



Mécanismes et spécificité du priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l'huitre creuse *Crassostrea gigas*

Maxime Lafont

► To cite this version:

Maxime Lafont. Mécanismes et spécificité du priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Immunologie. Université de Perpignan, 2017. Français. NNT : 2017PERP0041 . tel-02426215

HAL Id: tel-02426215

<https://theses.hal.science/tel-02426215>

Submitted on 2 Jan 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
ED 305 Energie et Environnement
Et de l'unité de recherche
UMR5244 Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements

Spécialité : Biologie

Présentée par **Maxime LAFONT**

**Mécanismes et spécificité du priming immunitaire
antiviral chez un Lophotrochozoaire, l'huître creuse
*Crassostrea gigas***

Soutenance prévue le **22/11/2017**

devant le jury composé de :

Mme Christine BRAQUART-VARNIER, PR, Université de Poitiers	Rapporteur
Mme Christine COUSTAU, DR, CNRS	Rapporteur
M. Guillaume MITTA, PR, UPVD	Examineur
M. Yannick LABREUCHE, CR, Ifremer	Examineur
Mme Caroline MONTAGNANI, CR, Ifremer	Directrice de Thèse
M. Benjamin GOURBAL, MC, UPVD	Co-directeur de Thèse

Ce travail est avant tout réalisé en collaboration, avec l'aide, et l'implication de nombreuses personnes qui ont rendu ce travail possible et m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier Mesdames Christine Braquart-Varnier et Christine Coustau de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse et la qualité des échanges scientifiques. Je voudrais aussi remercier Monsieur Yannick Labreuche, d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et de son aide lors de mes différents comités de thèse.

Je remercie l'Université de Perpignan Via Domitia ainsi que l'Ifremer de m'avoir accordé un financement pour cette thèse tant en terme de bourse doctorale que pour la bourse de financement internationale qui m'a été allouée. Je souhaite par ailleurs remercier la région Occitanie pour le financement attribué au projet Provigas dans lequel ma thèse s'est largement intégrée.

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur Guillaume Mitta pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire IHPE. Je tiens aussi à te remercier d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse et je tiens surtout à te remercier pour ton investissement quotidien et ta présence bienveillante auprès des membres du laboratoire. Je me rappellerai ma première venue au laboratoire, tu as été très présent, encourageant et m'a soutenu dès le début, avant même le concours. Pour tout ça, je souhaite t'exprimer toute ma reconnaissance et un énorme merci !

Je souhaite sincèrement remercier Yannick Gueguen et Delphine Destoumieux-Garzòn pour leur accueil au laboratoire IHPE et leur manière de faire vivre cette équipe. Votre investissement et votre présence tant sur le plan personnel que professionnel ont été pour moi des sources de motivations et de joies au cours de ma thèse. Même si les réunions m'ont longtemps rebuté, vous m'avez appris l'importance des échanges et des discussions en Science, la plus grande force de notre métier je pense. C'est avec une certaine émotion que je quitte ce laboratoire, vous avez beaucoup contribué à la réussite de cette thèse, alors sincèrement, merci !

Je souhaite remercier mes directeurs de thèse pour l'ensemble de ma thèse. Caroline, tu as cru en moi dès le début, tu m'as formé sur énormément de techniques et tu m'as transmis une grande partie de ton savoir faire et de ta méthodologie. Merci de m'avoir encouragé et d'avoir eu un investissement aussi énorme au cours de ma thèse. Tu m'as aussi permis de décrocher cette bourse internationale et fais de cette thèse ce résultat, dont je suis fier, alors un énorme et très sincère merci pour ton implication au cours de ma thèse et d'avoir guidé mes travaux. Benjamin, merci pour tes conseils, ta disponibilité et les discussions scientifiques durant ma thèse. Ton expérience sur le priming et ta gentillesse ont été pour moi des moteurs. Vous m'avez tous les deux donné des clés de réussites scientifiques, merci mes chefs ;)

Je souhaite remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer directement durant cette thèse, notamment David Raftos et Tim Green de l'université Macquarie,

pour leur accueil et leur bienveillance. Merci pour votre ouverture scientifique qui a été pour moi une source de motivation et d'envie de science incroyable. Je voudrais remercier l'ensemble des partenaires du projet Provigas qui ont participé au bon déroulement de ma thèse, notamment les partenaires du CRCM et du Cepralmar Adeline Perignon, Denis Regler, Anahita Marzin, Erika Gervasoni. Merci aux membres du projet ANR Decipher et particulièrement Bruno Petton, Julien de Lorgeril, Yannick Gueguen et Guillaume Mitta pour la qualité du matériel biologique grâce auquel j'ai pu réaliser de belles expérimentations durant ma thèse.

Je voudrais aussi remercier l'ensemble des membres du laboratoire IHPE qui ont accompagnés de près ou de loin ces travaux, particulièrement Agnès Vergnes, Philippe Haffner et Marc Leroy. Ces 3 ans au laboratoire m'ont aussi permis de rencontrer de belles personnes avec qui j'ai beaucoup partagé et j'en suis certain, nous garderons contact pour aller boire des verres de vin blanc, faire des parties de pêches, organiser des apéros ou aller au ranch à côté de Paul Va, alors Delphine, Guillaume, Jérémie, Marco, Yannick, Julien, je vous attends.

Comment ne pas aussi remercier les collègues étudiants avec qui j'ai partagé mon bureau et tant de bonne humeur en commençant par Samuel, (je sais tu n'es pas étudiant). Tu as été le grand homme de notre bureau, l'épaule, la force tranquille et même si la pêche n'aura pas ton fort, j'ai trouvé un ami ! Merci aussi à Céline, Aurore, Carmen, Maeva, Louise, Chloé, Léa-Lou, Lenny, Abi, Erwan, Vaihiti, Pierre-Louis avec qui j'ai partagé tant de bons moments donc la place manque ici pour tous vous remercier. Bien sur je n'oublie pas l'équipe thésards, Aude, Tristan, Daniel, et le type du fond, mon amis Etienne. Toi tu auras été ma belle rencontre de cette thèse. Tu es un mec en or un peu fumant mais avec qui je n'ai partagé que du bon, scientifiquement et tellement de bons moments en dehors du labo, alors, BENJAAAAAMMMMMM ??? Tu es un vrai scientifique, tu as compris le concept du « nuts » et son sens scientifique. Je te garde une belle place ici au chaud dans mon cœur.

Je voudrais aussi remercier mes amis qui m'ont supportés et à qui je souhaite vous dédier une partie de cette thèse, Julie Matthieu, Alexis, Marion, Titi, Lucie, Toinou, Vik, Thibault, Antoine, Pierre, Marina, Manue, Aude, Lauris et bien sur Célia vous m'avez tous apporté beaucoup, fais découvrir le Nord, le Sud, Le centre, L'est et l'Ouest, le tout condensé dans une potion magique à partager, vous êtes les ingrédients de ma chartreuse.

Enfin, je vous remercie et dédie cette thèse à ma famille, mon frère Julien, ma belle sœur Fanny et mes adorables bouts de choux, Lucas et Sofia ainsi qu'à mes parents Thierry et Muriel. Vous m'avez permis d'aller au bout d'un rêve, vous avez toujours tout fait pour me propulser vers l'avenir et ce depuis mon premier jour. Alors je vous dédie chaque mot et chaque ligne de ces travaux que je suis fier d'avoir réalisés et qui n'auraient jamais existé si vous n'étiez pas aussi merveilleux. Alors merci du fond du cœur.

« La perle précieuse provient d'une vulgaire huître »

Proverbe Chinois

Table des matières

Liste des figures et tableaux	1
Liste des sigles et abréviations	2
Introduction générale	3
Contexte scientifique	5
Rappels bibliographiques	7
I. Modèle biologique : l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> ou <i>Magallana gigas</i>	7
A. Classification	7
B. Anatomie et physiologie de l’huître	8
C. Cycle de vie et écologie	9
D. Caractéristiques génomiques de l’huître <i>C. gigas</i>	10
E. L’huître en aquaculture	11
II. Mortalités massives chez l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	13
A. Mortalités des adultes	13
B. Mortalités des larves et des juvéniles	13
1. Historique	13
2. Etiologie du syndrome de surmortalité massive des juvéniles	15
a) Facteurs génétiques	15
b) Facteurs abiotiques	16
(1) La température	16
(2) La salinité	16
c) Facteurs biotiques	17
(1) Les micro-algues	17
(2) Les bactéries	17
(3) L'OsHV-1	18
(a) Morphologie, structure et classification	19
(b) Génome de l'OsHV-1 et de ses variants	21
(c) Diagnostic d'une infection à l'OsHV-1	22
III. L’immunité de l’huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	24
A. Les tissus immunitaires	24
B. Reconnaissance par le système immunitaire	27
C. Signalisations et mécanismes de l’immunité antivirale	31
1. Un système de type interféron	31
2. L’ARN interférence	34
3. Voies de mort cellulaire programmée	35
a) L’apoptose	35
b) L’autophagie	36
4. Les effecteurs immunitaires	37
a) Les protéines plasmatiques	37
b) Les protéines et peptides antimicrobiens	37

IV. Une nouvelle vision de l'immunité innée	39
A. Le priming immunitaire	39
B. Le priming immunitaire chez les invertébrés	41
1. Le priming à l'échelle intra-individuelle	41
2. Le priming à l'échelle inter-individuelle	42
3. Mécanismes du priming immunitaire	43
 Chapitre 1 : Caractérisation du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse	
<i>Crassostrea gigas</i>	51
I. Introduction	51
II. Article 1 : "Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> "	52
III. Synthèse des résultats et conclusions	75
IV. Données complémentaires	77
A. Le priming immunitaire antibactérien	77
B. Le priming immunitaire trans-générationnel	80
 Chapitre 2 : Mécanismes du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse	
<i>Crassostrea gigas</i>	86
I. Introduction	86
II. Article 2: "Molecular mechanisms underlying antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> "	87
III. Synthèse des résultats, conclusions et perspectives à court terme	109
IV. Données complémentaires	113
 <u>Discussion générale et perspectives</u>	117
 <u>Conclusion générale</u>	130
 <u>Références bibliographiques</u>	132
 <u>Annexe : Bilan des valorisations, activités de recherche et d'enseignement</u>	155

Liste de Figures et tableaux

Figures

Fig. 1 : Anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> adulte	9
Fig. 2 : Cycle de reproduction de l'huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i>	10
Fig. 3 : Historique de la production d'huître <i>Ostrea edulis</i> (vert), <i>Crassostrea angulata</i> (bleu) et <i>Crassostrea gigas</i> (rouge) en France	12
Fig. 4 : Triade épidémiologique	15
Fig. 5 : Structure des virus de l'ordre des Herpesvirales	19
Fig. 6 : Classification des virus de l'ordre des Herpesvirales	20
Fig. 7 : Représentation schématique des fonctions immunitaires des hémocytes d'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	25
Fig. 8 : Les hémocytes de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	26
Fig. 9 : Principales voies de signalisations régulant le système Interféron chez les vertébrés	32
Fig. 10: Représentation de voies de signalisations antivirales conservées chez l'huître	33
Fig. 11 : Mécanismes de l'ARN interférence chez l'homme et la drosophile	35
Fig. 12: Schéma résumé des mécanismes moléculaires immunitaires de défense lors de priming immunitaire chez les plantes et chez un monocyte de mammifère	45
Fig. 13: Modèle de réponse immunitaire innée chez les invertébrés	46
Fig. 14 : Mécanismes potentiellement impliqués dans le phénomène de priming immunitaire chez les arthropodes	49
Fig. 15 : Effet du priming bactérien sur la survie des huîtres lors d'infections bactériennes	78
Fig. 16 : Etude de la durée de la stimulation de géniteurs avant la reproduction pour le priming trans-générationnel	82
Fig. 17 : Etude de l'origine maternelle ou paternelle du priming trans-générationnel	84
Fig. 18 : Proportion relative de 3 populations hémocytaires d'huîtres lors de stimulation bactériennes ou avec du poly(I :C)	114

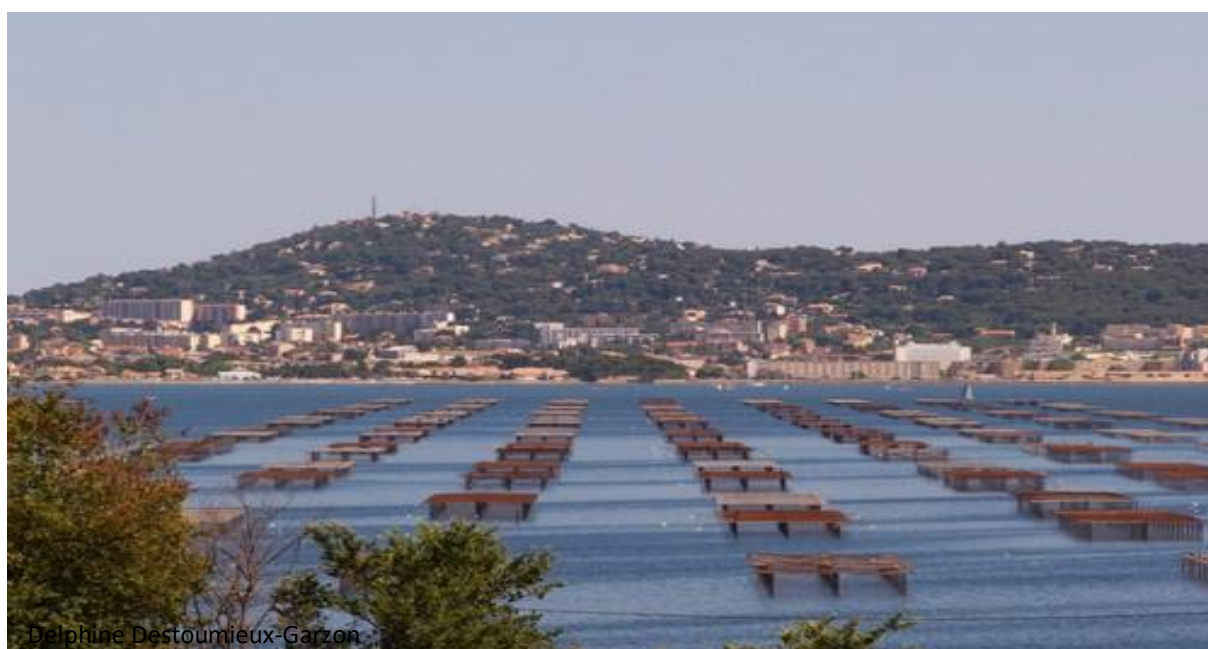
Tableau

Table 1 : Classification de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	7
--	---

Liste des sigles et abréviations

ADN/ ARN	Acide désoxyribonucléique/ ribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AVNV	Acute Viral Necrosis Virus
CNC	Comité National de le Conchyliculture
DP	DNA polymerase
dsRNA	double stranded RNA
EcSOD	Extracellular superoxide dismutase
FAO	Food and agriculture organization
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FSW	Filtered seawater
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interféron
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated gene
LGP32	<i>Vibrio tasmaniensis</i> LGP32
LPS	Lipopolysaccharide
miRNA	micro ARN
NSI	Naissain Standardisé de l'Ifremer
ORF	Open Reading Frame
OsHV-1	Ostreid HerpesVirus 1
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pathogen-associated pattern Recognition Receptor
Poly(I:C)	Acide polyinosinique-polycytidylique
RIG	Retinoïc acid-inducible gene
RLR	RIG-1-like Receptor
RNA-seq	Séquençage des ARN
RNAi	RNA interference
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
TLR	Toll-like receptor
WSSV	White Spot Syndrome Virus

Introduction générale



Introduction générale

Ce projet de thèse porte sur un modèle biologique d'importance économique, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Depuis 2008, les élevages de *C. gigas* sont victimes de phénomènes de surmortalité massive sans précédents affectant les juvéniles. Ce syndrome de surmortalité massive touche aujourd'hui l'ensemble des bassins ostréicoles français, de la mer Méditerranée à la Manche, conduisant à des taux de mortalité de 80 à 100% chez les juvéniles (Segarra et al. 2010). Au niveau international, cette crise touche désormais la plupart des pays producteurs (Burge et al. 2006, Lynch et al. 2012, Roque et al. 2012, Jenkins et al. 2013, Keeling et al. 2014). Ce syndrome de surmortalité massive a une étiologie complexe et d'origine multifactorielle impliquant différents facteurs abiotiques et biotiques. C'est une maladie poly-microbienne impliquant différentes bactéries du genre *Vibrio*, plus particulièrement *Vibrio tasmaniensis* et *Vibrio crassostreae* pathogènes du naissain (Gay et al. 2004, Lemire et al. 2015). Hormis les bactéries, l'apparition des surmortalités coïncide avec l'augmentation de la prévalence d'un nouveau variant d'un virus de type herpès, l'Ostreeid herpesvirus 1 (OsHV-1) identifié en 2008 (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Afin de comprendre les causes de ces mortalités dramatiques dans les populations d'huîtres françaises un intérêt tout particulier a été porté à une meilleure compréhension des interactions immunobiologiques entre les huîtres et les pathogènes potentiels, identifiés comme responsables de ces mortalités. Ainsi une meilleure caractérisation et description du fonctionnement du système immunitaire des huîtres ont été entrepris.

Comme pour tous les invertébrés, les mécanismes de défense des huîtres reposent sur un système immunitaire de type inné. Les connaissances sur leur immunité sont encore aujourd'hui fragmentaires (Wang et al. 2017). Cependant, différentes études ont permis de mieux caractériser les mécanismes de défense et la réponse antimicrobienne de l'huître creuse (Bachere et al. 2004, Schmitt et al. 2011, Bachere et al. 2015) mettant en jeu des voies de signalisation conservées (Green et al. 2015a), ainsi qu'un large panel d'effecteurs antimicrobiens (Destoumieux et al. 1997, Montagnani et al. 2001, Gonzalez et al. 2006, Gonzalez et al. 2007, Fleury et al. 2009, Gueguen et al. 2009, Rosa et al. 2011, Rosa et al. 2012, Schmitt et al. 2012). Par ailleurs, les données génomiques et transcriptomiques récentes ont considérablement consolidé nos connaissances sur les bases moléculaires de l'immunité des huîtres (Gueguen et al. 2003, Fleury et al. 2009, Roberts et al. 2009, Taris et al. 2009, de Lorgeril et al. 2011, Wang et al. 2017). Depuis fin 2012, le génome de *C. gigas* a été entièrement séquencé (Zhang et al. 2012) et a déjà permis de mettre en évidence que l'huître possède en théorie le répertoire moléculaire nécessaire pour mettre en place une réponse antivirale (*i.e.* conservation des principales voies de la réponse antivirale connues chez les vertébrés et invertébrés). Ces travaux tendent à montrer que des mécanismes antiviraux sont conservés chez

l'huître : la voie des interférons ou encore l'autophagie et l'apoptose (Green and Montagnani 2013, Jouaux et al. 2013, Segarra et al. 2014c, Green et al. 2015a, He et al. 2015).

Etant dotés d'une immunité innée et dépourvus de cellules de type lymphocytaire et d'immunoglobuline comme les vertébrés, les invertébrés ont longtemps été considérés comme incapables de développer des mécanismes immunitaires adaptatifs. Le système immunitaire des invertébrés était considéré encore il y a peu comme un système simple. Cependant, ces dernières années, une nouvelle vision de l'immunité innée et de la complexité du dialogue hôte-microorganismes a pu émerger de travaux portant sur les invertébrés (Schmid-Hempel 2005, McFall-Ngai et al. 2013). Des mécanismes de reconnaissances spécifiques ont été mis en évidence et la question de l'existence d'une forme de mémoire immunitaire a été posée (Little and Kraaijeveld 2004, Kurtz 2005, Hauton and Smith 2007, Schulenburg et al. 2007). Ces mécanismes ont été associés au terme de « priming immunitaire », « d'immunité entraînée » ou encore de « mémoire immunitaire innée » (Kurtz and Franz 2003, Netea 2013). Le priming immunitaire peut se traduire par le fait qu'une expérience passée avec un agent pathogène procure à un macro-organisme ou à sa descendance des capacités immunitaires accrues face à une nouvelle rencontre avec le même pathogène. Bien que les exemples s'accumulent sur son existence chez les invertébrés et par la même, des indices de l'existence d'une forme de réponse adaptative, ce phénomène est au cœur des débats au sein de la communauté des immunologistes (Kurtz and Franz 2003, Kurtz 2004, Little and Kraaijeveld 2004, Kurtz 2005, Sadd et al. 2005, Sadd and Schmid-Hempel 2006, Hauton and Smith 2007, Pham et al. 2007, Little et al. 2008, Roth et al. 2009, Sadd and Schmid-Hempel 2009, Hernandez-Martinez et al. 2010, Rodrigues et al. 2010, Roth et al. 2010, Portela et al. 2013). Le priming a également été associé à l'observation de différentes formes de protection immunitaire montrant des taux de survies accrues chez des animaux stimulés en comparaison avec des animaux non stimulés (voir (Milutinović and Kurtz 2016) pour revue). Des travaux réalisés au laboratoire ont mis en évidence que l'injection d'un stimulus non spécifique, l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly(I:C)), un analogue synthétique d'ARNs doubles brins, caractéristiques de nombreux virus, permettait d'induire la réponse antivirale de l'huître (Green and Montagnani 2013). Les travaux menés au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence que la charge virale du naissain infecté par le virus, préalablement stimulé par le poly(I:C) était fortement réduite voire inexistante contrairement aux contrôles non stimulés (Green and Montagnani 2013). Ce résultat montre pour la première fois, qu'il est possible d'induire un état antiviral chez l'huître, capable de la protéger contre le virus OsHV-1. Ces éléments semblent donc faire appel au phénomène de priming immunitaire chez *C. gigas*. C'est exactement l'existence de ce priming immunitaire que nous avons cherché à confirmer et caractériser chez *C. gigas* dans le cadre de ces travaux de thèse.

