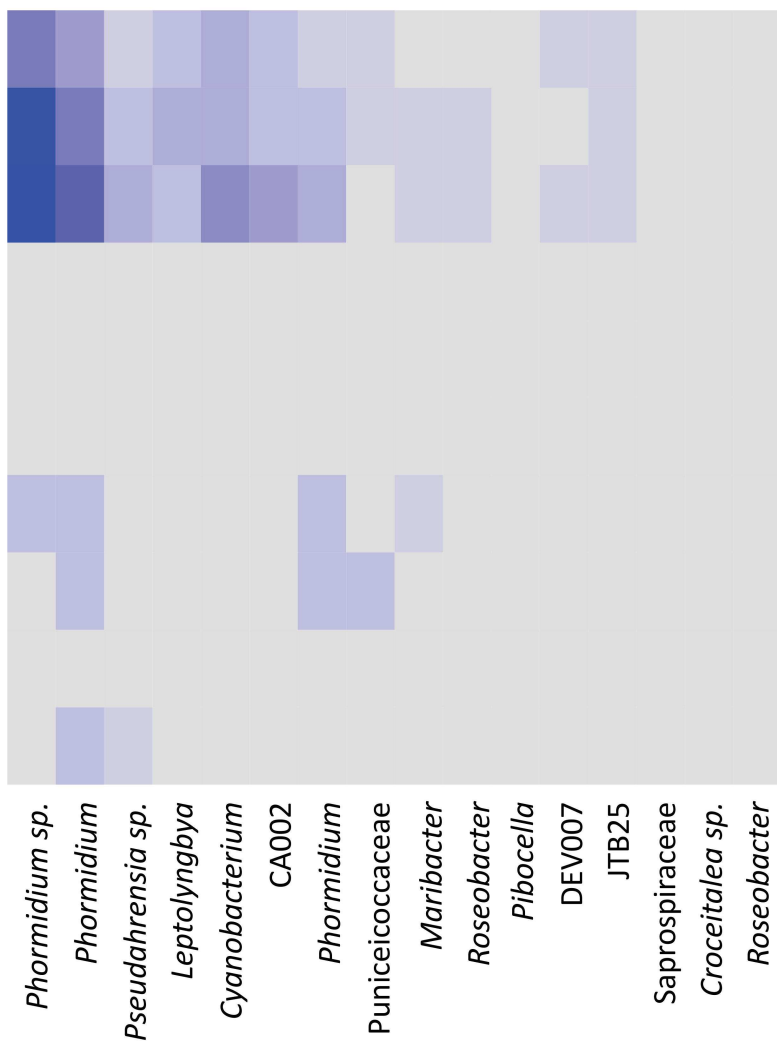
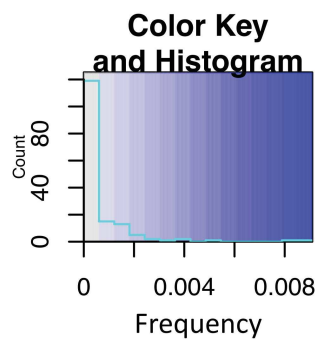
Atl. Ocean  
(stressful)

**A****B**

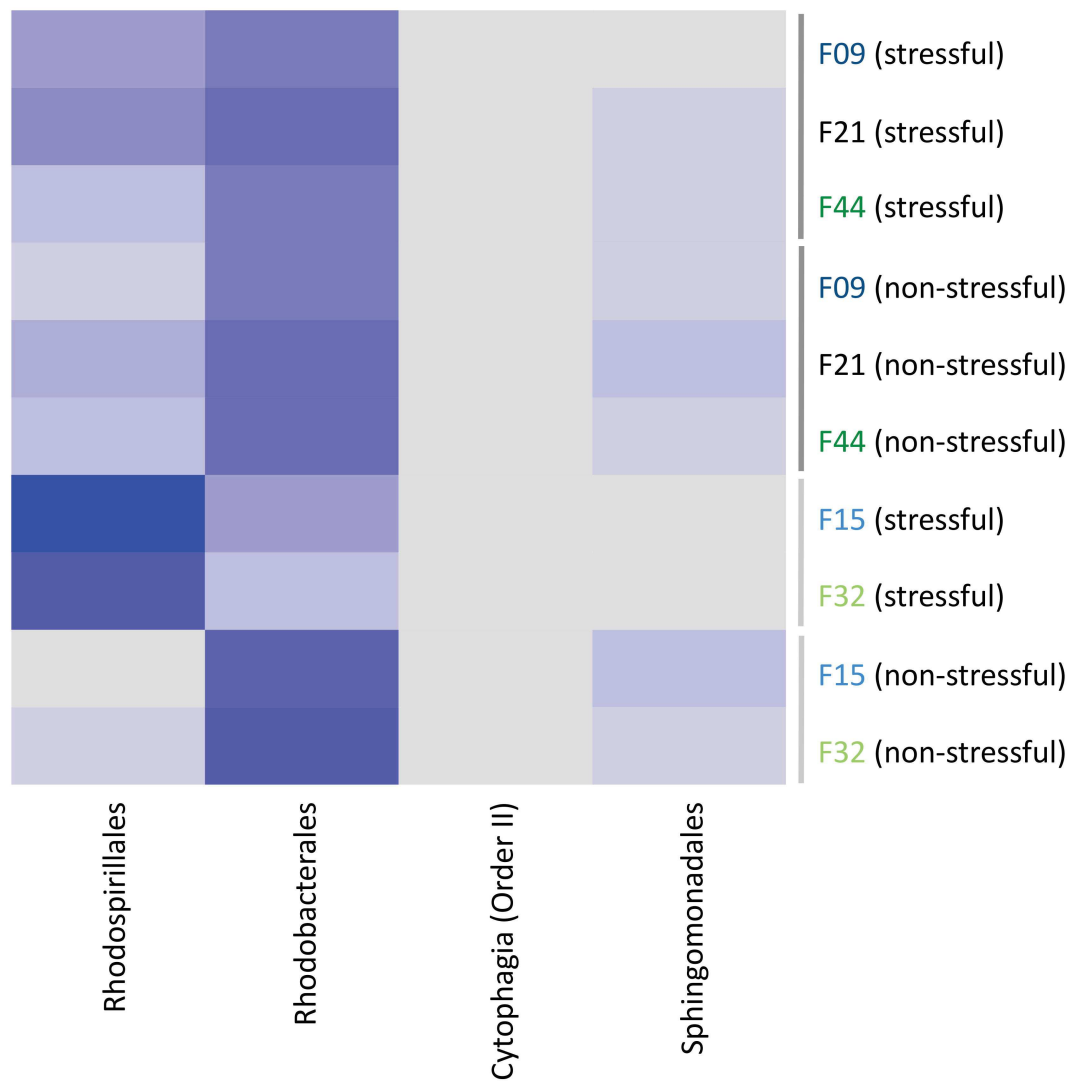
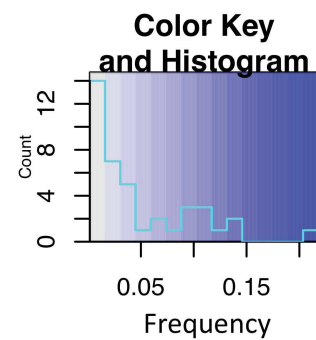