Contexte scientifique

C'est dans ce contexte qu'un nouvel axe de recherche sur le priming immunitaire antiviral a été développé au sein de l'UMR 5244 IHPE (Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnements). Les membres de l'équipe MIMM dans laquelle ont été réalisés ces travaux de thèse, sont spécialisés depuis plus de 20 ans dans l'étude de la réponse antibactérienne immunitaire des huîtres. Leurs travaux ont permis de mettre en évidence l'existence chez l'huître de mécanismes efficaces pour éliminer les agents infectieux reposant sur une réponse du type innée mettant en jeu des voies conservées de signalisation (Escoubas et al. 1999, Bachere et al. 2004, Montagnani et al. 2004, Montagnani et al. 2008), ainsi qu'un large panel d'effecteurs antimicrobiens (Schmitt et al. 2010, Bachere et al. 2015). En parallèle, des mécanismes d'échappement par les bactéries ont été caractérisés soulignant la complexité du dialogue hôte-microorganismes (Duperthuy et al. 2011). Par ailleurs, des travaux ont abouti à la caractérisation, au niveau transcriptomique, de la réponse de l'huître aux bactéries pathogènes *V. splendidus* et *V. aestuarianus* (de Lorgeril et al. 2011). D'autres travaux ont récemment émergés visant à comprendre les mécanismes d'interaction de deux populations bactériennes pathogènes *V. tasmaniensis* et *V. crassostreae* chez l'huître (Thèse de Doctorat de Tristan Rubio, 2014-2017). Enfin, le projet ANR DECIPHER vise de manière intégrative à déchiffrer l'ensemble des facteurs impliqués dans ces phénomènes de surmortalité massive affectant les juvéniles de *C. gigas* depuis 2008. De plus, compte-tenu de la prévalence du virus OsHV-1 lors de ces phénomènes, un nouvel axe de recherche mis en place visait à répondre à la question désormais essentielle des bases moléculaires de la réponse antivirale encore méconnues chez les mollusques (Green and Montagnani 2013, Green et al. 2014a, Green et al. 2015a, Green et al. 2016b). Notre équipe a alors entrepris d'étudier les possibilités de protection antivirale chez l'huître. Une première approche expérimentale, visait à tester l'induction d'une réponse antivirale par le poly(I:C), couramment utilisé pour étudier la réponse antivirale chez les vertébrés (Fortier et al. 2004). Chez l'huître *Saccostrea glomerata* son injection a déjà été testée et résulte en l'induction de gènes de l'immunité (Green and Barnes 2009). Chez le poisson, il induit un état antiviral protecteur, jusqu'à 10 mois après l'immunisation (Plant et al. 2005). Les résultats obtenus au sein de l'équipe suggèrent pour la première fois l'existence d'un phénomène de priming immunitaire antiviral chez l'huître et la possibilité d'induire une réponse antivirale permettant de protéger les huîtres d'un virus pathogène. Ces résultats ont permis de développer le projet PROVIGAS (Protection antivirale chez l'huître *Crassostrea gigas*) coordonné par Caroline Montagnani et financé par la région Occitanie et l'Ifremer. Ce projet proposait, (i) d'approfondir nos connaissances sur les caractéristiques de cet effet protecteur (maintien, spécificité) pour en tester les effets durant des épisodes de surmortalité

massive en milieu naturel, (ii) d'explorer les bases moléculaires et cellulaires de ce phénomène, (iii) de caractériser les bases encore méconnues de la réponse antivirale. L'objectif final sera d'explorer les potentialités d'applications biotechnologiques alternatives aux programmes actuels de sélection de masse pour soutenir les filières aquacoles. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans cet objectif et ont entrepris d'étudier les possibilités de protection antivirale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. De plus, des travaux réalisés dans l'équipe EcoEvl, deuxième équipe du laboratoire IHPE, s'intéressent notamment à la réponse immunitaire innée et mémoire chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata* vis-à-vis du ver parasite *Schistosoma mansoni* (Portela et al. 2013, Pinaud et al. 2016)(Thèse de Doctorat de Silvain Pinaud, 2014-2017). Ces deux thèses menées au sein du même laboratoire sur deux modèles différents de Lophotrochozoaires se sont apportées beaucoup réciproquement quant à la compréhension de ces processus immunitaires mémoriels chez les mollusques. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse vise principalement à identifier le priming immunitaire par une approche phénoménologique et décrire les mécanismes du priming immunitaire antiviral par une approche moléculaire globale, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Le manuscrit de cette thèse est d'abord composé d'une revue bibliographique de l'état de l'art sur (I) le modèle : l'huître creuse *Crassostrea gigas*, (II) les mortalités massives affectant *C. gigas* (III) l'immunité chez *C. gigas* et particulièrement l'immunité antivirale et enfin (IV) le priming immunitaire.

Le premier chapitre est consacré aux résultats portant sur la caractérisation du priming immunitaire antiviral chez *C. gigas*, par une approche descriptive phénoménologique lors d'infection avec le virus OsHV-1 en milieu contrôlé et en milieu naturel.

Le deuxième chapitre concerne les résultats de l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents au phénomène de priming immunitaire antiviral par une approche transcriptomique globale.

La dernière section concerne une discussion générale de ces travaux ainsi que des perspectives de recherche sur le phénomène de mémoire immunitaire antivirale chez l'huître creuse ainsi que le rôle de l'OsHV-1 dans cette maladie poly-microbienne mais aussi des perspectives pour la profession ostréicole en terme d'application pour le contrôle et la lutte contre les agents pathogènes impliqués dans ce phénomène de surmortalité massive d'huîtres enregistrées depuis 2008.

Rappels bibliographiques



Rappels bibliographiques

I. Modèle biologique : l'huître creuse *Crassostrea gigas* ou *Magallana gigas*

A. Classification

L'huître creuse ou huître du Pacifique ou huître Japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est un Lophotrochozoaire appartenant à l'embranchement des mollusques bivalves de la famille des Ostreidae (**Table 1**). Le genre *Crassostrea* comprend une 20^{aine} d'espèces dont notamment l'huître portugaise, *Crassostrea angulata* ou l'huître américaine *Crassostrea virginica*. En 2016, Salvi et Mariottini ont proposé une nouvelle classification du genre des *Crassostrea*. L'analyse phylogénétique de la région ITS2 des *Crassostreinae* a permis de les séparer en 2 genres distincts: *Crassostrea* et *Magallana* (Salvi and Mariottini 2016). L'huître creuse *Crassostrea gigas* a dans cette étude été re-classifiée comme appartenant uniquement au genre *Magallana* et pourrait donc aussi être appelée *Magallana gigas*.

Table 1 : Classification de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

	Classification	Re-classification (Salvi et Mariottini 2016)
Règne :	Animal	
Clade :	Lophotrochozoa	
Embranchement :	Mollusques	
Classe :	Bivalve	
Sous-classe :	Pteriomorphia	
Ordre :	Ostreida	
Super-famille :	Ostreoidae	
Famille :	Ostreidae	
Sous-famille :	Crassostreinae	
Genre:	<i>Crassostrea</i>	<i>Magallana</i>
Espèce :	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Magallana gigas</i>

B. Anatomie et physiologie de l'huître

L'huître creuse *C. gigas* est composée d'un corps mou, contenu dans une coquille constituée de 2 valves asymétriques, l'une plate (supérieure) et l'autre creuse (inférieure) (**Figure 1**). Ces valves sont reliées entre elles par un ligament au niveau de la charnière et par un muscle adducteur permettant une fermeture hermétique (Galtsoff 1964). Les valves sont composées de feuillets de carbonate de calcium produit par le bord du manteau, un organe recouvrant la chair de l'huître. Le bord de manteau participe notamment à la production de la coquille mais joue aussi un rôle de senseur des changements environnementaux. Cette fonction permet notamment de réguler le flux d'eau dans l'huître ou d'assurer la fermeture des deux valves lors de périodes émergées. L'huître possède des palpes labiaux assurant un tri et un acheminement des particules en suspension jusqu'à la bouche, qui vont ensuite être acheminées à l'estomac, l'intestin (entouré par la glande digestive) puis excrétées sous forme de fèces au niveau de l'anus. La gonade est, chez l'huître, un organe non permanent recouvrant la glande digestive. Le rôle de tri des particules est assuré par les branchies dont les cils entraînent un flux d'eau acheminant les particules à la bouche. L'huître possède une paire de branchies lamellaires jouant un rôle très important dans la respiration et l'assimilation de l'oxygène. Dépourvues d'hémoglobine et d'hémocyanine, l'oxygène serait directement dissous dans l'hémolymph, le sang de l'huître. La circulation de l'hémolymph est assurée par le cœur composé d'un ventricule et de deux oreillettes. L'hémolymph circule dans l'huître au niveau des artères, veines et sinus comme au niveau du muscle adducteur de la coquille et va aussi s'infiltrer dans l'ensemble des tissus de l'huître, qualifiant le système circulatoire des huîtres de semi-ouvert (Cheng 1981). L'hémolymph est constituée de plasma dans lequel circulent des cellules immunocompétentes, les hémocytes. L'organe hématopoïétique n'est pas encore clairement identifié, malgré des travaux ayant montré un rôle potentiel assuré par les branchies (Jemaa et al. 2014, Li et al. 2017a).

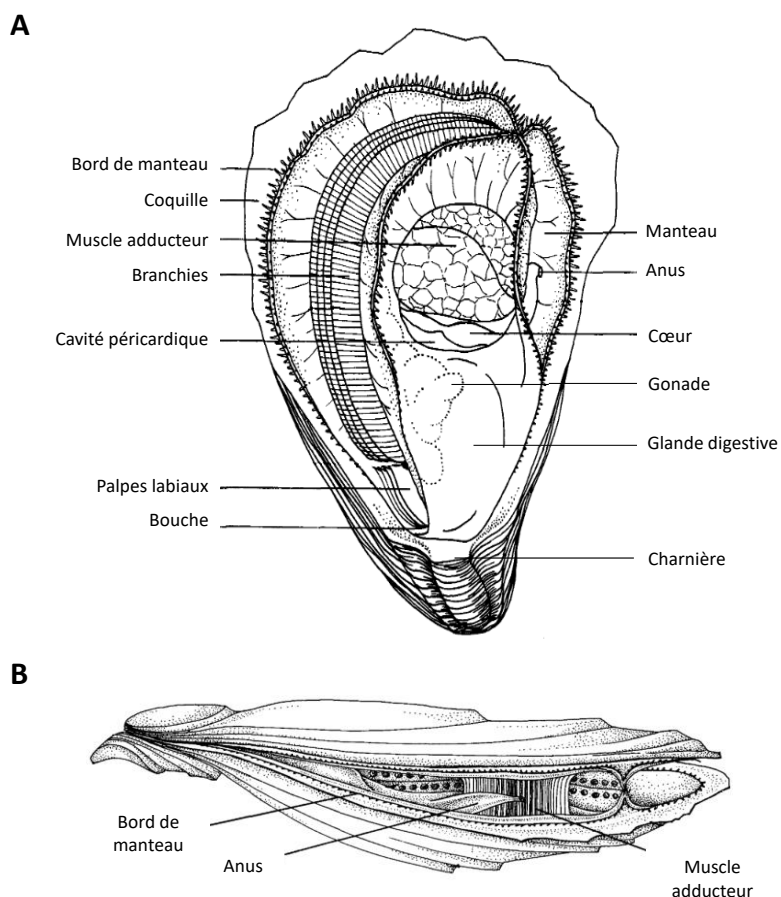


Figure 1 Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* adulte. A. Schéma de la vue intérieure de la valve inférieure concave. B. Schéma d'une vue latérale d'une huître ouverte. Modifié d'après Galtsoff, 1964.

C. Cycle de vie et écologie

L'huître creuse *C. gigas* est un organisme hermaphrodite successif alternatif à tendance protandre (majoritairement mâle dans les premières années). En tant qu'organisme poïkilotherme (qui ne régule pas sa température), la maturation et l'émission de gamètes se font généralement en été, lorsque les conditions sont favorables, notamment sous l'effet de la température (Fabioux et al. 2005). La fécondation est externe et la rencontre entre les gamètes s'effectue dans la colonne d'eau. Vingt-quatre heures après la fécondation, une larve D est formée (**Figure 2**) ; entre le 2^{ème} et le 20^{ème} jour, la larve dite « véligère » est nageuse dans la colonne d'eau et vers le 21^{ème} jour, la larve appelée « pédivéligère » va subir une métamorphose notamment l'apparition d'un pied, elle va chercher un support et se fixer définitivement (**Figure 2**). A partir de ce stade et jusqu'à leur première reproduction, ces jeunes huîtres sont appelées naissain ou juvéniles, elles sont ensuite considérées comme adultes. Durant leur développement, du stade naissain jusqu'à la fin de leur vie, les huîtres ne vont plus subir de métamorphoses et vont uniquement croître. Les huîtres sont des organismes

sessiles (fixés à leur support) benthiques et on retrouve les stades fixés dans la zone de balancement des marées (intertidale) et dans la zone infralittorale immergée en permanence. On retrouve les huîtres dans différentes régions du globe et en tant qu'organisme euryhalin et eurytherme, cette espèce peut être présente dans différents écosystèmes allant des zones de pleine mer aux zones estuariennes, mais aussi en eau saumâtre. Ce sont des organismes invasifs (Rohfritsch et al. 2013) filtreurs suspensivores en aval du réseau trophique de leur écosystème et ont la capacité de filtrer jusqu'à 5 litres d'eau par heure pour les adultes, jouant un rôle majeur dans la dépuración du milieu (Galtsoff 1964).

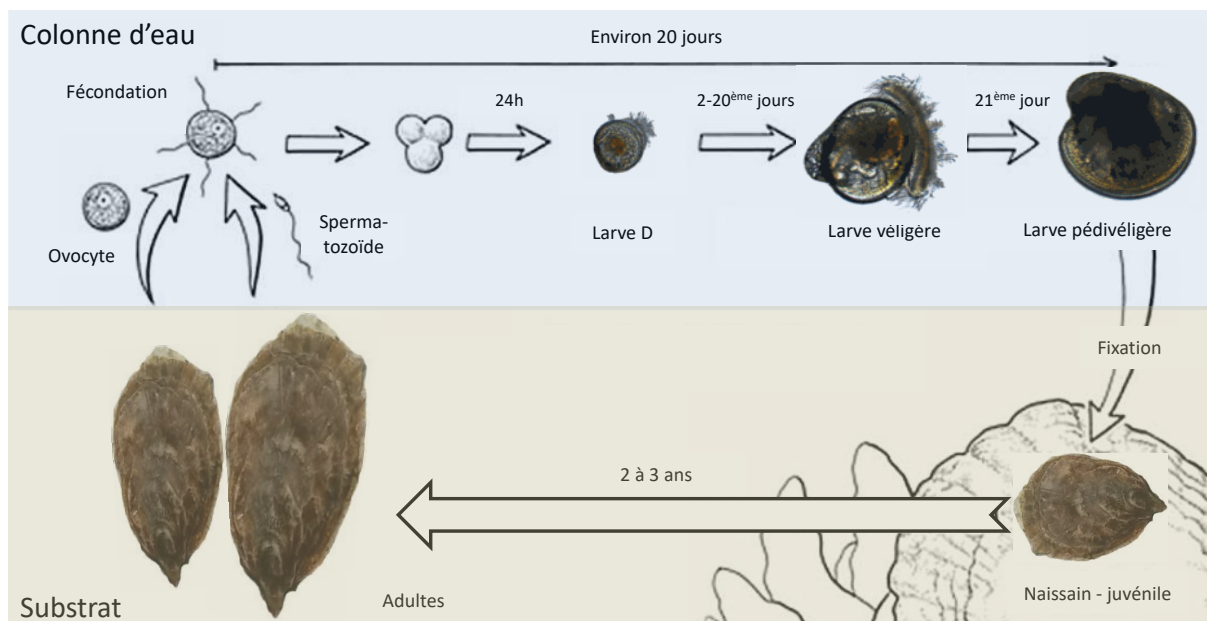


Figure 2 : Cycle de reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*

D. Caractéristiques génomiques de l'huître *C. gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* possède 20 chromosomes (10 paires, $2n=20$) (Bouilly et al. 2008). En 2012, le génome de *C. gigas* a été séquencé (GenBank : AFTI000000000) (Zhang et al. 2012). Le séquençage a été réalisé par la technique WGS (Whole-genome shotgun) sur une huître femelle adulte issue de quatre lignées consanguines « frère-sœur » et une huître « sauvage ». Ce génome a permis de prédire 28 027 gènes pour environ 492Mb. Parmi ces gènes, 96.1% ont une activité transcriptionnelle démontrée par des analyses de séquençages des ARN (RNA-seq) réalisés sur différents organes d'huîtres au cours de différents stades de développement (Zhang et al. 2012). Le génome de l'huître est extrêmement polymorphe avec des séquences répétées représentant 36.1% du génome. L'annotation des différents gènes du génome a été réalisée (1) par prédiction *de novo*, (2) par comparaison de séquences protéiques des gènes prédits par rapport à 6 génomes de

référence (*Capitella teleta*, *L. gigantea*, *Helobdella robusta*, *Anopheles gambiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster*) et (3) par homologie de séquences des transcrits identifiés en RNA-seq, notamment par ontologie génique. Le séquençage du génome a permis le développement d'une multitude d'études s'intéressant aux réponses transcriptomiques globales par RNA-seq chez des huîtres lors de différents stress. Différents transcriptomes d'huîtres ont donc été réalisés durant différents stades de développement (Zhang et al. 2012), en réponse à des stress abiotiques comme un stress osmotique (Zhao et al. 2014), thermique (Lim et al. 2016) ou chimique (Bachere et al. 2017) mais aussi en réponse à des stress biotiques comme des algues toxiques (Payton et al. 2017), des bactéries (Thèse de Doctorat de Tristan Rubio, 2014-2017) et du virus OsHV-1 (Segarra et al. 2014c, He et al. 2015, Rosani et al. 2015).

E. L'huître en aquaculture

La répartition de *C. gigas* est mondiale et s'étend sur tous les continents excepté l'Antarctique, du Sud de l'Alaska jusqu'en Australie. Cette espèce représente un fort intérêt commercial et provient principalement de l'élevage. La production mondiale d'huître creuse était estimée à 613 058 tonnes en 2015 (FAO, 2016). La France, principal producteur européen avec environ 72 000 tonnes annuelles, est le 4^{ème} pays producteur derrière la Chine, le Japon et la Corée. L'ostréiculture représente en France le principal élevage en conchyliculture et en aquaculture en termes de tonnage. Ce secteur agro-alimentaire génère plus de 17 000 emplois directs en France, impliquant des enjeux socio-économiques très importants (CNC, 2016).

Les élevages ostréicoles en France ont été touchés par différentes crises qui ont entraîné au cours de l'Histoire des changements d'espèces dans les parcs ostréicoles (**Figure 3**). Les élevages d'huîtres plates *Ostrea edulis*, considérée comme l'espèce autochtone en France, ont été touchés dans les années 1920 par des mortalités massives pouvant aller jusqu'à 90% des élevages (Barbosa Solomieu et al. 2015, Pernet et al. 2016) (**Figure 3**). Ce sont ces mortalités qui ont poussé les ostréiculteurs à introduire une nouvelle espèce : l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*. Cette espèce a elle aussi été victime d'une épizootie associée à un Iridovirus à la fin des années 1960 (Comps et al. 1976). Une deuxième épizootie a affecté les élevages d'*O. edulis* déjà faibles, dont les agents pathogènes associés sont les parasites *Marteilia refringens* et *Bonamia oestreae* (Comps et al. 1980) (**Figure 3**). Ces deux épizooties successives ont entraîné l'introduction de l'huître creuse *C. gigas* à la fin des années 1960, début des années 1970. Depuis cette introduction, il s'agit de l'espèce principalement élevée représentant 99% des élevages français, le dernier pour cent correspondant à l'huître plate *O. edulis*. Cependant, depuis 2008, les cheptels d'huîtres sont affectés par des épisodes de surmortalité massive affectant le naissain (Segarra et al. 2010).

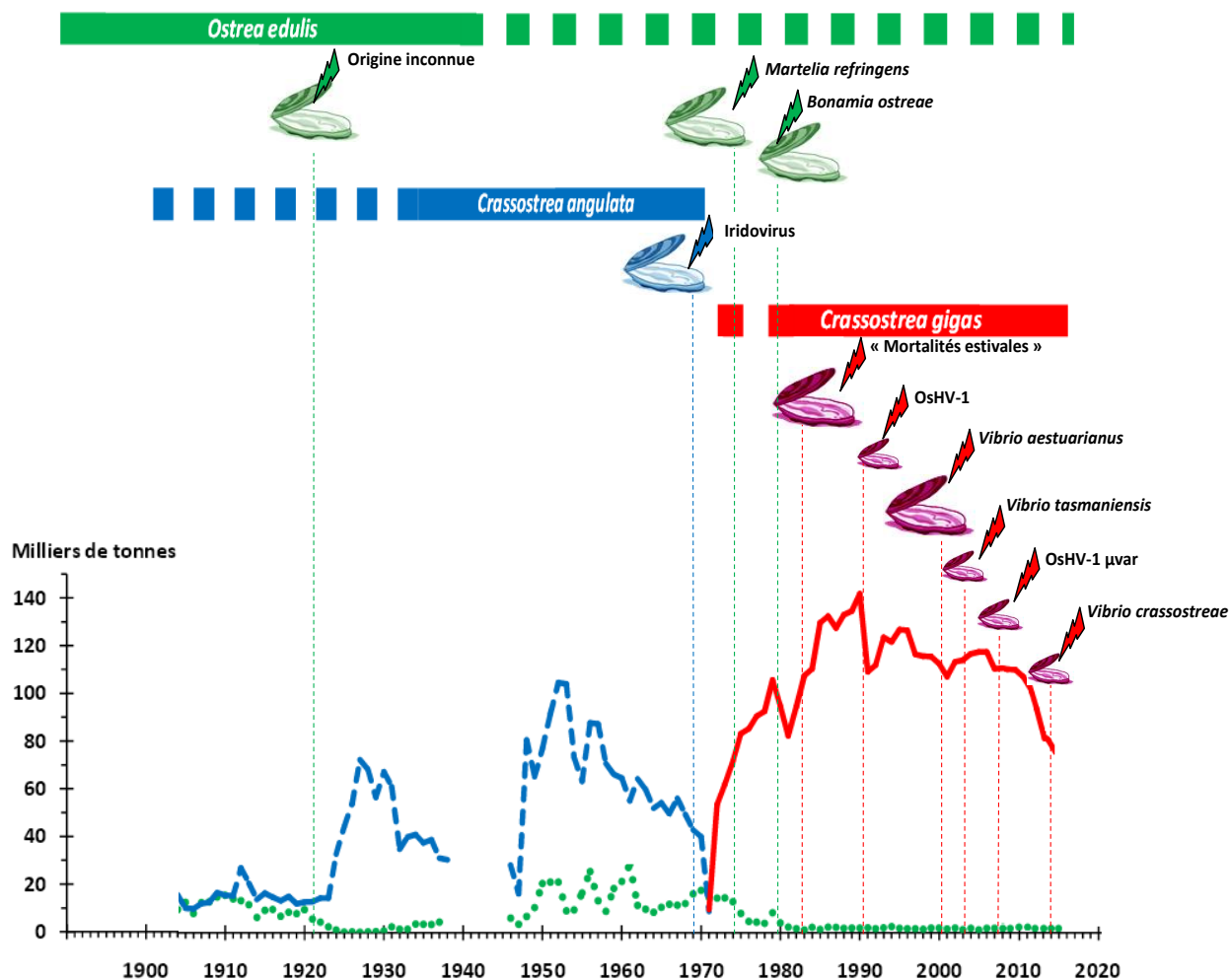


Figure 3 : Historique de la production d’huître *Ostrea edulis* (vert), *Crassostrea angulata* (bleu) et *Crassostrea gigas* (rouge) en France. Les principaux agents pathogènes associés aux mortalités chez les huîtres adultes (grosses huîtres) ou aux juvéniles et naissains (petites huîtres) sont représentés en fonction de l’année de leur identification (d’après Bernard. 2011).

II. Mortalités massives chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

L'huître creuse *Crassostrea gigas* a subi et subit aujourd'hui encore des mortalités massives, à l'origine de la diminution de la production en France. Ces mortalités touchent les différents stades de développement: les stades larvaires, le naissain et les juvéniles, ainsi que les adultes.

A. Mortalités des adultes

Depuis les années 1950, des épisodes de mortalité ont été décrits dans différents pays incluant le Japon, les Etats-Unis et la France (Mori. 1979, Perdue et al. 1981). Depuis les années 1980, de nombreuses études ont rapporté des mortalités importantes en France, dans toutes les zones d'élevage allant du bassin d'Arcachon (Maurer et al. 1986) jusqu'en Normandie (Costil et al. 2005). Ces mortalités étaient nommées « mortalités estivales » du fait de l'apparition systématique de ces épisodes pendant les mois chauds de l'année. Ces épisodes ont participé en 1993 à la création d'un REseau MOllusques des Rendements Aquacoles (REMORA) afin de suivre entre autre l'évolution de ces mortalités (Goyard. 1996, Fleury et al. 1999). Ces différents travaux ont mis en évidence que ces mortalités observées sont en lien avec la température et une nourriture abondante, induisant une sur-maturation des gonades, pouvant entraîner un stress physiologique à l'origine de ces mortalités. D'autres projets scientifiques ont participé à la compréhension de ces phénomènes, c'est le cas du projet MOREST (MORTalités ESTivales) (Samain et McCombie, 2008) qui a lui aussi associé ces mortalités à un « trade-off » entre l'investissement physiologique à la reproduction et les capacités de survie. Ils font aussi rapport de trois autres facteurs que sont la prédisposition génétique, l'environnement (notamment la température de l'eau, la salinité ou des agents polluants) et la présence d'agents pathogènes associés comme la bactérie *Vibrio aestuarianus* (Labreuche et al. 2006, Garnier et al. 2008, Travers et al. 2015) (**Figure 3**). En ce qui concerne le virus OsHV-1, même s'il est possible de le détecter dans des huîtres adultes asymptomatiques (Arzul et al. 2002, Barbosa-Solomieu et al. 2004), les huîtres adultes restent peu sensibles aux infections virales à l'OsHV-1 (Segarra et al. 2014a, Green et al. 2016b).

B. Mortalités des larves et des juvéniles

1. Historique

En 1979, des mortalités très importantes pouvant atteindre 100% ont été observées chez des larves de *C. gigas* dans des écloséries aux États-Unis. Les larves présentent « des difficultés de nage

et un manteau et bord de manteau érodés puis la mort » (Leibovitz et al. 1978). Ces travaux ont permis d'identifier un virus classé dans la famille des *Iridoviridae* associé aux mortalités. En 1991 en France et en Nouvelle-Zélande, d'autres épisodes de mortalité sont observés en éclosion et sont associés à la présence d'un virus s'apparentant aux virus de type herpès (Hine et al. 1992, Nicolas et al. 1992). En 1994 Renault et ses collaborateurs identifient par microscopie électronique à transmission la présence de particules virales de type herpès (Renault et al. 1994). D'autres agents pathogènes ont été associés à des épisodes de mortalité larvaire, notamment des bactéries du genre *Vibrio*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio coralliilyticus*, *Vibrio tubiashii*, et *Vibrio splendidus* biovar II (Jeffries 1982, Hada et al. 1984, Sugumar et al. 1998, Genard et al. 2013).

Chez les juvéniles, des mortalités ont été rapportées dès 1993 et associées à une forte température de l'eau et la présence d'un virus (Renault et al. 1994). Par homologie de morphologie, ce virus a été identifié comme étant un herpès virus, l'Ostreid Herpes Virus 1 (OsHV-1) (Renault et al. 1994, Le Deuff and Renault 1999, Davison et al. 2005). La présence de ce virus a été associée à des phénomènes de mortalité en France et en Californie entre les années 1993 et les années 2000 (Renault et al. 2000, Renault and Novoa 2004, Friedman et al. 2005, Burge et al. 2006).

A partir de 2008, des surmortalités massives, sans précédent chez des juvéniles de *Crassostrea gigas* ont été décrites sur des parcs ostréicoles, entraînant des pertes entre 60% et 100% dans certaines zones d'élevages (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Il s'agit d'une maladie polymicrobienne et l'apparition de ces mortalités correspond à la détection d'un nouveau variant de l'OsHV-1 (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Ces mortalités appelées « syndrome de surmortalité massive des juvéniles » ou POMS (« Pacific oyster mortality syndrome » en Australie), touchent jusqu'à aujourd'hui la plupart des pays producteurs au niveau mondial s'étendant à toutes les côtes de la France (Martenot et al. 2011, Renault et al. 2012), en Chine (Bai et al. 2015), au Japon (Shimahara et al. 2012), en Espagne (Roque et al. 2012), en Irlande (Prado-Alvarez et al. 2016), en Australie (Jenkins et al. 2013), en Nouvelle-Zélande (Keeling et al. 2014).

L'ensemble des épisodes de mortalités décrits précédemment sont d'origines multifactorielles avec une étiologie complexe impliquant le concept de « la triade épidémiologique » illustrée par Snieszko en 1974 (Snieszko 1974) (**Figure 4**). Cette triade illustre le fait qu'une maladie infectieuse apparaît quand un hôte sensible est exposé à un ou plusieurs agents pathogènes virulents dans des conditions environnementales particulières. Différents facteurs de risques ont été identifiés dans la maladie du syndrome de surmortalité massive des juvéniles, notamment à l'échelle de l'hôte par les techniques d'élevages, mais aussi des facteurs génétiques et physiologiques qui influencent la sensibilité ; ainsi que des transferts entre sites ou encore la densité d'élevages qui favorisent la

transmission de la maladie (Pernet et al. 2012, Normand et al. 2014a). D'autres facteurs sont impliqués (décrits dans la section B.2.b.3.) liés aux facteurs biotiques ou abiotiques de l'environnement, comme la présence de prédateurs, la disponibilité en nourriture, l'eutrophisation, la pollution, des changements de paramètres tels que la disponibilité en oxygène ou encore la salinité peuvent être incriminés ; mais aussi la présence de toxines ou d'agents pathogènes impliqués directement dans ces mortalités.

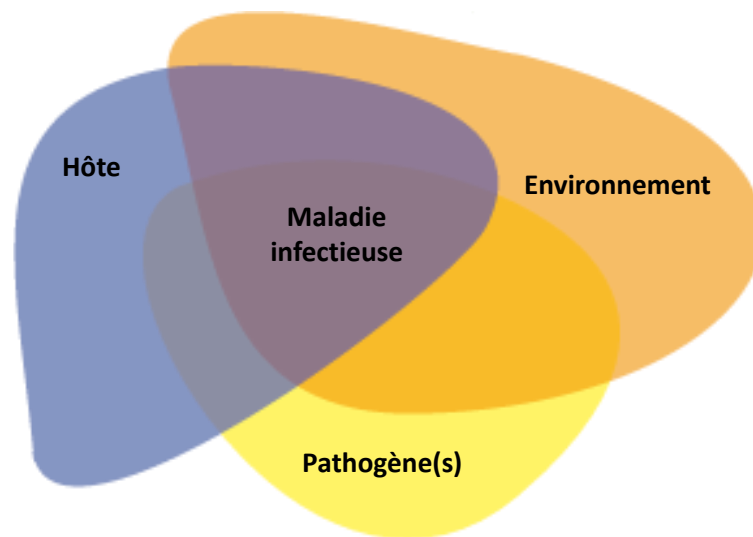


Figure 4 : Triade épidémiologique ; « une maladie infectieuse apparaît quand un hôte sensible est exposé à un ou plusieurs agents pathogènes virulents dans des conditions environnementales particulières » (d'après Snieszko, 1974).

2. Etiologie du syndrome de surmortalité massive des juvéniles

a) Facteurs génétiques

La sélection génétique peut être une possibilité permettant d'améliorer les taux de survie des huîtres (Degremont et al. 2015a). A partir de 2006, des huîtres ayant passé un premier filtre de sélection pendant des épisodes de mortalité massive ont été reproduites et leur descendance issue de sélection génétique a montré des taux de survie améliorés par rapport à des huîtres non sélectionnées, en milieu naturel et face aux infections à l'OsHV-1 (Degremont et al. 2007, Degremont et al. 2010a, Degremont 2011). Segarra et ses collaborateurs en 2014 ont comparé la sensibilité de deux familles biparentales de *C. gigas*, face à une infection à l'OsHV-1 et ont ainsi confirmé un poids important de la composante génétique dans la survie (Segarra et al. 2014c). D'autres travaux ont clairement mis en évidence que la sélection génétique permettait d'améliorer la résistance face au virus OsHV-1, mais n'affectait pas la résistance face aux bactéries *Vibrio aestuarianus* (Azéma et al. 2017).

b) Facteurs abiotiques

(1) La température

La température est un facteur ayant été associé aux épisodes de surmortalité, ceux-ci n'apparaissant que lorsque la température du milieu dépasse les 16°C (Garcia et al. 2011). La température peut avoir différents effets lors de ces épisodes de surmortalité, sur la physiologie de l'hôte et sur les agents pathogènes pouvant être associés. L'huître est un organisme poïkilotherme dont les fonctions physiologiques peuvent être affectées par la température (Clark et al. 2013). Un choc thermique peut influencer la régulation de différentes voies immunitaires comme l'apoptose ou encore la voie PI3K/AKT/mTOR (Zhang et al. 2012, Guo et al. 2015), mais aussi l'expression de gènes immunitaires antiviraux (Green et al. 2014a). L'effet de la température peut aussi influencer la prolifération d'agents pathogènes d'huîtres comme des bactéries du genre *Vibrio* dont l'optimum de croissance se situe aux alentours de 20-25°C (Vezzulli et al. 2015). Par ailleurs la virulence de l'OsHV-1 en laboratoire a été reliée à une augmentation de la température dans une gamme allant de 16°C à 26°C (LeDeuff et al. 1996, de Kantzow et al. 2016). Cette gamme de température influence la transmission et la virulence de l'OsHV-1, qui est plus virulent à des températures chaudes que froides (Petton et al. 2013, Martenot et al. 2015). Normand et ses collaborateurs ont par ailleurs montré qu'une augmentation progressive de la température chez des huîtres en apparence saines, pouvait entraîner une augmentation de la réplication de l'OsHV-1 et favorisait les mortalités (Normand et al. 2014a).

(2) La salinité

Les huîtres sont des organismes euryhalins et peuvent être soumises à de grandes variations de salinité. Ces variations peuvent se traduire par une augmentation de la concentration en sel pendant les périodes chaudes en lien direct avec une évaporation importante ou bien à l'inverse une diminution lors d'épisodes de précipitations importantes. Toutefois, ces variations ne sont pas sans effet sur les organismes, entraînant des changements dans la physiologie des huîtres, notamment à l'échelle hémolymphatique (Knowles et al. 2014). La salinité a un effet sur l'activité des hémocytes et une diminution de la salinité entraîne une diminution de la viabilité des hémocytes (Gagnaire et al. 2006, Matozzo and Marin 2011). Un stress hyalin peut aussi entraîner l'induction de différents gènes impliqués notamment dans l'adhésion cellulaire et la communication, les canaux ioniques et des gènes de réponse immunitaire (Zhao et al. 2012). La salinité joue aussi un rôle sur la présence et la virulence d'agents pathogènes associés. C'est le cas chez les bactéries *Vibrio splendidus* et *Vibrio aesturianus* par exemple, dont l'optimum de salinité est de 20‰ (Vezzulli et al. 2015). Par ailleurs, la salinité joue un rôle lors d'infections avec le virus OsHV-1 où une acclimatation des huîtres à une

faible salinité (10‰) permet de réduire les mortalités lors d'infections avec ce virus (Fuhrmann et al. 2016). Ces variations de salinité ont été reliées aux épisodes de mortalité en Australie qui apparaissent juste après une diminution de la salinité dans les milieux d'élevage (Whittington et al. 2013).

c) Facteurs biotiques

(1) Les micro-algues

En 2011, Cassis et ses collaborateurs ont montré que les mortalités de juvéniles de *C. gigas* étaient reliées à un grand nombre de paramètres biotiques et abiotiques, notamment une grande abondance en micro-algues fourragères permettait une bonne croissance et était associée à de faibles mortalités (Cassis et al. 2011). Cependant, Abi-Khalil et collaborateurs ont montré en 2016 que l'exposition de juvéniles de *C. gigas* à une toxine paralysante (PST pour « Paralytic Shellfish Toxin »), produite par le dinoflagellé *Alexandrium catanella* augmente la sensibilité aux infections avec la bactérie *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (Abi-Khalil et al. 2016).

(2) Les bactéries

Différentes bactéries sont associées au phénomène de surmortalité des huîtres juvéniles, principalement des bactéries du genre *Vibrio* (Petton et al. 2015). Les vibrios sont des bactéries à gram négatif appartenant à la classe des gammaproteobactéries, présents dans les environnements aquatiques. Deux populations de vibrios du clade *Splendidus* ont été plus particulièrement étudiées pour leur association avec les mortalités d'huîtres juvéniles : *Vibrio crassostreae* et *Vibrio tasmaniensis*. Des travaux réalisés par Gay et collaborateurs en 2004 ont permis d'isoler la souche LGP32 à partir d'huîtres moribondes, qui est un *Vibrio tasmaniensis* du clade *Splendidus* (Gay et al. 2004). *Vibrio tasmaniensis* LGP32 est un agent pathogène intracellulaire facultatif des hémocytes (Duperthuy et al. 2011). Il possède une activité cytotoxique vis-à-vis des hémocytes qui dépend de son internalisation par phagocytose (Vanhove et al. 2016). Plus récemment, une autre population, *Vibrio crassostreae*, a été retrouvée associée à des mortalités d'huîtres juvéniles (Lemire et al. 2015). Bien que les mécanismes de virulence de ces vibrios restent encore peu décrits, plusieurs déterminants génétiques ont été identifiés comme étant impliqués dans la pathogénicité des *Vibrio crassostreae*. Notamment un gène appelé R5-7 qui fait partie d'un îlot génomique chromosomique identifié en génomique comparative (Lemire et al. 2015), ainsi qu'un plasmide qui est nécessaire à leur pathogénicité (Bruto et al. 2017). Plus largement, l'ensemble des travaux de l'équipe de Frédérique Le Roux montrent qu'il existe une diversité de vibrios associés aux huîtres et que différentes souches et/ou populations présentent des traits de virulence vis-à-vis des huîtres. Ceci

suggère fortement que les mortalités des huîtres juvéniles, comprennent une composante polymicrobienne pouvant impliquer une diversité de bactéries.

(3) L'OsHV-1

Un virus morphologiquement proche de la famille des herpes virus appelé Ostreid Herpes virus 1 (OsHV-1) a été caractérisé à partir de 1991 et associé à des épisodes de mortalité chez *C. gigas* en France (Nicolas et al. 1992)(Renault et al. 1994), aux Etats-Unis (Friedman et al. 2005), en Nouvelle-Zélande (Hine et al. 1992) et au Mexique (Vasquez-Yeomans et al. 2004). Ce virus a par ailleurs été détecté dans d'autres espèces de bivalves marins comme les huîtres *Ostrea edulis* *Crassostrea rivularis* et *Crassostrea angulata*, ou les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *Ruditapes decussatus*, mais aussi chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* ou chez *Scapharca broughtonii* (Arzul et al. 2001a, da Silva et al. 2008, Xia et al. 2015).

Depuis 2008, les surmortalités massives observées chez les juvéniles sur parcs ostréicoles sont associées à la détection d'un nouveau variant de ce virus, appelé OsHV-1 microvar (OsHV-1 μ var) (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Ces mortalités peuvent atteindre une ampleur considérable avec des taux de mortalité allant de 60% à 100% dans certaines zones d'élevage (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Différents auteurs ont émis l'hypothèse que ce virus (OsHV-1 μ var) soit plus virulent que la souche de référence (OsHV-1) et un des agents principaux dans l'étiologie des mortalités de juvéniles (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011, Schikorski et al. 2011b) puisque les mortalités coïncident avec la détection d'ADN viral (Petton et al. 2015).

Pour empêcher la propagation de ce virus, des mesures sanitaires ont été mises en place afin de limiter les échanges d'huîtres potentiellement infectées entre zones d'élevages. En effet, la principale voie de transmission de l'OsHV-1 entre individus se fait par l'eau de mer (Schikorski et al. 2011a, Paul-Pont et al. 2013). De l'ADN viral est détectable dans l'eau de mer sur parcs ostréicoles lors d'épisodes de surmortalité (Sauvage et al. 2009). En laboratoire, des expérimentations ont montré une transmission horizontale entre les individus par cohabitation (Schikorski et al. 2011a) confirmant la transmission par l'eau de mer en milieu naturel. La transmission peut aussi se faire verticalement *via* le transfert des géniteurs vers la descendance comme l'ont suggéré Barbosa-Solomieu et ses collaborateurs en 2005 (Barbosa-Solomieu et al. 2005). De plus, la détection de l'OsHV-1, chez des adultes asymptomatiques pourrait avoir un rôle de réservoir dans la transmission de la maladie (Evans et al. 2017a). Par ailleurs, ce virus a été détecté chez d'autres espèces, asymptomatiques à l'OsHV-1 suggérant un rôle de réservoir important dans la persistance et la transmission (Evans et al. 2017b). Le virus peut aussi être transmis en laboratoire par injection dans le muscle adducteur d'une suspension virale réalisée à partir d'animaux morts ou moribonds

porteurs de l'OsHV-1 (Schikorski et al. 2011b) entraînant des mortalités pouvant aller jusqu'à 100% en moins de 5 jours.