A



B



## Abstract

Infectious diseases are very often explored using reductionist approaches, despite repeated evidence showing them to be strongly influenced by numerous interacting host and environmental factors. Many diseases with complex etiology therefore remain misunderstood. In this thesis, by developing a holistic approach to tackle the complexity of the interaction, (i) we deciphered the complex intra-host interactions underlying the Pacific oyster mortality syndrome affecting juveniles of *Crassostrea gigas*, the main oyster species exploited worldwide and (ii) we validated this mechanism in different infectious environments and oyster genotypes. Using ecologically realistic experimental infections combined with thorough molecular (metabarcoding, transcriptomics, pathogen monitoring) and histological analyses on oyster families with contrasting susceptibilities, we demonstrated that the disease is caused by a multiple infection whose initial and necessary step is the infection of oyster haemocytes by a herpes virus. Viral replication leads to an immune-compromised state of the host, evolving toward subsequent bacteremia by opportunistic bacteria. By identifying critical intra-host interactions between microorganisms and host immunity, this study cracks the code of the Pacific oyster mortality syndrome and provides important molecular data for the design of prophylactic measures and breeding programs dedicated to the production of oysters resistant to the mortality syndrome. We believe that such a systems biology approach could be applied to decipher other multi-factorial diseases that affect non-model invertebrate species worldwide.

## Résumé

Les maladies infectieuses sont souvent étudiées à l'aide d'approches réductionnistes alors qu'elles sont fortement influencées par de nombreux facteurs hôtes et environnementaux en interaction. Ainsi, de nombreuses maladies d'étiologie complexe restent difficiles à caractériser. En développant une approche holistique pour aborder la complexité de l'interaction, (i) nous avons déchiffré les interactions complexes sous-jacentes au syndrome de mortalité des huîtres du Pacifique chez les juvéniles d'huîtres *Crassostrea gigas*, la principale espèce d'huître exploitée dans le monde et (ii) nous avons validé le mécanisme de pathogénèse quels que soient l'environnement infectieux et le génotype de l'huître. En utilisant une expérience d'infection écologiquement réaliste combinée à des analyses moléculaires (métabarcoding, transcriptomique, et suivi des agents pathogènes) et histologiques sur des familles d'huîtres aux susceptibilités contrastées à la maladie, nous avons démontré que la maladie est causée par une infection multiple avec comme première étape nécessaire l'infection des cellules immunocompétentes de l'huître (les hémocytes) par OsHV-1 $\mu$ var. La réplication du virus induit un état immunodéprimé de l'huître qui conduit à une septicémie par des bactéries pathogènes opportunistes entraînant la mort des huîtres. En identifiant les interactions intra-hôtes entre les microorganismes et l'immunité de l'hôte, cette étude déchiffre le code du syndrome de mortalité des huîtres du Pacifique et fournit d'importantes données pour la conception de mesures prophylactiques et de programmes de sélection d'huîtres résistantes au syndrome de mortalité. Nous pensons qu'une telle approche de la biologie des systèmes pourrait être appliquée pour déchiffrer d'autres maladies multifactorielles qui affectent des espèces d'invertébrés non modèles dans le monde entier.