(a) Morphologie, structure et classification

Il existe aujourd'hui 103 espèces de virus classées parmi l'ordre des Herpesvirales (ICTV, 9^{ème} rapport, 2016). La classification des virus dans cet ordre se fait principalement par des caractéristiques morphologiques et structurelles communes à tous ces virus (**Figure 5**) :

- **Une morphologie similaire** (non différentiable par microscopie électronique)
- **Une taille comprise entre 100 et 200nm**
- **Une enveloppe** composée d'une bicouche lipidique et de glycoprotéines
- **D'un tégument** composé de différentes protéines requises pour la formation de virions
- **D'une capsidie icosaédrique**
- **D'un génome composé d'ADN double brin linéaire** d'une taille comprise entre 125 et 295kpb dont la composition en G+C varie entre 32% et 75%

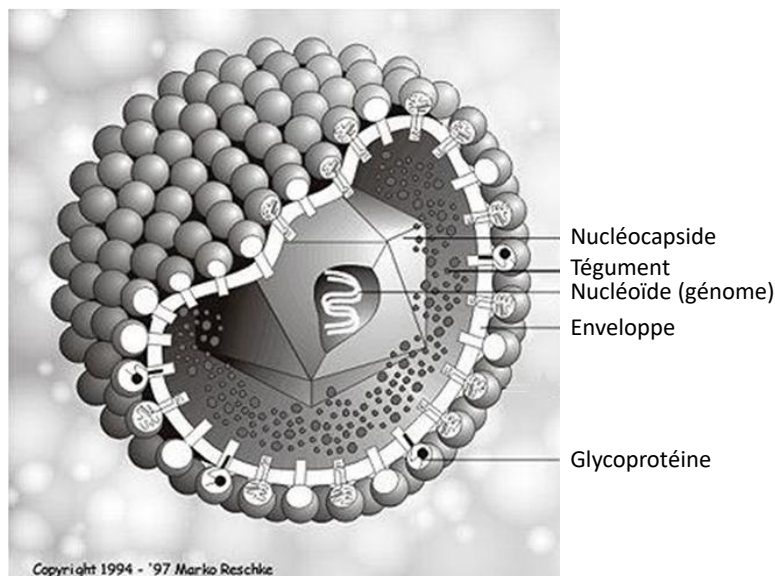


Figure 5 : Structure des virus de l'ordre des Herpesvirales (Extrait de http://www.virology.net/big_virology/bvDNAherpes.html, Dr. Marko Reschke)

L'ordre des Herpesvirales réunit notamment les 2 familles des Alloherpesviridae et les Herpesviridae. Les Herpesviridae sont divisés en 3 sous familles composées des Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae et Gammaherpesvirinae (**Figure 6**). On retrouve notamment dans la sous famille des Alphaherpesvirinae le genre des *Simplexvirus* parmi lequel on retrouve les virus HSV-1 et HSV-2 infectant l'Homme. L'Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) possède l'ensemble des caractéristiques morphologiques des Herpesvirales et a donc été classé dans cet ordre (Davison et al. 2005, Davison et al. 2009). Cependant, il n'a pas été classé dans la famille des Herpesviridae. Les travaux de Savin et

ses collaborateurs en 2010, se sont intéressés à la séquence de l'ADN polymérase de différents herpes virus, présents chez différentes espèces d'hôtes. Ces auteurs ont montré une divergence entre les herpes virus de mammifères et d'oiseaux, d'invertébrés marins, de poissons et d'amphibiens (**Figure 6**), classant l'OsHV-1 dans une nouvelle famille, les Malacoherpesviridae (Davison et al. 2005, Davison et al. 2009, Savin et al. 2010). Cette famille comprend deux genres, les *Ostreavirus*, représentant deux membres, l'OsHV-1 de référence et l'OsHV-1 μ var représenté par ses deux variants A et B (Burioli et al. 2017) et les *Aurivirus* dont un seul membre est décrit, l'Haliotid herpesvirus 1 aussi appelé Abalone Herpes Virus 1 (AbHV1) représentant deux variants isolés en Australie et en Thaïlande. Ce virus a été identifié chez l'Ormeau *Haliotis diversicolor* dont les caractéristiques semblent très proches de l'OsHV-1 (Chang et al. 2005, Savin et al. 2010).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune lignée cellulaire de bivalves et il est encore impossible d'infecter des lignées hétérologues avec l'OsHV-1. Le cycle de réplication de l'OsHV-1 est à ce jour encore inconnu. Des travaux récemment ont montré qu'il est possible d'infecter des primo-cultures *ex vivo* d'hémocytes et que le virus OsHV-1 s'y réplique (Morga et al. 2017).

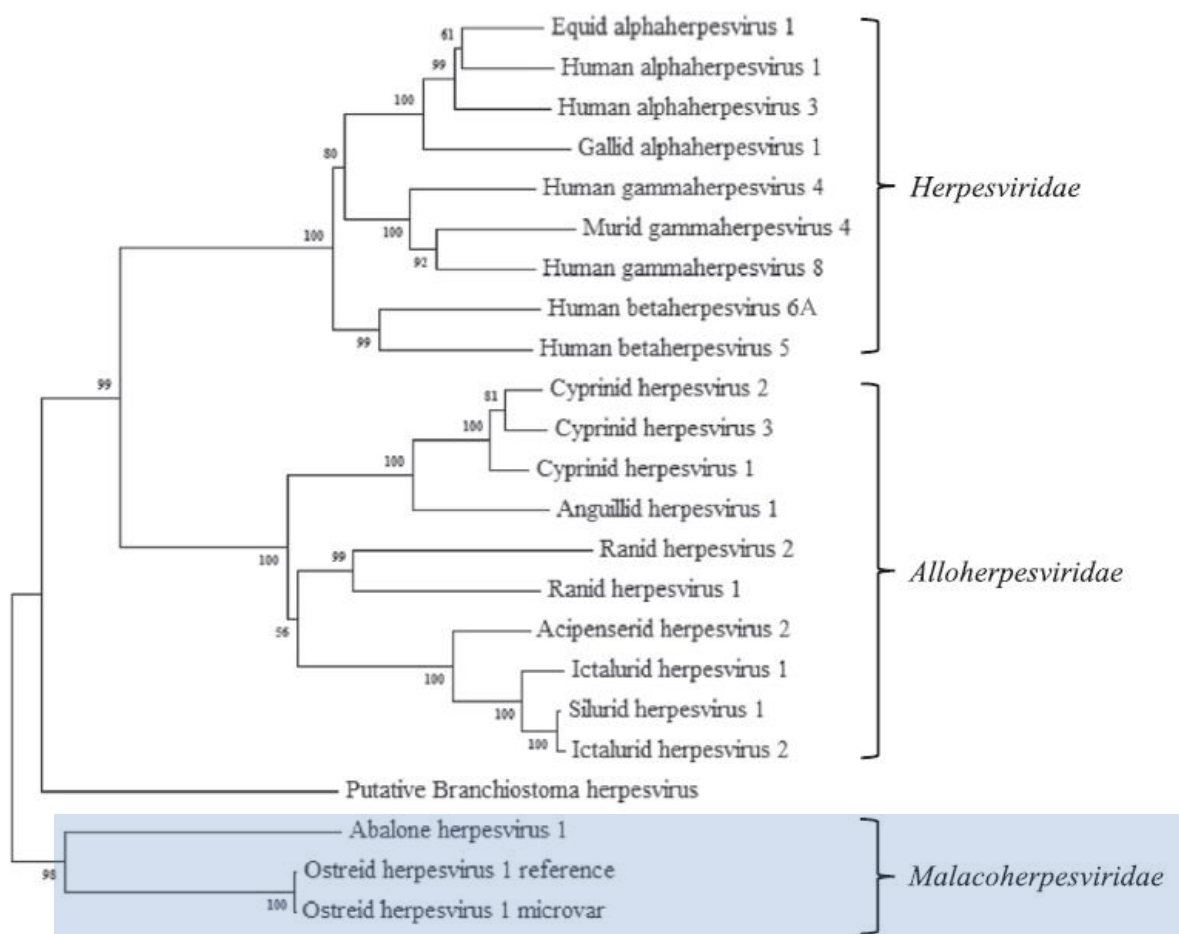


Figure 6 : Classification des virus de l'ordre des Herpesvirales. D'après (Burioli et al. 2017).

(b) Génome de l'OsHV-1 et de ses variants

A partir de purification de particules virales chez des larves de *C. gigas* infectées (Le Deuff and Renault 1999), le séquençage complet du génome de l'OsHV-1 a été réalisé en 2005 (GenBank: AY509253)(Davison et al. 2005). D'une taille de 207 439 pb, ce génome comporte 124 ORFs. Un premier variant de l'OsHV-1 appelé « OsHV-1 var » a été identifié en 1997 chez *Crassostrea gigas* et la palourde *Ruditapes philippinarum* présentant une délétion de 2.8kpb dans une région répétée inversée (Arzul et al. 2001b). Ce variant n'a été que très rarement détecté en France et il est possible qu'il ne soit qu'un variant infectant la palourde et qu'une transmission interspécifique ait permis de le détecter dans l'huître (Arzul et al. 2001b).

Depuis 2008, un nouveau variant a été identifié. Il s'agit d'un variant appelé OsHV-1 μ var (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Le génome de ce variant a été séquencé en 2017 et a révélé une homologie de 94.4% avec le génome de référence, pour 128 ORFs (Burioli et al. 2017). Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette homologie très importante et les différentes mutations, insertions et délétions identifiées pourraient être à l'origine de la virulence de ce variant.

Le séquençage de ce variant a permis d'identifier:

- la perte de 5 ORFs (ORF36, ORF37, ORF48, ORF62 et ORF63)
- clivage de 6 ORFs (ORF5, ORF32, ORF50, ORF65, ORF73 et ORF105) en 2 ORFs distincts numérotés .1 et .2.
- l'addition de 4 nouveaux ORFs (ORF IN.1 à IN.4) résultant de l'insertion de 2671 pb dans la région longue unique située entre les ORFs 42 et 44 du génome de référence
- des délétions importantes dans 4 autres ORFs (ORF3, ORF53, ORF41 et ORF120) compromettant probablement la fonction de ces gènes

D'après ces données de séquençage et par homologie de séquence avec d'autres virus, des groupes d'ORFs ont pu être identifiés et des fonctions ont pu être prédites :

- 16 gènes codant des enzymes faisant partie des ATPases (ORF109), du complexe hélicase/primase (ORF7, ORF24, ORF49, ORF66, ORF67, ORF115), ADN polymérase (ORF100), DUTpases (ORF27, ORF34, ORF75), ribonucléotides réductases (ORF20, ORF51), un domaine Deoxynucléoside kinase (ORF44), ARN-Ligase (ORF64) et Exonucléase (ORF95)
- 19 gènes codant des protéines membranaires (ORF16, ORF22, ORF25, ORF32, ORF41, ORF IN.4, ORF50.2, ORF54, ORF57, ORF59, ORF65.1, ORF68, ORF72, ORF77, ORF80, ORF84, ORF88, ORF103 et ORF111)

- 8 gènes possédant des motifs RING finger (ORF9, ORF38, ORF53, ORF96, ORF97, ORF117, ORF118, ORF121)
- 9 gènes codant des protéines sécrétées (ORF13, ORF15, ORF17, ORF IN.1, ORF50.1, ORF65.2, ORF74, ORF83 et ORF 120)
- 4 gènes codant des inhibiteurs d'apoptose ayant un motif Baculovirus inhibitor of apoptosis Repeat (BIR) (ORF42, ORF87, ORF99 et ORF106)
- 70 gènes codant des protéines de fonctions inconnues, soit 56% du génome

En raison du nombre très important d'ORFs dont les fonctions sont inconnues, il est difficile de pouvoir identifier et d'interpréter les différences de virulence entre l'OshV-1 de référence et le variant μ var (Rosani et al. 2017).

Par ailleurs, d'autres données provenant d'analyses par PCR emboîtée réalisées sur des échantillons d'huîtres infectées provenant de France, Chine, Japon, Australie, Etats-Unis, Mexique, Corée et Nouvelle-Zélande ont permis de mettre en évidence l'existence d'au moins 24 types différents d'OshV-1 (Bai et al. 2015). Ces données révèlent des variations géniques entre les différentes souches dans 598 pb parmi les 207 439 pb du génome. A l'heure actuelle, ces différents types ne sont pas corrélés au génotype des hôtes, mais principalement au lieu géographique, suggérant que différents variants coexistent dans le monde. Il n'est pas surprenant de trouver la coexistence de ces différents variants puisque le génome d'un virus ne peut pas être défini comme une séquence unique correspondant à un type appelé « sauvage », mais consiste en une distribution de séquences mutantes, chacune différente de la séquence des autres clones (Arzul et al. 2017).

Chez le pétoncle *Chlamys farreri*, un herpès virus, l'« Acute Viral Necrosis Virus » ou AVNV, a été identifié lors d'épisodes de mortalité. Il semblerait que ce virus soit un variant de l'OshV-1 (Renault et al. 2012, Ren et al. 2013). Un autre variant de l'OshV-1 a été identifié chez *Scapharna broughtonii* (OshV-1-SB) pendant des épisodes de mortalité et le séquençage de son génome a permis de mettre en évidence une identité de 95.2% avec l'ADN de l'OshV-1 de référence et de 97.3% avec l'AVNV (Xia et al. 2015).

(c) Diagnostic d'une infection à l'OshV-1

Il n'existe pas de signe clinique permettant d'identifier une infection au virus OshV-1 en milieu naturel. Les signes cliniques sont la mort des animaux, ou un ralentissement de la fermeture des valves, mais ces signes ne sont pas spécifiques d'une infection à l'OshV-1. En revanche, il existe un large panel de méthodes cliniques permettant d'identifier la présence de l'OshV-1 en laboratoire.

- **La microscopie électronique à transmission.** Cette technique ne permet pas d'identifier clairement l'OsHV-1, mais permet d'identifier la présence de virus. Cette approche a notamment permis de suggérer que le manteau, le cœur, les hémocytes, les palpes labiaux, les branchies ainsi que la glande digestive pouvaient être des organes de réplication (Renault et al. 1994, Renault et al. 1995, Schikorski et al. 2011a).
- **PCR conventionnelle.** Différentes amorces ont été dessinées pour permettre la détection de l'OsHV-1 et du variant OsHV-1 μ var notamment les amorces C9/C10, C2/C6 et DP ciblant l'ADN polymérase située dans une région peu polymorphe du génome (Batista et al. 2007, Webb et al. 2007).
- **PCR quantitative en temps réel.** Deux types de PCR quantitative en temps réel ont été développées, la méthode SYBR green® et la méthode TaqMan® (Pepin et al. 2008, Martenot et al. 2010). Ces techniques permettent une quantification absolue de l'ADN viral, mais ne peuvent pas être reliées directement au nombre de particules virales potentiellement infectieuses. En revanche, la PCR en temps réel PMA (propidium monoazide) permet de quantifier les particules virales encapsidées, sans quantifier les virus dégradés ou l'ADN libre (Moreau et al. 2015a).
- **L'hybridation *in situ* (HIS).** Cette technique permet de détecter l'ADN ou les ARNm de l'OsHV-1 de référence ainsi que les différents variants, mais ne permet pas de discriminer les différents génotypes dans un même échantillon (Arzul et al. 2002, Lipart and Renault 2002, Corbeil et al. 2015, Bueno et al. 2016). Cette technique a permis d'identifier la présence de l'OsHV-1 dans différents organes mais aussi d'identifier sa réplication dans l'huître.
- **Séquençage.** La technique de séquençage ADN du génome du virus purifié permet de pouvoir identifier la présence de l'OsHV-1 et de pouvoir clairement identifier le génotype du virus (Davison et al. 2005, Burioli et al. 2017). Le suivi des transcrits viraux par la technique de séquençage ARN permet de pouvoir identifier la présence de virus OsHV-1 infectieux (He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Rosani and Venier 2017).

III. L'immunité de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Chez les vertébrés, les mécanismes de défense reposent sur une immunité de type innée et de type adaptative. La combinaison de ces deux systèmes permet une réponse rapide et non-spécifique (défense innée) et une seconde réponse dépendante de la première très spécifique et capable de mécanisme de mémoire face à des agents pathogènes déjà rencontrés (défense adaptative ou défense acquise). Chez les invertébrés, le système immunitaire repose sur une immunité de type innée et comme le disaient Loker et ses collaborateurs en 2004, il semble qu'il reste encore beaucoup à faire pour caractériser l'immunité des invertébrés (*i.e.* « Invertebrate immune systems- not homogeneous, not simple, not well understood » (Loker et al. 2004)). A la différence des vertébrés, les invertébrés sont dépourvus de lymphocyte et ne produisent pas d'anticorps et vont donc mettre en place une toute autre stratégie de défense faisant intervenir une série de cascades de réactions permettant l'élimination des agents pathogènes. La première ligne de défense face à des infections sont les barrières physico-chimiques que sont chez l'huître la coquille, le mucus sur les épithélia, ou encore la régulation du flux d'eau dans la coquille. Suite à la reconnaissance des agents pathogènes par le système immunitaire, la défense de l'organisme repose alors sur des réponses de type cellulaires et des cascades immunitaires humorales permettant d'enrayer l'invasion et l'expansion des pathogènes.

A. Les tissus immunitaires

Chez l'huître, comme chez les autres bivalves, les mécanismes de réponse immunitaire reposent principalement sur des cellules circulantes multi-potentes et immunocompétentes que sont les hémocytes et les cellules épithéliales de différents organes participant aux mécanismes de défense antimicrobiens (Gueguen et al. 2006, Itoh and Takahashi 2008, Bachere et al. 2015). Les hémocytes peuvent être circulants dans les sinus, vaisseaux et cœur mais peuvent aussi migrer dans différents organes comme la branchie ou le manteau (Bachere et al. 2004). Les hémocytes ont différentes fonctions notamment dans la cicatrisation, la réparation de la coquille, le transport de nutriments, mais aussi des fonctions immunitaires (Sminia and Vanderknaap 1987, Montes et al. 1995, Canesi et al. 2002). Ce sont des cellules capables de reconnaître le « soi » du « non-soi » par la reconnaissance de motifs associés aux agents pathogènes (PAMPs) ou d'opsonines et ainsi de déclencher des mécanismes de réponses à médiations cellulaires (agrégation, phagocytose, apoptose encapsulation) et la sécrétion de composés microbicides (des peptides antimicrobiens, des pièges à ADN (NETs), des enzymes hydrolytiques, des espèces réactives de l'oxygène) suite à l'activation de

différentes cascades de voies de signalisation immunitaires (Bachere et al. 2015) (**Figure 7**). Lors d'une blessure, de contaminations ou d'infections par des agents pathogènes, les hémocytes vont être recrutés et vont alors migrer vers le site affecté *via* l'hémolymphe. Ces cellules vont s'agréger entre elles permettant d'immobiliser le corps étranger et ainsi limiter l'infection (Feng 1988). Les hémocytes sont des cellules capables de phagocytose, processus permettant l'absorption et l'élimination de particules de petite taille ($>0.5\mu\text{m}$) telles que les bactéries ou les levures.

La phagocytose se déroule en 3 étapes : la reconnaissance de la particule *via* des récepteurs de phagocytose qui peuvent interagir avec des ligands présents à la surface des particules directement ou indirectement *via* des opsonines ; l'internalisation de la particule à phagocyter *via* une déformation de la membrane plasmique soutenue par des modifications du cytosquelette d'actine pour former le phagosome ; ensuite le phagosome va subir un processus de maturation notamment *via* la fusion avec des compartiments lysosomaux pour devenir un phagolysosome. Ce phagolysosome possède différentes activités microbicides et de dégradation comme : un milieu acidifié, différentes activités enzymatiques comme des hydrolases et des protéases, des peptides antimicrobiens, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou encore de fortes concentrations de métaux toxiques comme le Cuivre et le Zinc (Flannagan et al. 2009).

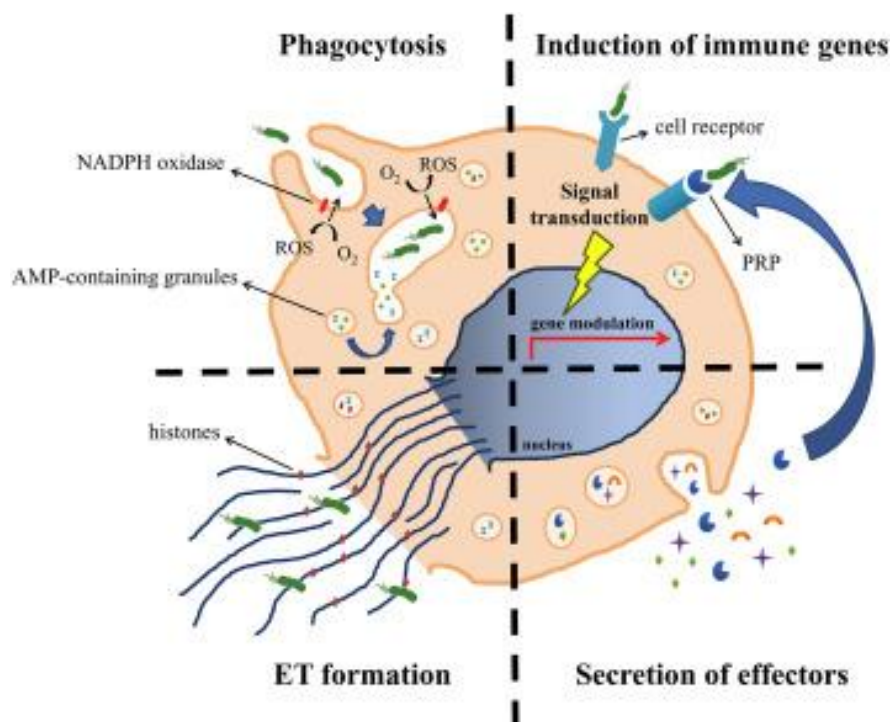


Figure 7 : Représentation schématique des fonctions immunitaires des hémocytes d'huître creuse *Crassostrea gigas*. Extrait de (Bachere et al. 2015).

Le terme « hémocyte » regroupe un ensemble de 3 populations principales de cellules différentes dont la classification a été réalisée à partir de critères morphologiques et ultra-

structuraux par différents auteurs. On distingue ainsi les granulocytes (comportant des granules dans le cytoplasme), les hyalinocytes (ne comportant pas de granules dans leur cytoplasme) et les « blast-like cells » qui sont des cellules de petite taille dont le rapport noyau/cytoplasme est supérieur à 1 (Hine 1999, Bachere et al. 2015) (**Figure 8**). Actuellement il n'existe pas de consensus clair chez l'huître sur le nombre de lignages cellulaires parmi les hémocytes. Différentes hypothèses s'opposent allant de l'hypothèse d'un seul lignage cellulaire avec différents stades de maturation des « blast-like » aux granulocytes en passant par les hyalinocytes jusqu'à l'hypothèse d'une diversité de lignages qui restent à caractériser (Bachère et. al. 2015). De plus, il n'existe pas de lignée cellulaire d'hémocyte ni de culture de primo-culture pérennes pouvant servir d'outil de routine pour des études *ex vivo*.

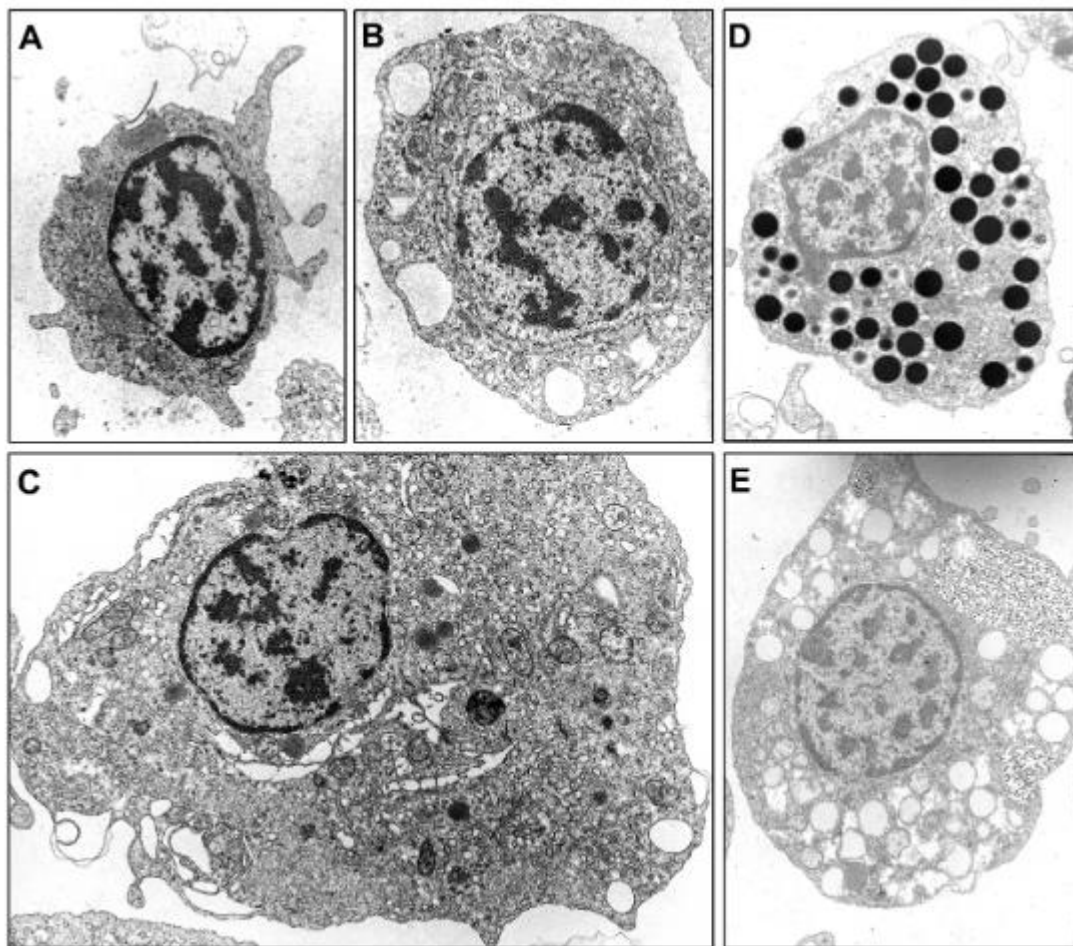


Figure 8 : Les hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les agranulocytes (A, B et C), (A) les « blast-like », (B) et (C) les hyalinocytes. Les granulocytes (D et E). Microscopie électronique à transmission x15000. Extrait de (Bachere et al. 2004).

A l'heure actuelle, aucun tissu hématopoïétique des hémocytes n'a été clairement identifié. Des travaux ont montré une augmentation du nombre d'hémocytes et une stimulation de gènes liés à l'hématopoïèse (Runx1 et BMP7) dans des branchies d'huîtres lors d'une seconde infection avec la

bactérie *Vibrio splendidus*, suggérant cet organe comme site d'hématopoïèse (Zhang et al. 2014, Li et al. 2017a). D'autres travaux ont identifié la présence de cellules apparentées à des cellules souches ou cellules progénitrices au niveau de l'épithélium basal de la branchie, capables de différenciation en hémocytes, suggérant que les branchies sont des organes participant à l'hématopoïèse (Jemaa et al. 2014).

B. Reconnaissance par le système immunitaire

La première étape de l'activation du système immunitaire est la reconnaissance des agents pathogènes *via* des motifs moléculaires associés aux pathogènes (« Pathogen-associated Molecular Patterns » ou PAMPs). Ces PAMPs sont de natures très diverses, dépendant du type d'agent pathogène. Chez les bactéries, ces PAMPs peuvent être des lipopolysaccharides (LPS) ou des peptidoglycane, tandis que chez les virus des glycoprotéines ou les acides nucléiques ADN, ARN double brin ou simple brin, peuvent avoir cette fonction (Mogensen 2009). La reconnaissance de ces PAMPs par l'organisme infecté se fait par des récepteurs de reconnaissance de motifs associés aux pathogènes (« Pathogen-associated pattern Recognition Receptors » ou PRRs). Le séquençage du génome de *Crassostrea gigas* notamment (Zhang et al. 2012), a permis d'identifier un très grand répertoire de PRR parmi lesquels:

- **Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP)** sont des molécules essentielles dans l'immunité innée des vertébrés et des invertébrés par leur capacité à reconnaître spécifiquement le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries et de les éliminer (Royet et al. 2011). Chez l'huître, l'analyse du génome a permis de prédire 9 PGRP (Zhang et al. 2015).
- **Les FREPS (Fibrinogen-related proteins)**, membres de la superfamille des immunoglobulines, jouent un rôle de PRR très important dans différents processus de défense comme l'agglutination, la lyse bactérienne et la défense contre les parasites (Hanington and Zhang 2011). Chez les invertébrés, les FREPs ont été initialement identifiées chez un gastéropode, *Biomphalaria glabrata* lors d'une infection parasitaire (Adema et al. 1997). Les FREPs ont été décrites comme impliquées dans une réponse antibactérienne chez la crevette *Litopenaeus vannamei* mais pas impliquées lors d'une infection avec le « White spot syndrome virus » (WSSV) (Coelho et al. 2016). Chez l'huître, il existe une très grande diversité de ces molécules, avec plus de 190 apparentées aux FREPs caractérisées dans le génome (Zhang et al. 2012, Huang et al. 2015, Zhang et al. 2015). Cependant, ces molécules ont été caractérisées en tant que FREPs par homologies de séquences chez d'autres organismes par rapport au domaine « fibrinogen-like » présent dans la région C-terminale mais la présence

d'immunoglobuline n'a pas été recherchée, leur fonctionnalité n'est pas encore démontrée (Huang et al. 2015).

- **Les récepteurs scavenger (SRs)** sont des récepteurs membranaires ou endocytiques ayant différentes fonctions physiologiques mais aussi immunitaire *via* la reconnaissance de PAMPs. Chez l'homme, des travaux ont montré qu'un récepteur scavenger (le récepteur BI) était impliqué dans la reconnaissance de glycoprotéines du virus de l'hépatite C (Catanese et al. 2010). Chez l'huître, il existe une grande diversité de SR. En effet, les données du génome ont permis de révéler 71 gènes annotés comme codant des SR. Des travaux réalisés chez *C. gigas* ont montré une augmentation du niveau de transcription de différents récepteurs scavenger pendant les épisodes de « mortalité estivale » suggérant leur rôle dans l'adaptation à un environnement complexe (Huvet et al. 2004, Fleury et al. 2010).
- **Les lectines** sont des protéines impliquées notamment dans la liaison aux glycoprotéines, glycolipides ou polysaccharides présents à la surface de différents pathogènes. Chez les invertébrés, il existe un grand nombre de lectines dont les fonctions peuvent être directement associées à une activité antimicrobienne ou jouer un rôle d'opsonine. Chez l'huître creuse, différents types de lectines ont été identifiées, les gigalines, le ficollines, les lectines de type C, les integrines, les galectines et les chitinases-like lectines (Terahara et al. 2006, Badariotti et al. 2007, Yamaura et al. 2008, Duperthuy et al. 2011). Les lectines de types C peuvent être solubles ou trans-membranaires et des travaux chez l'huître *C. gigas* ont montré que ces molécules sont impliquées dans la reconnaissance de bactéries gram-positives ou peuvent jouer un rôle d'opsonine et augmenter l'activité de phagocytose face à *Vibrio splendidus*, au même titre que les galectines (Li et al. 2015, Jia et al. 2016). Les lectines de type C peuvent aussi jouer un rôle dans la reconnaissance d'un grand nombre de glycoprotéines virales entraînant une stimulation de l'activité de phagocytose ou la production de cytokine chez les vertébrés (Dambuza and Brown 2015). A l'heure actuelle, des analyses transcriptomiques réalisées chez l'huître lors d'infections à l'OsHV-1 ont permis d'identifier une surexpression d'une lectine de type C et d'une galectine (He et al. 2015). Le séquençage du génome de *C. gigas* a permis de mettre en évidence un grand nombre de gènes codant des protéines contenant un domaine C-type lectin (266 gènes) suggérant un rôle important de ces molécules dans les mécanismes de défense immunitaire (Zhang et al. 2015).

D'autres types de lectines, les « mannoses-binding lectins » (MBLs), sont des membres des collectines et sont capables de se lier à différents types d'agents pathogènes

(bactéries, parasites, virus) (Kilpatrick 2002). Ces MBLs ont la capacité d'activer le système du complément chez les vertébrés (Holmskov et al. 2003). Le système du complément possède différentes fonctions comme l'opsonisation, des activités antimicrobiennes et la reconnaissance de différents types d'agents pathogènes (Nonaka 2001). Le système du complément est composé de 3 voies principales chez les vertébrés: la voie classique (déclenchée par les anticorps), la voie des lectines activée par les MBLs et la voie alternative déclenchée par les agents pathogènes directement (Nonaka and Miyazawa 2002). Chez l'huître, des travaux ont récemment montré un rôle potentiel de lectines de type C et de MBLs dans l'activation du système du complément en réponse à une infection avec *Vibrio splendidus* (Li et al. 2015). Des protéines très importantes dans le système du complément sont les C1q, capables d'activer la voie classique, mais aussi dans la reconnaissance des agents pathogènes et jouent un rôle important dans le système immunitaire inné (Fraser et al. 2006). Chez l'huître, 337 gènes codent ces protéines contenant un domaine C1q dont seulement un seul présente une homologie avec un C1q de vertébré et un domaine collagène (Gerdol et al. 2015, Zhang et al. 2015). Lors d'une infection avec des bactéries du genre *Vibrio aesturianus*, *V. tubiashii*, *V. aesturianus*, *V. alginolyticus* et *Micrococcus luteus*, l'expression de 164 gènes codant des C1q est régulée et 154 sont régulés suite à un stress abiotique (thermique, hyalin et exposition à l'air) (Zhang et al. 2015). Ces résultats suggèrent une diversification des fonctions de C1q chez *C. gigas*.

- **Les récepteurs Toll (TLRs)** sont des récepteurs clés dans l'immunité innée, impliqués dans la reconnaissance d'un large éventail d'agents pathogènes directement ou indirectement. Chez les vertébrés, ces récepteurs Toll peuvent être localisés au niveau de la membrane cellulaire et contiennent un domaine extracellulaire riche en leucine, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire appelé TIR (Toll/ Interleukin-1 receptor). Le domaine extracellulaire est impliqué dans la reconnaissance des agents pathogènes et le domaine intracellulaire dans la transduction du signal (Barton and Medzhitov 2003). D'autres récepteurs Toll sont intracellulaires, localisés au niveau de l'endosome. Chez les mammifères, les récepteurs TLR1, 2, 6 et 10 reconnaissent entre autres les lipopeptides, TLR4 reconnaît les LPS, TLR3 qui est au niveau de l'endosome reconnaît les ARNs doubles brins et TLR9 reconnaît les motifs CpG de l'ADN (Lee and Min 2007), suggérant une grande diversité de PAMPs pouvant être reconnus. Chez les insectes, la reconnaissance des récepteurs Toll est indirecte avec les structures microbiennes et se fait *via* la protéine Spaetzle, qui est le ligand Toll (Weber et al. 2003).

Chez *C. gigas*, il existe un grand nombre de gènes codant des récepteurs Toll (83 gènes) identifiés dans le génome (Zhang et al. 2015). A l'heure actuelle, 6 TLRs ont été identifiés comme participant à la réponse immunitaire lors d'infections principalement avec des bactéries (CgTRL-1 à 6) (Zhang et al. 2011a, Zhang et al. 2013b, Wang et al. 2016). Des travaux publiés en 2015 ont également montré par analyse transcriptomique que 19 transcrits codant des TLRs sont sur-exprimés en réponse à des bactéries du genre *Vibrio*, des LPS ou le virus OsHV-1 (Zhang et al. 2015). D'autres travaux ont également montré cette sur-expression de différents TLRs en réponse aux infections à l'OsHV-1 (Jouaux et al. 2013, Segarra et al. 2014c, He et al. 2015, Green et al. 2016b).

- **Les récepteurs RIG-I-like (RLRs)** sont des récepteurs cytoplasmiques de la famille des hélicases d'ARN double brin. Les deux principaux RLRs sont RIG-1 (Retinoïc acid-inducible gene) codé par le gène ddx58 et MDA5 (melanoma differentiation associated protein 5). RIG-1 est capable de détecter les ARNs doubles brins de petite taille (<300pb) d'origine virale mais aussi synthétique comme le poly(I:C) (l'acide polyinosinique-polycytidylique) (Huang et al. 2017) et les ARNs simples brins, uniquement ceux portant une tri-phosphorylation en 5', permettant de discriminer le « Soi » du « non-Soi » (Kato et al. 2006, Pichlmair et al. 2006). MDA5 quant à lui reconnaît spécifiquement les ARNs doubles brins de grande taille (>1000pb)(Reikine et al. 2014). Chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, les récepteurs RIG-1 like sont absents et ce sont les TLRs et Dicer, impliqués dans la voie de l'ARN interférence, qui jouent le rôle de senseur d'acides nucléiques (Deddouche et al. 2008). Dans le génome de *C. gigas*, 11 RLRs ont été identifiés (Zhang et al. 2015), parmi lesquels 7 sont surexprimés en réponse à une infection à l'OsHV-1 ou au poly(I:C) (Green et al. 2014a, He et al. 2015).

Comme nous venons de le voir, il existe une grande diversité de récepteurs immunitaires chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'identification de ces molécules a bien souvent été réalisée *in silico* par homologie de séquence ou par des approches transcriptomiques ciblées. Alors que les différentes fonctions de ces mécanismes sont aujourd'hui relativement bien connues chez les vertébrés ou des organismes modèles, chez l'huître creuse, la preuve formelle de la conservation de leur fonction n'est pas encore démontrée et leurs ligands non identifiés. Cependant, l'existence dans le génome d'une grande diversité de molécules ayant des fonctions connues chez d'autres organismes révèle comme le titrait Zhang et ses collaborateurs en 2015 « une expansion massive et une divergence fonctionnelle des gènes immunitaires » chez l'huître creuse (Zhang et al. 2015).

C. Signalisations et mécanismes de l'immunité antivirale

Suite à la reconnaissance des agents pathogènes, différentes cascades immunitaires vont être activées notamment par la régulation de différentes voies de signalisations immunitaires. Différentes études se sont intéressées aux mécanismes immunitaires influencés par des agents pathogènes et se sont bien souvent intéressées à la caractérisation de composés antimicrobiens, d'activités enzymatiques ou aux réponses transcriptomiques comme c'est le cas lors d'infections avec le virus OsHV-1 (Green and Montagnani 2013, Jouaux et al. 2013, Green et al. 2014a, Normand et al. 2014b, Segarra et al. 2014c, Green et al. 2015a, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016b). Ces travaux ont permis de mettre en lumière et d'identifier différents gènes régulés en réponse à l'OsHV-1 et ainsi proposer l'implication de différentes voies de signalisations antivirales.

1. Un système de type interféron

L'avancée majeure apportée par le séquençage du génome de *C. gigas* en 2012 a permis de mieux comprendre l'immunité antivirale chez *C. gigas* (Zhang et al. 2012). En 2015, à partir d'analyses *in silico*, Green et collaborateurs ont ainsi pu identifier différentes voies de signalisations antivirales conservées dans le génome de l'huître, permettant de supposer l'existence d'un système de type interféron en comparaison au système interféron identifié chez les vertébrés (Green et al. 2015a). Le système interféron est, chez les vertébrés, le principal mécanisme de défense immunitaire antiviral. Ce système va de la reconnaissance virale (glycoprotéines, ARN doubles brins) jusqu'à la sécrétion de protéines, les interférons (Randall and Goodbourn 2008). Ces protéines servent de messagers d'alerte pour les autres cellules au cours d'une infection virale permettant ainsi la production d'un ensemble de molécules antimicrobiennes, en empêchant l'entrée du virus dans de nouvelles cellules et en activant des mécanismes antiviraux comme l'apoptose ou l'autophagie (Randall and Goodbourn 2008) (**Figure 9**). L'activation de ce signal se fait par la voie JAK/STAT (Janus kinases/ Signal transducers and activators of transcription) entraînant la transcription de nombreux gènes stimulés par l'interféron (ISGs, pour « interferon stimulated genes ») et la stimulation de différents mécanismes antiviraux (Darnell et al. 1994). Chez la drosophile, la voie JAK/STAT est conservée et impliquée dans la réponse antivirale, mais aucun interféron n'a encore été identifié (Dostert et al. 2005, Honda et al. 2006, Kingsolver et al. 2013, Myllymaki and Ramet 2014).

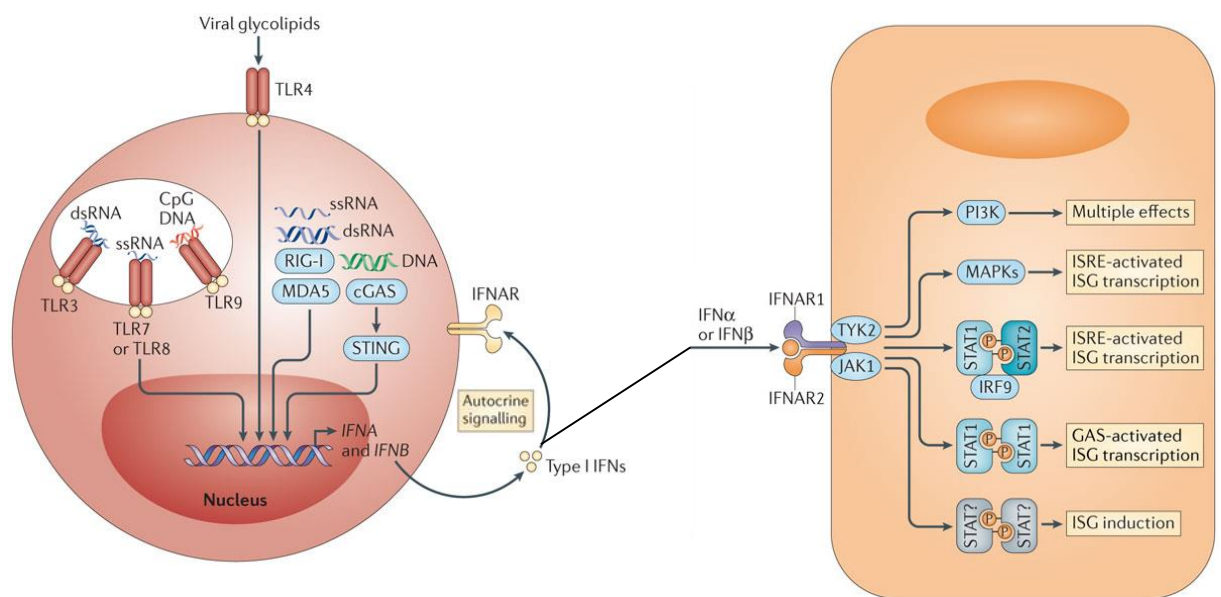


Figure 9 : Principales voies de signalisations régulant le système Interféron chez les vertébrés. (D'après (McNab et al. 2015) et (Crouse et al. 2015))

Chez l'huître, les données du génome ont révélé l'existence de nombreux gènes similaires aux ISGs tels que :2'-5-oligoadenylate synthetase (OAS) ; la protéine Mx ; la viperin, ADAR-L ; protéine kinase R ou IFI44 (Green et al. 2015a) (**Figure 10**). En 2016, des auteurs ont identifié chez l'huître creuse un récepteur de cytokine (CgIFNAR-3), capable d'activer la voie JAK/STAT et la transcription de différents ISGs (Lacoste et al. 2002, Zhang et al. 2016). Par ailleurs, l'huître est capable de reconnaître des ARNs doubles brins non spécifiques (poly(I:C)) et d'entraîner une réponse antivirale efficace lors d'une infection à l'OshV-1 en limitant sa réplication (Green and Montagnani 2013). Plusieurs senseurs d'acides nucléiques viraux ont été identifiés dans le génome (Zhang et al. 2012) comme par exemple des TLRs, des RLRs, cGAS (détectant l'ADN cytosolique) (**Figure 10**). En aval de ces récepteurs, différents effecteurs des voies de signalisations ont été identifiés, notamment comme des éléments de la voie NF-κB (Kawai and Akira 2007), comme IKK, Cg-Rel ou IκB (Escoubas et al. 1999, Montagnani et al. 2004, Montagnani et al. 2008). De plus, des IRFs (Interferons regulatory factors) ou encore STING (stimulator of interferon) intervenant dans la production d'interféron de type I chez les vertébrés sont présents dans le génome de *C. gigas*.

Ces différentes voies de signalisations sont capables d'activer des facteurs de transcriptions permettant l'induction de la transcription de molécules immunitaires comme les cytokines ou les peptides antimicrobiens. Si à l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve formelle de l'existence d'interférons chez *C. gigas*, ni de la conservation fonctionnelle de ces voies, les données obtenues à

partir des études transcriptomiques réalisées lors d'infections avec l'OshV-1 permettent de supposer son existence ou du moins un système proche du système interféron des vertébrés (Green et al. 2015a) (**Figure 10**).

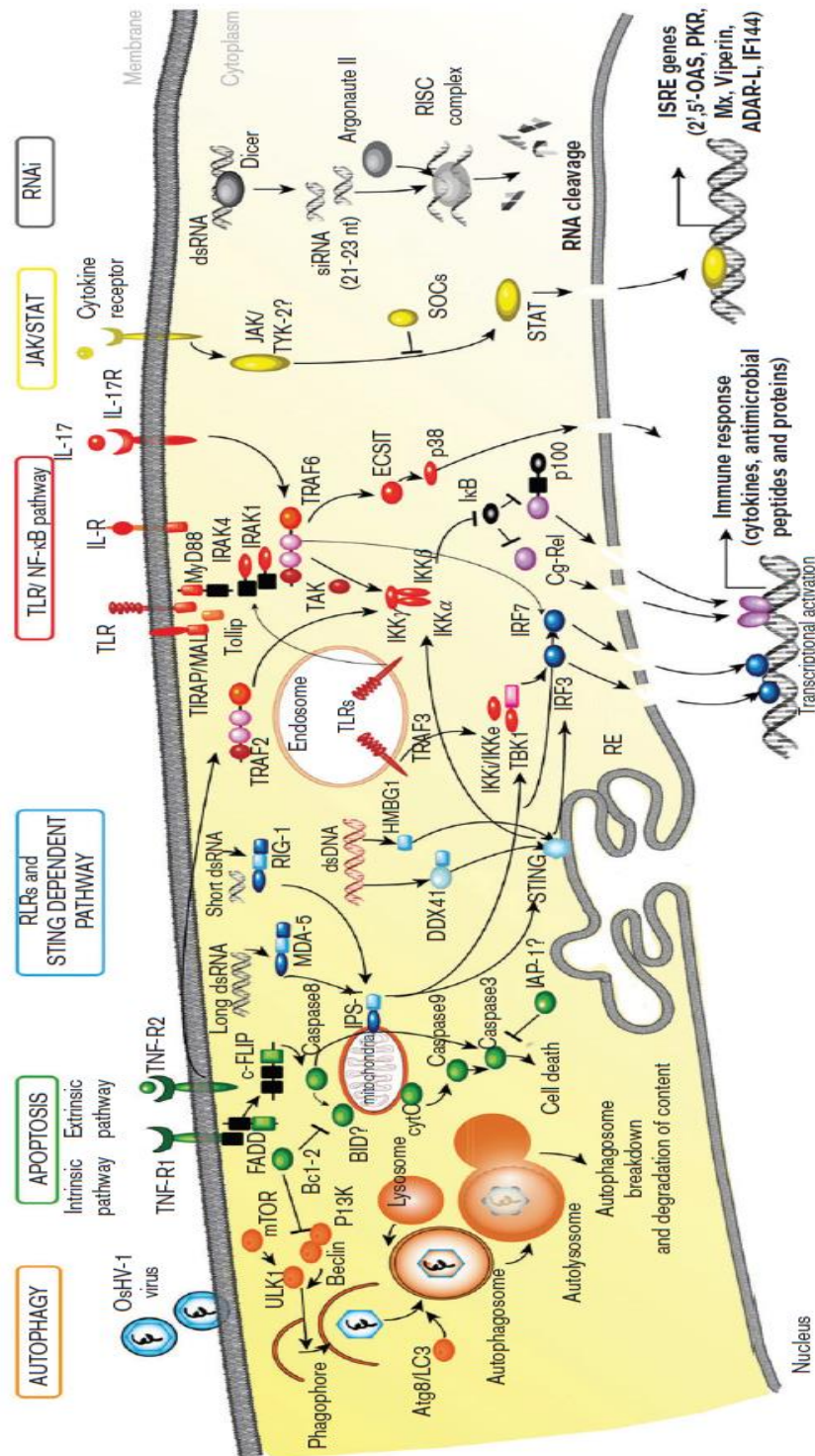


Figure 10: Représentation de voies de signalisations antivirales conservées chez l'huître *Crassostrea gigas*, identifiées à partir du génome (Zhang et al. 2012). (Extrait de (Green et al. 2015a)

2. L'ARN interférence

Le mécanisme ARN interférence ou RNAi est un mécanisme bien décrit chez les vertébrés permettant de contrôler l'expression de gènes à l'échelle transcriptomique et post-transcriptomique (Meister and Tuschl 2004). L'ARN interférence est un processus conservé au cours de l'évolution, caractérisé dans différents règnes (mycètes, animaux et végétaux) déclenché par la reconnaissance d'ARNs doubles brins par Dicer, une ribonucléase clivant les ARNs doubles brins en fragments d'ARN doubles brins non codants, de taille variable (20-25 pb). Les petits ARNs formés sont ensuite recrutés et transportés vers le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) *via* les protéines argonautes (AGO) entraînant la dégradation des ARNs messagers cibles, de séquence complémentaire des brins recrutés (Fire et al. 1998, Wang et al. 2010, Jeang 2012). Différents types de petits ARNs non codants ont été caractérisés chez différentes espèces, entre autre, les petits ARNs interférents (siRNA), les micros ARNs (miRNA) et les piRNAs (PIWI-interacting RNAs) (Kingsolver et al. 2013) (**Figure 11**). L'ARN interférence est décrit comme étant impliqué dans la réponse antivirale innée chez les vertébrés et les arthropodes. Les siRNAs sont générés à partir d'ARN double brin d'origine exogène comme les virus et la voie des siRNAs est reconnue comme étant un mécanisme de défense contre le virus à ARN et les virus à ADN (Deddouche et al. 2008, Jeang 2012). Les miRNAs ont été caractérisés comme intervenant lors d'infections virales, ils sont produits par l'hôte mais peuvent aussi être produits par les virus eux-mêmes (Piedade and Azevedo-Pereira 2016). Les virus peuvent (i) éviter les miRNAs de l'hôte ciblant les ARNs viraux (Cullen 2013) ; (ii) bloquer la voie de l'ARN interférence de l'hôte en interagissant avec des protéines clés (Lu and Cullen 2004) et (iii) synthétiser leurs propres miRNAs, particulièrement les virus de la famille des Herpesviridae (Grundhoff and Sullivan 2011, Kincaid and Sullivan 2012). Bien que différents miRNAs aient été identifiés chez l'huître creuse en réponse à différents stress osmotiques (Chen et al. 2017) ou bactériens (Zhou et al. 2014), leur rôle antiviral chez l'huître et les bivalves en général est à ce jour encore inconnu. Un seul article discute de la présence de miRNAs identifiés *in silico* chez la petoncle *Chlamys farreri* lors d'infections virales par le virus AVNV ayant potentiellement des rôles dans différents processus physiologiques et immunitaires (Chen et al. 2014). Ces travaux sont peut-être la preuve qu'il existe une réponse antivirale induite par la voie RNAi chez les bivalves. Des travaux réalisés *in silico* à partir de données génomiques ont permis d'identifier 100 potentiels miRNAs chez l'huître (Xu et al. 2014). De plus, le génome de l'huître a permis d'identifier différents éléments de la voie de l'ARN interférence comme Dicer (un seul orthologue), 4 protéines argonautes (2 AGO et 2 PIWI) ou encore une sous-unité du complexe RISC (TRBP), suggérant une potentielle implication de la voie de l'ARN interférence chez l'huître creuse (Green et al. 2015a, He et al. 2015, Rosani et al. 2016).

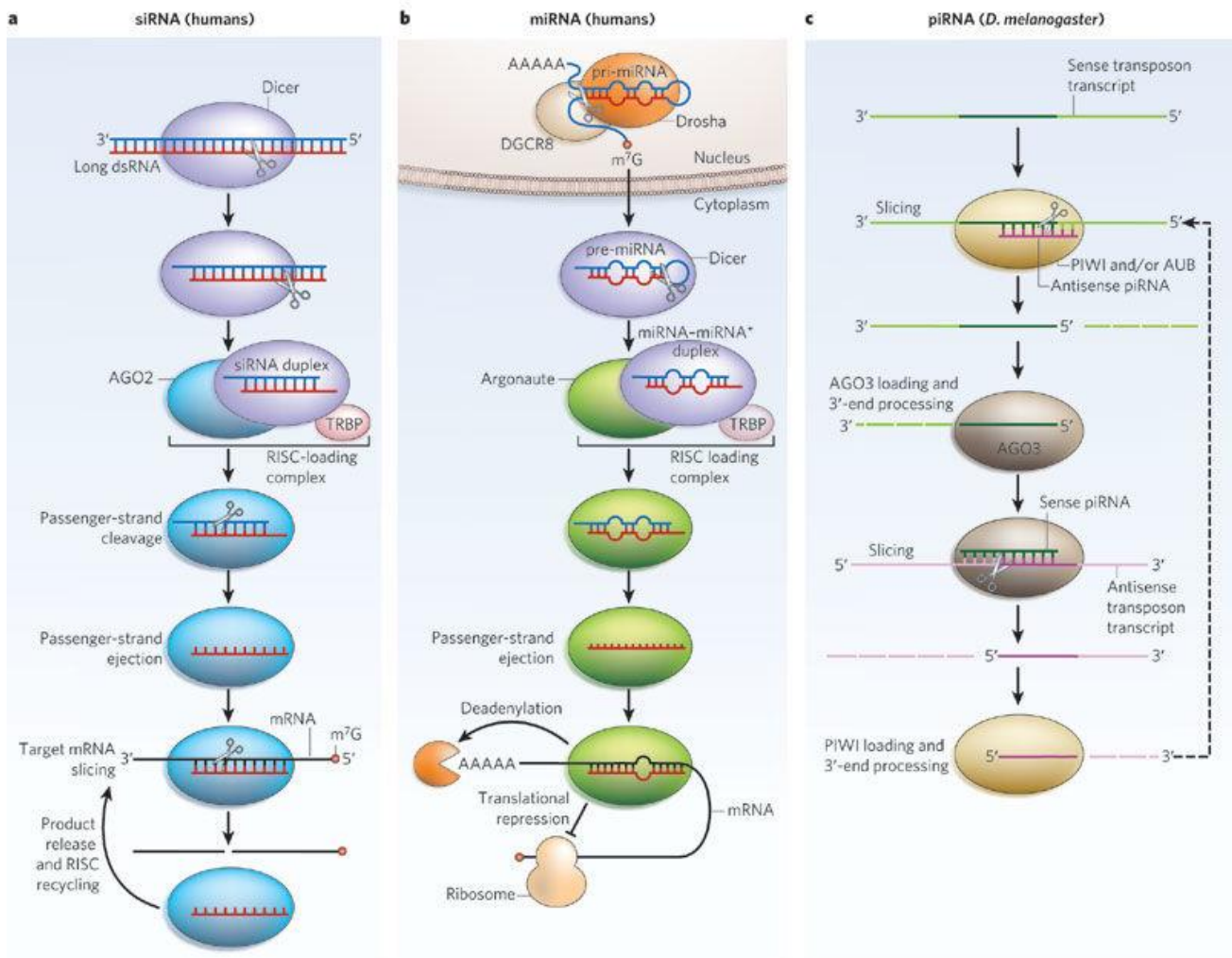


Figure 11 : Mécanismes de l'ARN interférence chez l'homme et la drosophile. (a) la voie des siRNA (chez l'homme), (b) la voie des miRNA (chez l'homme) et (c) la voie des piRNA (chez *Drosophila melanogaster*). Extrait de (Jinek and Doudna 2009).

3. Voies de mort cellulaire programmée

a) L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme cellulaire fondamental avec rôle physiologique contribuant à l'homéostasie de l'organisme (Conradt 2009), mais aussi un rôle dans le système immunitaire inné, empêchant notamment la réplication de virus et la libération de nouveaux virions (Nakanishi 2006). L'apoptose peut être activée par la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque. La voie extrinsèque est stimulée par des ligands de type cytokines sur des récepteurs de types « Tumor necrosis factor » (TNFR) ou au Fas-ligand (Ashkenazi 2002) permet l'activation de l'apoptose *via* des caspases. Cette activation peut être rétro-contrôlée *via* la voie NF- κ B. La voie intrinsèque fait intervenir la

mitochondrie *via* la libération du cytochrome c dans le cytosol. Cette libération est régulée par Bcl-2 entraînant la formation d'un complexe appelé apoptosome, activant des caspases, conduisant à l'apoptose (Kiss 2010, Galluzzi et al. 2012). Ces différentes voies peuvent être régulées par des protéines pro-apoptotiques mais aussi anti-apoptotiques. On retrouve chez l'huître un grand nombre de molécules pro-apoptotiques et un grand nombre de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou des protéines inhibitrices d'apoptose (IAP) (Zhang et al. 2011b, Qu et al. 2015). Des travaux en 2014 ont montré une augmentation de l'expression de Bcl-2 et d'IAP chez *C. gigas* lors d'infection à l'OsHV-1, suggérant que cette augmentation soit une réponse de l'hôte face au virus, entraînant une stimulation des processus d'apoptose (Jouaux et al. 2013, Green et al. 2014a, Segarra et al. 2014a). Chez les Alphaherpesviridae, différents gènes précoces de la réplication du virus sont capables d'activer l'apoptose pour des raisons encore peu décrites, tandis que d'autres gènes codant des inhibiteurs d'apoptose sont ensuite exprimés (Nguyen and Blaho 2009). Dans le génome de l'OsHV-1, 4 gènes codent des inhibiteurs d'apoptose, suggérant que ce mécanisme de mort cellulaire joue un rôle important parmi les défenses antivirales de *C. gigas* (Burioli et al. 2017). De plus, des travaux réalisés en 2014 ont montré que les adultes sont moins sensibles aux infections à l'OsHV-1 que les juvéniles, et qu'il sont capables d'inhiber la réplication virale (Segarra et al. 2014a). Ces informations ont été reliées à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes codant des IAP chez les huîtres infectées, suggérant le mécanisme d'apoptose comme un des facteurs impliqués dans la résistance des adultes (Green et al. 2014a, Segarra et al. 2014a).

b) L'autophagie

L'autophagie est un mécanisme de mort cellulaire lui aussi impliqué dans l'homéostasie cellulaire mais aussi dans l'immunité. Ce mécanisme va former un autophagosome ciblant les agents pathogènes intracellulaires et des protéines cytosoliques, puis par fusion avec un lysosome pour former un autolysosome et dégrader par réaction enzymatique le contenu (Deretic 2006). Chez les vertébrés, PKR, un ISG, peut déclencher ce mécanisme en réponse à une infection par un herpès virus à la suite de la reconnaissance d'ARNs doubles brins viraux (Richetta and Faure 2013). D'autres molécules comme les TLRs *via* leur ligand, MyD88 sont capables de stimuler l'autophagie en réponse à des virus (Richetta and Faure 2013). Chez l'huître *C. gigas*, l'autophagie semble être un mécanisme important lors d'infection avec le virus OsHV-1. Moreau et collaborateurs en 2015 ont identifiés la présence de gènes impliqués dans l'autophagie tels que les gènes ATG (Moreau et al. 2015b). De plus, ces auteurs ont montré par inhibition de l'autophagie une diminution du taux de survie d'huîtres infectées avec l'OsHV-1 et la bactérie *Vibrio aestuarianus* (Moreau et al. 2015b). Ces

résultats montrent l'existence fonctionnelle et suggèrent l'importance de l'autophagie dans les mécanismes immunitaires antibactériens et antiviraux chez l'huître.

4. Les effecteurs immunitaires

En plus des mécanismes à médiation cellulaire comme la phagocytose, l'apoptose ou l'autophagie, il existe une grande diversité de mécanismes permettant d'enrayer les infections microbiennes pathogéniques. La plupart de ces mécanismes a été identifiée chez l'huître lors d'infections bactériennes ou fongiques (Bachere et al. 2015).

a) Les protéines plasmatiques

Différentes protéines plasmatiques ont été identifiées chez *C. gigas*, notamment des Superoxydes dismutases extracellulaires (EcSODs) et la cavortin. Les SODs jouent un rôle important d'anti-oxidant par rapport aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), elles-même impliquées dans la lutte contre des agents pathogènes, mais causant aussi des dommages oxydatifs sur l'hôte (Cutler 1991). Parmi les SODs, un membre est capable de se lier au LPS et jouer un rôle d'opsonine et participer à la lutte contre *Vibrio splendidus* (Gonzalez et al. 2005, Duperthuy et al. 2011). Lors d'infections virales à l'OsHV-1, la surexpression de différents gènes codant des SOD a été identifiée (Normand et al. 2014b) mais aucune fonction antivirale directe n'a encore été associée. La cavortin quant à elle est une des protéines majeure de l'hémolymphe (Scotti et al. 2007). En 2014, Green et collaborateurs ont réalisé des tests d'activités antivirales sur l'herpès virus de type 1 dans des cultures cellulaires Vero, en utilisant la cavortin extraite chez l'huître creuse (Green et al. 2014b). Ces résultats ont montré que la cavortin avait un effet virucide direct.

b) Les protéines et peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (AMPs) sont des effecteurs immunitaires dont la fonction principale est microbicide ou bactériostatique. La caractérisation des peptides antimicrobiens est principalement abondante pour les fonctions bactéricides et bactériostatiques. Ils peuvent agir, en formant des pores sur la membrane bactérienne entraînant la lyse (Brogden 2005), empêcher les processus vitaux des bactéries comme la synthèse de protéines ou de composants de la paroi, mais aussi être recrutés par les phagocytes pour éliminer les agents pathogènes ((Bulet et al. 2004) pour revue). Chez l'huître creuse, différentes protéines et peptides ont été identifiés, participant à des mécanismes antimicrobiens dont leurs propriétés antivirales n'ont pas été recherchées et ne sont actuellement pas connues. Ces protéines et peptides peuvent être classés en 6 classes : les défensines, les Big-défensines, les peptides riches en proline (PRPs), les bactéricidal/permeability

increasing proteins (BPI), les ubiquitines et les molluscidines ((Bachere et al. 2015) pour revue). Des travaux récents ont identifié un peptide antimicrobien, la myticine C, chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, ayant une activité antivirale sur le virus OsHV-1 ainsi que 2 herpès virus humains (HSV-1 et 2) (Novoa et al. 2016). Ces travaux suggèrent que la synthèse de ce peptide dans l'hémolymphe des moules serait responsable de la protection de cette espèce face aux infections virales à l'OsHV-1 en milieu naturel.

IV. Une nouvelle vision de l'immunité innée

Les réponses immunitaires d'un hôte contre des microbes sont généralement catégorisées entre innées et adaptatives. Ces différences de réponse sont distinguées par les mécanismes de reconnaissance et les mécanismes déclenchés pour lutter contre le microbe (Dempsey et al. 2003). L'immunité adaptative a la capacité de « se souvenir » d'un agent pathogène déjà rencontré et de développer un phénomène de mémoire immunitaire, mais aussi de déclencher une réponse plus rapide et plus intense de manière extrêmement spécifique vis-à-vis de l'agent pathogène lors de cette deuxième rencontre (Litman et al. 2010). Cette mémoire immunitaire et cette spécificité de réponse procurent un avantage certain lors d'une seconde infection. L'immunité innée a longtemps été considérée comme étant non-spécifique, incapable de différencier des microbes très similaires et répondant de manière similaire lors d'infections répétées, c'est à dire dépourvue de capacité mémorielle (Medzhitov 2010). Les invertébrés étant connus pour posséder exclusivement un système immunitaire inné, dépourvus de cellules de type lymphocytaire et d'immunoglobulines, ont longtemps été jugés incapables de développer des mécanismes immunitaires spécifiques et mémoriels. Cependant, ces dernières années, une nouvelle vision de l'immunité innée a pu émerger sur la base de travaux portant sur les invertébrés et les vertébrés (Kurtz and Franz 2003, Schmid-Hempel 2005, McFall-Ngai et al. 2013, van der Meer et al. 2015).

A. Le priming immunitaire

Pour comprendre le priming immunitaire, il faut remonter à 1977 où des auteurs ont remarqué que plusieurs allogreffes successives sur du corail étaient rejetées de plus en plus rapidement, suggérant l'existence d'une forme de mémoire immunitaire (Hildemann et al. 1977). En 2003, des auteurs ont infectés des copépodes *Macrocyclops albidus* avec une lignée « frère-sœur » de leur parasite naturel *Schistocephalus solidus* puis les ont réinfectés 4 jours plus tard avec cette même lignée (homologue) ou avec une autre lignée (hétérologue). Les résultats ont montré une diminution plus importante du succès de réinfection lors de la seconde exposition avec la lignée homologue par rapport à la lignée hétérologue, introduisant la notion de mémoire immunitaire et de spécificité chez un invertébré (Kurtz and Franz 2003). Ces travaux introduisent pour la première fois la notion de mémoire immunitaire et de spécificité chez un organisme invertébré.

Chez les plantes, la protection contre les agents pathogènes est caractérisée par une combinaison de mécanismes de résistance constitutive et de résistance acquise appelée « résistance systémique acquise » (Dangl and Jones 2001). L'infection de plantes par différents types d'agents

pathogènes à virulence atténuée entraîne une protection lors d'une seconde infection avec ce même agent pathogène, incluant une grande diversité d'agents pathogènes (virus, bactéries, champignons) (pour revue, voir (Durrant and Dong 2004)). Ces informations suggèrent l'existence d'une forme de mémoire immunitaire chez les plantes.

Chez les vertébrés, des travaux réalisés à partir de souris Rag1^{-/-} (déficientes en lymphocytes B et T fonctionnels), stimulées avec une dose non-létale de *Candida albicans* puis réinfectées 7 jours plus tard avec la même souche pathogène, ont montré une amélioration du taux de survie par rapport à des souris non stimulées (Quintin et al. 2012a). Ces observations sont associées à une reprogrammation fonctionnelle des monocytes impliquant notamment des mécanismes épigénétiques et montrent une forme de mémoire immunitaire non reliée au système classique de l'immunité adaptative des vertébrés (Quintin et al. 2012b). D'autres types cellulaires associés au système immunitaire inné, les « Natural Killer » ou NK ont montré des capacités de mémoire immunitaire lors d'infection par un cytomégalo virus murin (MCMV) (Sun et al. 2009). L'ensemble de ces observations a été regroupé sous le terme d'« immunité entraînée » ou « trained immunity » (Netea et al. 2011).

Depuis, différentes formes de mémoire immunitaire ont été mises en évidence chez les plantes, les vertébrés et les invertébrés, associées au système immunitaire inné ((Kurtz 2004, Netea et al. 2011, Conrath et al. 2015, Milutinović and Kurtz 2016) pour revue). Cependant l'interprétation de ces phénomènes est complexe. En particulier, il n'existe pas de distinction claire entre l'observation d'une réponse « maintenue » après une infection et celle d'une véritable mémoire immunitaire (se traduisant en partie par un retour à un niveau de réponse basal avant une nouvelle activation de la réponse immune). Des auteurs proposent de séparer la définition de la mémoire immunitaire des mécanismes de cette mémoire (Kurtz 2005). A l'heure actuelle, la terminologie de ces observations et des mécanismes est au cœur des débats scientifiques. Ne pouvant associer ces mécanismes à l'immunité adaptative des vertébrés, ces mécanismes ont été associés au terme de « priming immunitaire » (« immune priming ») chez les invertébrés (Little and Kraaijeveld 2004) ou d'« immunité entraînée » (« trained immunity ») chez les vertébrés (Netea et al. 2011). De manière plus générale, ces mécanismes sont associés à une mémoire immunitaire innée pouvant être définie comme la capacité d'un organisme à stocker ou à utiliser l'information d'une première rencontre avec un antigène ou un agent microbien ou parasitaire, afin d'avoir une réponse immunitaire améliorée lors d'une seconde rencontre (Kurtz 2005).

B. Le priming immunitaire chez les invertébrés

1. Le priming à l'échelle intra-individuelle

Depuis les travaux de Kurtz et ses collaborateurs en 2003 (Kurtz and Franz 2003), de nombreux travaux se sont intéressés au phénomène de priming immunitaire chez les invertébrés. A l'heure actuelle, de plus en plus d'observations de l'existence du priming immunitaire et de mémoire immunitaire émergent dans la littérature, chez différents phylla (échinodermes, céphalocordés, nématodes, annélides, cnidaires, cténophores, éponges, mollusques et arthropodes (voir (Milutinović and Kurtz 2016) pour revue). Les études se focalisent principalement chez les arthropodes, sur des organismes modèles et non modèles. Chez le ver de farine *Tenebrio molitor*, une injection de LPS entraîne une réponse immunitaire maintenue permettant de protéger la larve d'une infection avec un champignon pathogène *Metarhizium anisopliae* 4 jours après la stimulation (Moret and Siva-Jothy 2003). Chez le bourdon *Bombus terrestris*, une injection de bactéries (*Pseudomonas fluorescens*, *paenibacillus alvei* ou *paenibacillus larvae*) puis une infection avec ces mêmes bactéries entraîne une protection non spécifique (contre l'ensemble des bactéries utilisées) si les infections sont réalisées 8 jours après la primo-stimulation, mais une protection spécifique (uniquement la même bactérie) si les infections sont réalisées 22 jours après la primo-stimulation (Sadd and Schmid-Hempel 2006). Chez l'isopode *Porcelio scaber*, une injection de bactéries tuées augmente les capacités de phagocytose de cellules immunitaires *in vitro* (Roth and Kurtz 2009). Chez les crevettes *Penaeus monodon*, *Fenneropanaeus indicus*, *Litopenaeus vannamei* *Penaeus chinensis* ou *Panaeus japonicus* différents travaux se sont intéressés à la stimulation de la réponse immunitaire dans un objectif de « vaccination » pour lutter contre les maladies causées par le « white spot syndrome virus » (WSSV). Pour stimuler les crevettes, différents stimulants ont été utilisés, des virus inactivés (Namikoshi et al. 2004, Singh et al. 2005), des protéines recombinantes de virus (Witteveldt et al. 2004), des séquences d'ADN de protéines d'enveloppe virale VP28 (Li et al. 2010) ou des ARNs doubles brins (Robalino et al. 2004, Kim et al. 2007) impliquant notamment la voie ARN interférence (Labreuche et al. 2010). Ces différents stimulants permettent d'induire une réponse antivirale et d'améliorer le taux de survie lors d'infections avec le WSSV. Chez les mollusques, le priming immunitaire est très peu étudié comparé aux arthropodes. Les premiers travaux ont été réalisés chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata*, hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*, un trématode parasite. Des auteurs ont montré une diminution du taux de ré-infestation lors d'une seconde infection avec ce trématode réalisée à partir de 10 jours après la première rencontre (Sire et al. 1998) ; mais aussi une spécificité de réponse directement reliée au génotype et à la souche du parasite ré-infestant (Portela et al. 2013). Les auteurs concluent que la spécificité de ce priming immunitaire était dépendante de

la distance génétique entre le parasite utilisé pour la première infestation et celui utilisé pour la seconde infestation, illustrant un priming immunitaire génotype dépendant chez *B. glabrata*. D'autres travaux ont été réalisés chez les bivalves et ont rapporté un phénomène de priming immunitaire, chez le pétoncle *Chlamys farreri* montrant une amélioration du taux de survie lors d'une infection avec *Vibrio anguillarum* chez des pétoncles stimulés avec cette même bactérie tuée à la chaleur 7 jours avant l'infection (Wang et al. 2013). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, 3 études ont montré lors de stimulations des huîtres avec des bactéries *Vibrio splendidus* tuées à la chaleur puis une seconde infection avec la bactérie virulente : une augmentation du nombre total d'hémocytes (suggérant une stimulation de l'hématopoïèse) et du taux de phagocytose (Zhang et al. 2014, Li et al. 2017a) ; une implication de EcSOD dans le mécanisme du priming antibactérien (Liu et al. 2016), mais ces résultats restent à être confirmés. En effet, ces différents travaux n'associent jamais le priming à une amélioration du taux de survie, uniquement à une observation de mécanismes de réponses modulées au cours de la primo-stimulation et de la seconde infection. Des travaux ont été initiés au laboratoire d'accueil de cette thèse et ont montré que l'injection de poly(I:C) à des juvéniles d'huîtres permettait d'entraîner une réponse immunitaire améliorée lors d'infection par le virus OshV-1, entraînant une augmentation de l'expression de gènes antiviraux et une diminution de la charge virale (Green and Montagnani 2013). En revanche, des huîtres stimulées avec des bactéries inactivées présentaient des charges virales similaires aux individus non stimulés. Ce résultat montre pour la première fois, qu'il est possible d'induire un état antiviral chez l'huître, capable de les protéger d'un virus pathogène de façon spécifique. Cependant, les différentes études du priming immunitaire se sont principalement focalisées sur les modèles arthropodes et les agents pathogènes les plus étudiés restent aujourd'hui les bactéries et les parasites. A ce jour, très peu d'études s'intéressent au priming immunitaire antiviral.

Par ailleurs, sans remettre en cause l'existence du priming immunitaire chez certaines espèces, le phénomène de priming n'a pas pu être mis en évidence. On peut citer le cas de la fourmi *Formica selysi* dont une première stimulation avec le champignon *Beauveria bassiana* ne protège pas d'une seconde infection (Reber and Chapuisat 2012). Chez la drosophile, une primo stimulation avec un virus à ARN (Drosophila C virus) ne permet pas de protéger d'une seconde infection (Longdon et al. 2013).

2. Le priming à l'échelle inter-individuelle

Une autre composante du priming immunitaire a été suggérée, liée au mode de vie des invertébrés, « l'immunité sociale ». Cette composante est un aspect écologique très important particulièrement chez les hyménoptères (insectes sociaux), notamment si on considère une colonie

comme un « super-organisme ». Différents travaux ont été réalisés dans des interactions termites-champignons (Traniello et al. 2002), fourmis-bactéries (Hamilton et al. 2011) et fourmis-champignons (Konrad et al. 2012). La fourmi *Camponotus pennsylvanicus* possède deux estomacs. Un estomac servant à la digestion pour la fourmi et un second estomac dit « social » servant à pré-digérer le bol alimentaire et à régurgiter les aliments pour nourrir les autres insectes de la colonie (trophallaxie). Les travaux d'Hamilton et collaborateurs ont montré que ce bol alimentaire pouvait contenir des bactéries ayant été rencontrées hors de la colonie, pouvaient alors s'échanger entre les individus au sein de la colonie et ainsi stimuler l'immunité des congénères (Hamilton et al. 2011). Par ailleurs, et particulièrement dans le cas d'insectes sociaux dont généralement une seule mère engendre une descendance nombreuse, le transfert d'immunité d'une génération à l'autre peut se révéler un facteur avantageux dans la survie de la colonie. Ces travaux pourraient montrer une forme de priming immunitaire en prenant en compte la colonie comme un super organisme (Cremer and Sixt 2009).

De plus en plus de travaux ont montré un transfert d'immunité vertical, des parents vers la descendance, à partir de parents ayant été exposés à différents agents pathogènes ou stimuli. On parle alors de priming immunitaire trans-générationnel (Sadd et al. 2005, Moret 2006). Ce phénomène a été observé chez différentes espèces d'arthropodes en interaction avec une grande variété de microbes et de parasites (Huang and Song 1999, Little et al. 2003, Sadd et al. 2005, Moret 2006, Sadd and Schmid-Hempel 2007, Tidbury et al. 2011, Zanchi et al. 2012, Tate et al. 2017). Ce priming immunitaire trans-générationnel peut être d'origine maternelle ou paternelle et suivant les espèces, et peut protéger tous les stades de développement (Roth et al. 2010, Zanchi et al. 2011). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, une stimulation des géniteurs par un ARN double brin synthétique, le poly(I:C), entraînant une amélioration du taux de survie des larves au cours d'infection par le virus OsHV-1 (Green et al. 2016a) suggère l'existence de priming trans-générationnel pour cette espèce.

3. Mécanismes du priming immunitaire

Malgré une augmentation de l'observation de phénomènes de mémoire immunitaire et de spécificité, beaucoup de travaux se cantonnent à des descriptions phénoménologiques et les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus. Cependant, quelques études ont apporté des pistes sur les mécanismes du priming immunitaire. Chez les vertébrés, des travaux *in vitro* ont montré que l'immunité entraînée, induite par *Candida albicans*, ou β -glucane, était liée à un récepteur du β -glucane qui par stimulation de différentes voies de signalisation entraînait la reprogrammation des monocytes. Cette reprogrammation est associée à des changements

épigénétiques, en particulier des tri-méthylation des histones H3K4 sur les promoteurs des gènes TNF α et IL6 (Quintin et al. 2012a, Quintin et al. 2012b, van der Meer et al. 2015, Netea and van der Meer 2017). Cette même étude a montré que le traitement des monocytes par le β -glucane entraînait une augmentation du niveau d'expression et la phosphorylation de la kinase « Mitogen-activated protein kinase » (MPK), appelée p38 *via* l'activation d'un TLR et d'une augmentation de l'expression de PRR (Quintin et al. 2012a) (**Figure 12**). La reprogrammation épigénétique semble être un des mécanismes essentiels à l'immunité entraînée chez les vertébrés (Saeed et al. 2014). Chez les plantes, des mécanismes similaires ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, *via* la stimulation par la benzothiadiazole (capable d'activer la réponse systémique acquise (SAR)). Les auteurs ont identifié une augmentation de l'activité transcriptionnelle de MPK3 et 6, de différents PRR ainsi que des changements épigénétiques, notamment des tri-méthylations des histones H3K4 (Conrath et al. 2015) (**Figure 12**). Ces résultats semblent indiquer une conservation ou une convergence dans l'évolution de la mémoire immunitaire innée chez les plantes et les vertébrés (Conrath et al. 2015).

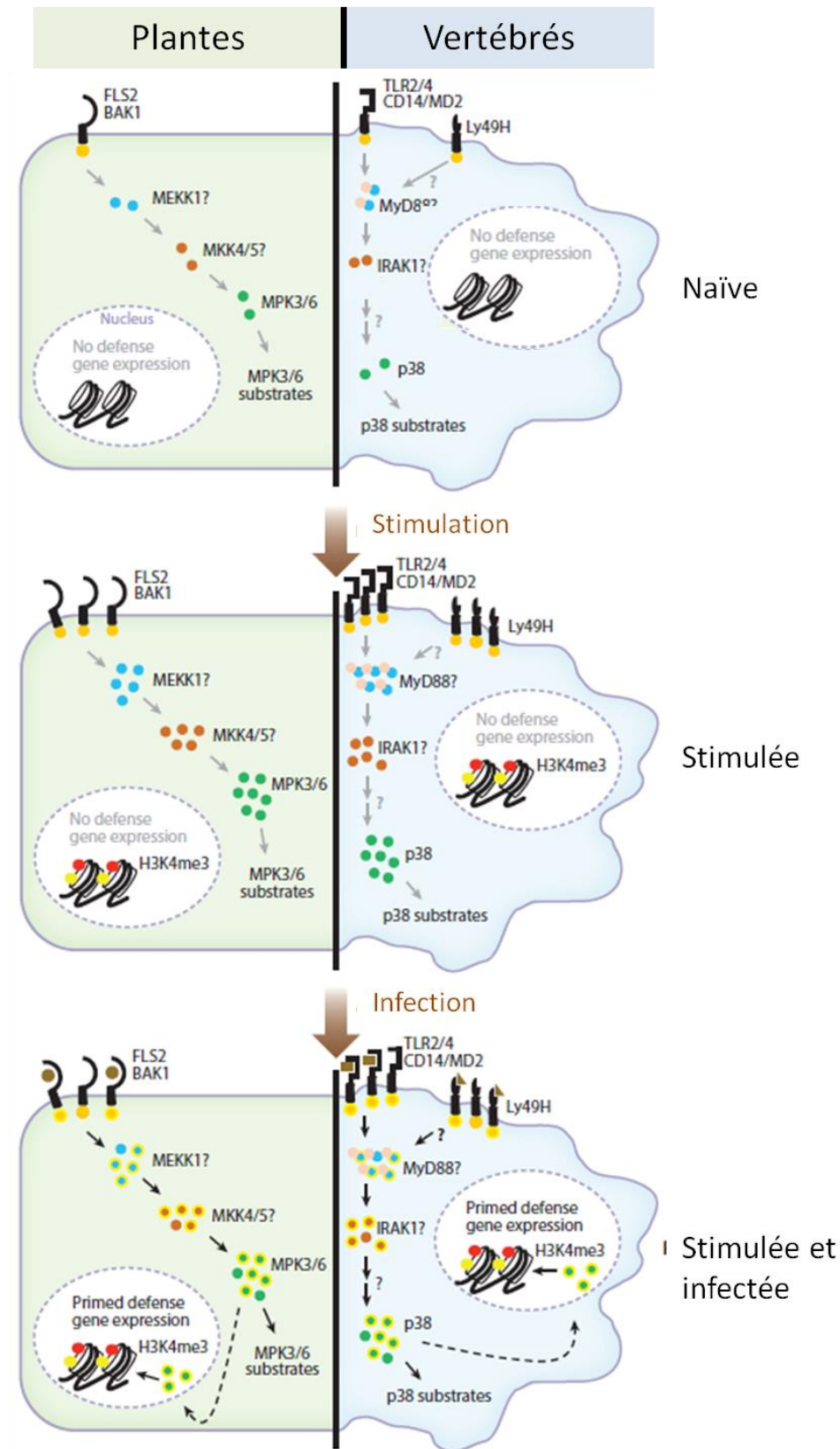


Figure 12: Schéma résumé des mécanismes moléculaires immunitaires de défense lors de priming immunitaire chez les plantes (vert) et chez un monocyte de mammifère (bleu), chez des cellules naïves, après stimulation ou infection chez ces cellules stimulées. (extrait de (Conrath et al. 2015)).

Chez les invertébrés, les mécanismes du priming immunitaire sont encore méconnus. Quelques travaux principalement réalisés chez la drosophile ont permis de suggérer des mécanismes sous-jacents au phénomène de priming immunitaire. De manière générale, 3 types de scénarios peuvent soutenir les observations d'amélioration de réponse immunitaire lors d'une seconde infection (Coustau et al. 2016) (**Figure 13**):

- (A) une réponse maintenue (« sustained response ») consistant à une sur-expression de molécules immunitaires suite à la première infection pendant une longue période
- (B) une réponse rappelée (« recalled response »), consistant à stocker l'information se traduisant par un retour d'expression à un niveau basal suite à la première infection, puis une réponse plus rapide et plus intense lors de la seconde infection
- (C) un shift immunitaire (« immune shift ») avec des effecteurs immunitaires différents entre la première et la seconde infection

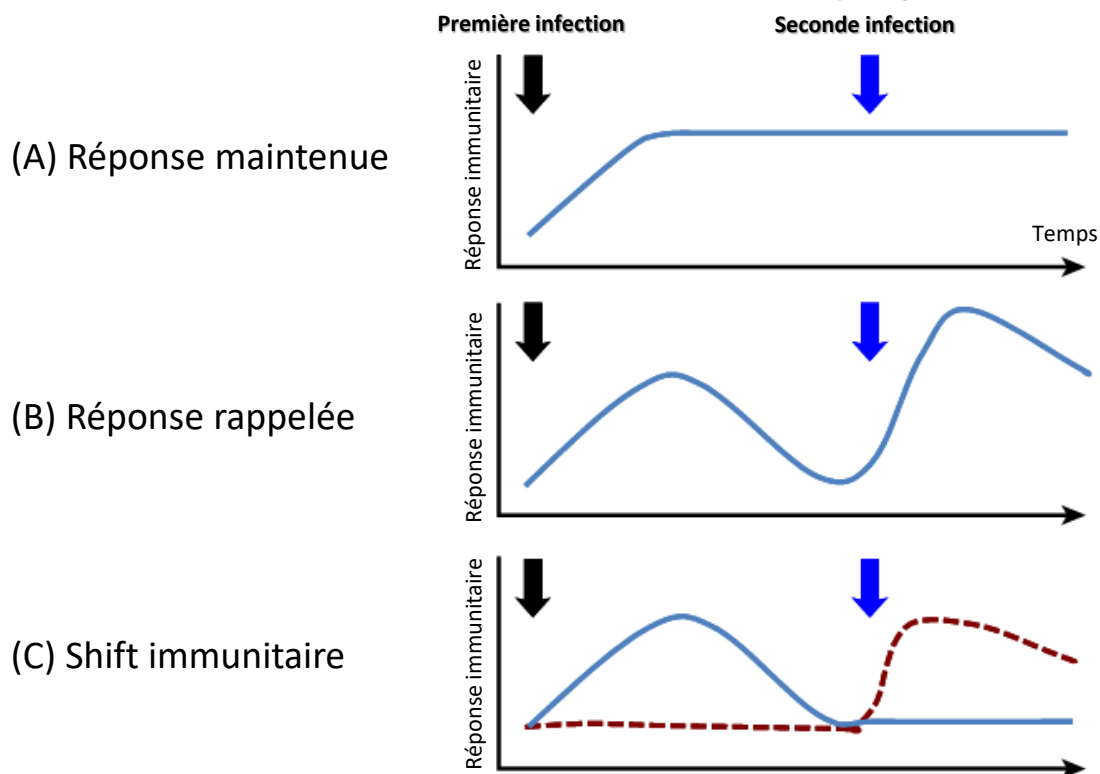


Figure 13: Modèle de réponse immunitaire innée chez les invertébrés, lors d'une première infection (flèche noire) puis d'une seconde infection (flèche bleue). (A) une réponse immunitaire maintenue sur une longue durée permettant une protection, (B) une réponse immunitaire rappelée plus rapidement et plus intensément lors de la seconde infection et (C) un shift immunitaire avec des effecteurs immunitaires différents entre la première et la seconde infection. (extrait de (Coustau et al. 2016)).

Le premier de ces scénarios consiste en une activation sur le long terme d'effecteurs immunitaires permettant une meilleure défense lors d'une seconde infection. Le second correspond à une réponse immunitaire qui s'estompe avec le temps mais qui est activée plus rapidement et plus intensément lors de la seconde infection. Ces différentes hypothèses reposent sur des mécanismes différents, la première consistant en une réponse maintenue et une activation continue tandis que la seconde repose sur un stockage de l'information impliquant une forme de mémoire immunitaire. Des auteurs suggèrent qu'en réalité ce soit une combinaison de ces scénarios qui soit à la base des mécanismes de priming immunitaire chez les invertébrés (Milutinovic et al. 2016).

Parmi ces mécanismes il est à noter une diversification des récepteurs. Les invertébrés n'ont pas de cellules lymphocytaires comme les vertébrés, mais des récepteurs extrêmement diversifiés ont été identifiés. C'est le cas des « Down syndrome cell adhesion molecule » (Dscam) (**Figure 14**), dont l'épissage alternatif résulte en plusieurs milliers d'isoformes (Watson et al. 2005) pouvant être relié à une forme de spécificité de réponse ou un rôle d'opsonine chez la drosophile pouvant alors peut-être jouer un rôle dans le priming immunitaire (Dong et al. 2006, Kurtz and Armitage 2006, Dong et al. 2012). Ce rôle joué par une diversification de récepteurs est aussi au cœur des débats chez le gastéropode *Biomphalaria glabrata* dont la diversification des FREPs (Zhang and Loker 2003) semble être impliquée dans la mémoire immunitaire et la spécificité de réponse face à *Schistosoma mansoni* (Mone et al. 2010, Pinaud et al. 2016). Chez *Chlamys farreri*, des auteurs ont montré une augmentation transcriptomique de l'expression de lectines de type C en réponse à un priming par un vibrio (Wang et al. 2013a). La présence dans le génome de l'huître *C. gigas* d'une grande diversité de récepteurs immunitaires et d'une expansion massive de récepteurs (Zhang et al. 2012, Zhang et al. 2015), pourraient être impliqués dans les mécanismes de mémoire immunitaire et de spécificité de réponse.

Par ailleurs, de plus en plus de travaux suggèrent que la phagocytose joue un rôle important dans le priming immunitaire, notamment en termes de spécificité (**Figure 14**). Les travaux de Pham et collaborateurs en 2007 ont montré que le priming immunitaire antibactérien avec *Staphylococcus pneumoniae* est dépendant de la phagocytose (Pham et al. 2007). La stimulation avec cette bactérie tuée à la chaleur protégeait la drosophile contre une seconde infection homologue avec une dose sub-létale mais ne protégeait pas d'une infection hétérologue (Pham et al. 2007). Ces auteurs ont montré qu'en bloquant la phagocytose, la spécificité de réponse était perdue. Ces travaux suggèrent une sécrétion de PRR par les hémocytes ou une augmentation de l'expression de ces PRR directement chez les hémocytes permettant de reconnaître spécifiquement les agents pathogènes lors d'une seconde infection. D'autres travaux ont suggéré le rôle de la phagocytose dans le priming immunitaire, notamment chez *Porcelio scaber* dont une seconde infection homologue augmentait

l'activité de phagocytose (Roth and Kurtz 2009). Chez l'huître, des travaux réalisés lors de priming bactériens avec *Vibrio splendidus* ont aussi montré une augmentation de l'activité de phagocytose lors d'une seconde infection homologue et ont permis de faire l'hypothèse d'un rôle de la phagocytose et de superoxyde dismutase extracellulaire dans les mécanismes de priming (Zhang et al. 2014, Liu et al. 2016, Li et al. 2017a). D'autres mécanismes à médiation cellulaire ont été suggérés comme participant aux mécanismes de mémoire immunitaire et de spécificité de réponse au cours du priming immunitaire, comme l'encapsulation (Roth et al. 2010) ou des différenciations ou proliférations hémocytaires chez la drosophile (Rodrigues et al. 2010). En 2015, Futo et collaborateurs ont montré la dépendance du microbiote dans l'induction du priming immunitaire chez *Tribolium castaneum* face à *Bacillus thuringiensis* (Futo et al. 2015). D'autres travaux réalisés chez la drosophile ont montré un rôle important du microbiote dans le priming immunitaire antiviral. Le microbiote stimule la régulation de différentes voies immunitaires comme les voies ERK et NF- κ B, impliquées dans ce phénomène de priming antiviral (Sansone et al. 2015).

D'autres travaux ont suggérés l'implication de protéines et peptides antimicrobiens dans le phénomène de priming immunitaire (**Figure 14**), particulièrement chez les insectes (Dubuffet et al. 2015). Différents travaux ont montré que la persistance de peptides antimicrobiens dans l'hémolymphe d'insectes pour des durées pouvant aller jusqu'à 28 jours (Haine et al. 2008) pouvait participer à la protection sur le long terme jouant un rôle prophylactique (Moret and Siva-Jothy 2003). Cependant, les peptides antimicrobiens ne sont souvent qu'à large spectre et peu spécifiques. Leur rôle de ce maintien dans le temps et la spécificité de réponse reste encore à être identifié.

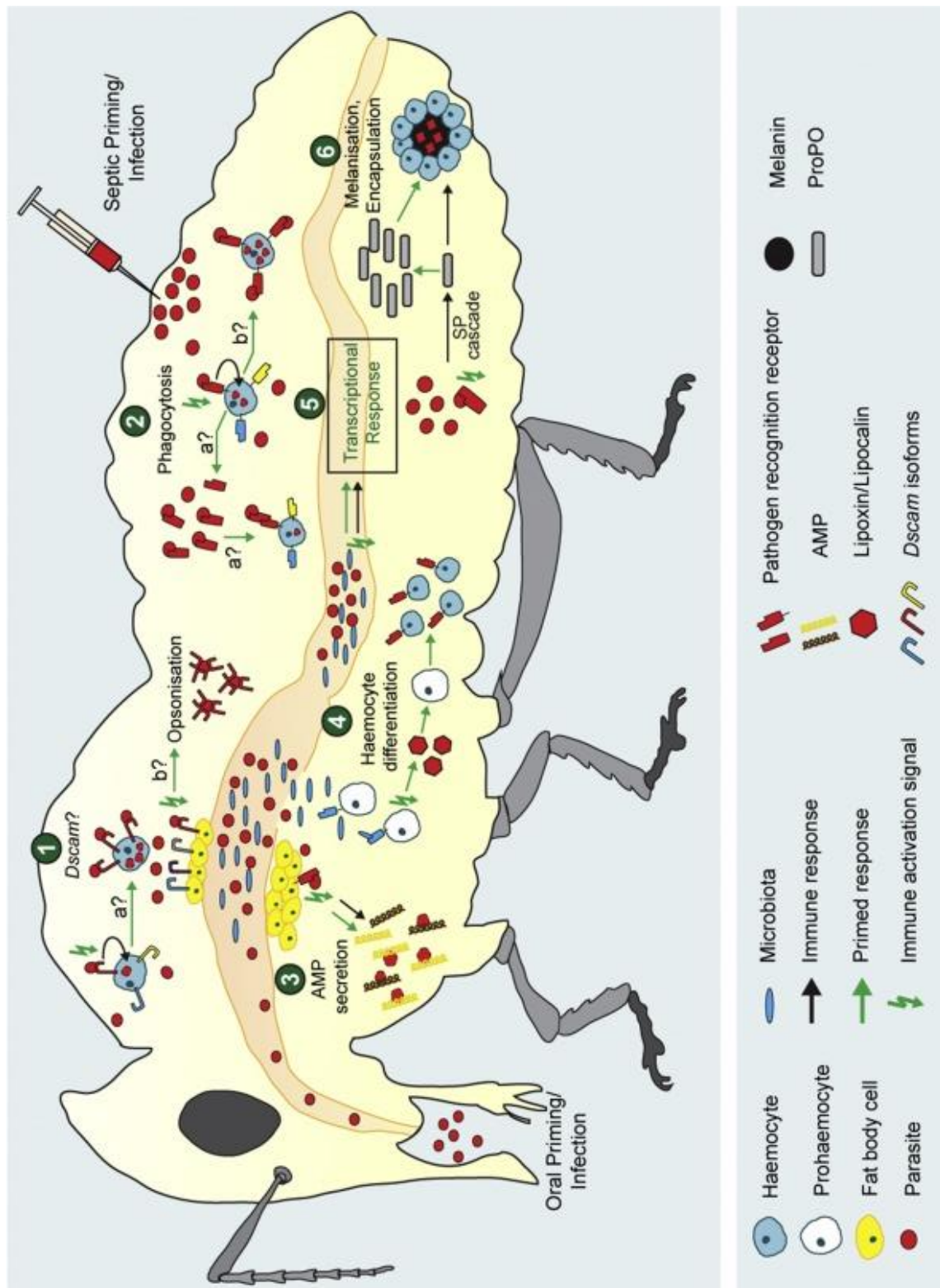


Figure 14 : Mécanismes potentiellement impliqués dans le phénomène de priming immunitaire chez les arthropodes. Extrait de (Milutinovic et al. 2016).

Enfin, Hauton et collaborateurs titraient : « une immunité adaptative chez les invertébrés : une maison de paille sans fondations mécanistiques » (Hauton and Smith 2007). Ils relèvent bien ici la question au cœur des débats scientifiques, la mémoire immunitaire innée ne sera acceptée que lorsque des mécanismes seront clairement identifiés. Il est donc nécessaire de bien décrire les phénotypes du priming, pour ensuite pouvoir identifier les mécanismes moléculaires du priming immunitaire dont les approches globales peuvent permettre de comprendre l'ensemble de la mécanistique. A ce jour, seulement quelques études se sont intéressées à une approche génomique globale pour explorer les mécanismes du priming immunitaire (Barribeau et al. 2016, Pinaud et al. 2016).

Chapitre 1 :

Caractérisation du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*



Chapitre 1 :

Caractérisation du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

I. Introduction

Cette première partie des résultats de cette thèse est consacrée à l'identification et à la description phénoménologique du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* au cours d'infections virales par le virus OsHV-1.

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont mis en évidence que l'injection de l'ARN double brin synthétique, le poly(I:C), permettait d'induire une réponse antivirale efficace lors d'infections avec le virus OsHV-1 (Green and Montagnani 2013). Cette injection de poly(I:C) était associée à une charge virale très faible comparée aux animaux non stimulés et différents gènes immunitaires antiviraux étaient régulés en réponse au poly(I:C). Par ailleurs, une stimulation des huîtres par la bactérie *Vibrio tasmaniensis* LGP32 tuée n'entraînait pas d'effet antiviral sur la charge virale lors d'infections à l'OsHV-1. Notre hypothèse est donc qu'il existe une forme de priming immunitaire antiviral chez l'huître, puisque une forme de mémoire immunitaire *a priori* spécifique semble émerger des résultats de ces travaux. Ces résultats soulèvent donc différentes questions, à savoir : (i) Le poly(I:C) protège-t-il des mortalités virales ? (ii) Est-ce que cette protection est spécifiquement induite par le poly(I:C) ? (iii) Est-ce que le poly(I:C) protège uniquement du virus OsHV-1 ? (iv) Le poly(I:C) est-il efficace pour protéger les huîtres pendant un épisode de surmortalité massive affectant les juvéniles ? (v) Quelle est la durée de la protection induite par le poly(I:C) ? Pour répondre à ces questions, nous avons choisi une approche phénoménologique permettant de pouvoir caractériser le priming immunitaire chez l'huître et définir un modèle expérimental poly(I:C)/huître.

L'ensemble des travaux réalisés pour répondre à ces questions sont présentés dans l'article 1 (**Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Scientific report, under second review**).

II. Article 1 : “Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*”

Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Maxime Lafont^{1,2}, Bruno Petton³, Agnès Vergnes¹, Marianna Pauletto⁴, Amélie Segarra⁵, Benjamin Gourbal², and Caroline Montagnani^{1*}

¹ Ifremer, IHPE, UMR 5244, Univ. Perpignan Via Domitia, CNRS, Univ. Montpellier, F-34095, Montpellier, France

² Univ. Perpignan Via Domitia, IHPE UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

³ Ifremer, LEMAR UMR6539, F-29840 Argenton-en-Landunvez, France

⁴ Department of Comparative Biomedicine and Food Science. University of Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

⁵ Univ. Brest Occidentale, LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, F-29280, Plouzané, France

*Corresponding author- cmontagn@ifremer.fr

ABSTRACT

In the last decade, a paradigm shift has emerged in comparative immunology. Invertebrates can no longer be considered to be devoid of specific recognition and immune memory. However, we still lack a comprehensive view of these phenomena and their molecular mechanisms across phyla, especially in terms of duration, specificity, and efficiency in a natural context. In this study, we focused on a Lophotrochozoan/virus interaction, as antiviral priming is mostly overlooked in molluscs. Juvenile *Crassostrea gigas* oysters experience reoccurring mass mortalities events from Ostreid herpes virus 1 with no existing therapeutic treatment. Our results showed that various nucleic acid injections can prime oysters to trigger an antiviral state ultimately protecting them against a subsequent viral infection. Focusing on poly(I:C) as elicitor, we evidenced that it protected from an environmental infection, by mitigating viral replication. That protection seemed to induce a specific antiviral response as poly(I:C) fails to protect against a pathogenic bacteria. Finally, we showed that this phenomenon was long-lasting, persisting for at least 5 months thus suggesting for the first time the existence of innate immune memory in this

invertebrate species. This study strengthens the emerging hypotheses about the broad conservation of innate immune priming and memory mechanisms in Lophotrochozoans.

Introduction

In the last decade, a radical paradigm shift has emerged in immunity. It is now clear that the innate immune system is capable to provide forms of immune memory as demonstrated by the compelling studies emerging on invertebrates, plants, vertebrates, and even bacteria¹. These studies have shown in a wide range of organisms lacking conventional adaptive immune responses that they can adapt upon primary exposure and are capable to implement an improved immune response upon secondary exposure to a parasite (including macro- and micro-parasites as bacteria and viruses)²⁻⁸. In vertebrates, seminal papers from Netea *et al.* showed that cells of the innate immune system can also build immunological memory notably *via* epigenetic reprogramming allowing for enhanced non-specific inflammatory responses upon secondary challenges⁹. Since these processes rely on different molecular mechanisms than those of adaptive immunity (Ig- and lymphocyte-mediated), they have been designated as immune priming or innate immune memory in invertebrates, and trained immunity in vertebrates¹⁰. Those data have blurred the boundaries between adaptive and innate immune responses that have even been described as a continuum of host defences and they currently challenge the commonly accepted dogmas in immunity. Since this field of research is still in its infancy, it is very delicate to come up with a universal description of innate immune priming. The broadest definition of these processes would be the ability to store or re-use the information on a previously encountered non-self antigen or parasite, to induce enhanced resistance or tolerance (in terms of immune response, parasite elimination and host survival capacities) upon secondary exposure.

Studies testing this phenomenon in invertebrates appear to be quite heterogeneous and largely differ in terms of experimental design, host-parasite combinations, elicitors used for priming (pathogenic *versus* inactivated pathogens or non-infectious agents), time span between priming and challenge, route of priming (oral *versus* injection) and the degree of the demonstrated specificity of the primed response^{11,12}. Moreover this improved protection has been observed either within the same developmental stage (within generation immune priming), across life stages (ontogenic immune priming), or across generations (transgenerational immune priming). Regarding the time span between priming and challenge, it can extend for weeks, sometimes for almost the lifetime of the organism (from larval stage to adult), but it remains in most cases rather short and does not extend over 3 months¹¹. However, those studies have mainly focused on arthropods regarding bacteria and macro-parasite interactions. To date, antiviral immune priming has been explored in a handful studies on *Caenorhabditis elegans* and insects^{13,14}. Most studies were focusing on crustaceans where several studies reported the potential development of vaccines to combat a major viral pathogen (the white spot syndrome virus, see¹⁵ for review). Hence available evidence for innate immune priming is still fragmentary and we still lack a complete view of this phenomenon across phyla especially in terms of duration and specificity, and efficiency in a natural context and underlying molecular mechanisms.

In Lophotrochozoans, studies conducted over the last ten years on the gastropod *Biomphalaria glabrata* has provided compelling evidence of innate immune memory against the parasite *Schistosoma mansoni*. *B. glabrata* is able to mount a highly specific, inducible and time-dependent protection against different species or strains of *Schistosoma* in a genotype-dependant manner^{7,16}. Immune priming seems to be supported by snail humoral factors that lead to the degeneration and death of the parasite⁷ following a shift from cellular to humoral response upon secondary infection¹⁷. In the present study, we focused on a marine bivalve mollusc, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (now termed *Magallana gigas*, Thunberg, 1793)¹⁸. *C. gigas* is the main aquaculture animal species produced in the world, exploited in more than 27 countries (FAO Fisheries & aquaculture). But this species has been subjected to recurrent mortality events plaguing oyster production worldwide. Since 2008, a pathogen has been strongly associated to mortality events impacting juvenile oysters, the herpes-like virus OsHV-1 μ var (Ostreid herpes virus 1) that can induce a 100% mortality rate¹⁹⁻²¹. In bivalves information are still scarce and to date only a few studies have investigated innate immune

priming mechanisms. In the scallop *Chlamys farreri*, authors showed an improved immune response and survival to the bacterium *Vibrio anguillarum* following previous exposure to the same pathogen. In *C. gigas*, septic immune priming with heat killed *Vibrio splendidus* conferred enhanced phagocytic responses and haematopoiesis upon re-infection with the same pathogen^{22,23}. In a previous work, we developed a model system for oyster/virus interaction using a non-infectious elicitor, the viral mimic synthetic double stranded RNA (dsRNA) called poly(I:C). Poly(I:C) has been known to be a key signature of viral infection and widely used as a viral mimic in vertebrates and has been used in fish models to enhance antiviral defenses²⁴⁻²⁷. As a non-hazardous synthetic compound, it also ensures good reproducibility between experiments and safety. Importantly, dsRNA is also produced by DNA viruses such as herpes viruses, likely due to overlapping converging transcription of viral genes²⁸. Recent data also tested the impact of prior injection of dsRNA on viral protection²⁹. These studies showed that short-term priming with poly(I:C) and dsRNA injections were able to develop an antiviral state mitigating the viral loads in oysters upon subsequent viral challenge and inducing genes from an IFN-like pathway²⁹⁻³¹. Recent data also suggested that this effect could be maintained across generations³².

These researches have opened up new perspectives to explore immune defenses of these phylogenetically key and commercially important animals. Understanding this aspect of immunology in bivalves is of main importance in light of the global concern of increasing epizootic disease outbreaks currently affecting oysters. But as of yet, we still lack a comprehensive view of the antiviral immune priming phenomenon in the oyster. In particular, it is unknown whether the different dsRNA or other nucleic acids are equally efficient to prime oysters; if poly(I:C) is able to reduce mortalities as well as viral loads; if the protection can extend over 54h of priming; if that protection is restricted to antiviral response and if it is efficient in the environment. To deeply characterize this phenomenon, we present here a comprehensive phenomenological approach of antiviral immune priming processes in the oyster. We explored the protective effect of nucleic acid exposition in comparing various types of nucleic acids (dsRNA, ssRNA, various lengths, synthetic) and testing priming efficiency against a bacterial as well as lasting effect by following survival and pathogen clearance throughout the experiments. Furthermore, we validated these processes in the field in looking at host survival during a naturally occurring disease outbreak.

Results

Various nucleic acid injections enhance oyster survival upon viral infection.

Previous studies showed that HMW poly(I:C) and dsRNA were able to significantly reduce viral loads upon OsHV-1 infection but also mortality rates regarding dsRNA priming. Building on these observations, we compared the efficiency of the nucleic acids previously tested added to previously untested nucleic acids as LMW poly (I:C), OsHV1-dsRNA, OsHV1- ssRNA^{29,30}. We aimed at assessing whether this phenomenon was specific to the dsRNA analog used. To test this, we primed oysters by injection with different types of nucleic acids 1 day before an OsHV-1 challenge. We tested the poly(I:C) HMW previously used, poly(I:C) of low molecular weight (LMW), in-house synthesized double- or single-stranded RNA derived from the gene encoding the green fluorescent protein (GFP) or from the ORF 87 of the OsHV-1 encoding an inhibitor of apoptosis. Survival rates after OsHV-1 challenge showed that all nucleic acids injected were able to significantly reduce oyster mortalities as opposed to the injection of the filtered seawater control that only reached 20% survival (80% mortality) (Figure 1a). Poly(I:C) HMW and LMW were the most efficient leading to 100 and 97% survival, respectively, whereas GFP-dsRNA, OsHV1-dsRNA, and OSHV1-ssRNA lead from 83% to 90% survival. Altogether the prior injection of any nucleic acid 24h before an OsHV-1 challenge significantly increased the survival rate of the oysters by at least 63%. As a first attempt to understand the mechanisms underlying this phenomenon, we quantified by quantitative PCR (qPCR) the OSHV-1 loads in oysters following challenge (Figure 1b). Results indicated that oysters from the control group, FSW primed oysters, showed a high level of virus DNA loads with a peak at 4.10^5 copies of DP (OsHV-1 DNA polymerase gene) per ng of oyster genomic DNA at 2 days post-infection. Regarding nucleic acid-treated oysters, poly(I:C) HMW and LMW showed no quantifiable amounts of viral DNA (below qPCR detection limit). The GFP-dsRNA-treated oysters showed significant amounts of virus DNA with viral loads reaching $4.6.10^5$ at 2 days post-infection. OsHV1-ssRNA and OsHV1-dsRNA

treated oysters showed increasing viral loads reaching 3.10^4 and 3.10^2 copies of DP.ng⁻¹ oyster DNA at 2 days post-infection, respectively. Altogether, our results revealed that the virus protection observed in the oyster against OsHV-1 wasn't specific of a particular dsRNA. These nucleic acids cannot only reduce viral loads in OsHV-1 infected oysters but also reduce mortalities. Since the stronger responses were observed when priming with poly(I:C) HMW, we used it as a model to mimic DNA virus infection and further characterized antiviral protection and immune priming in oysters.

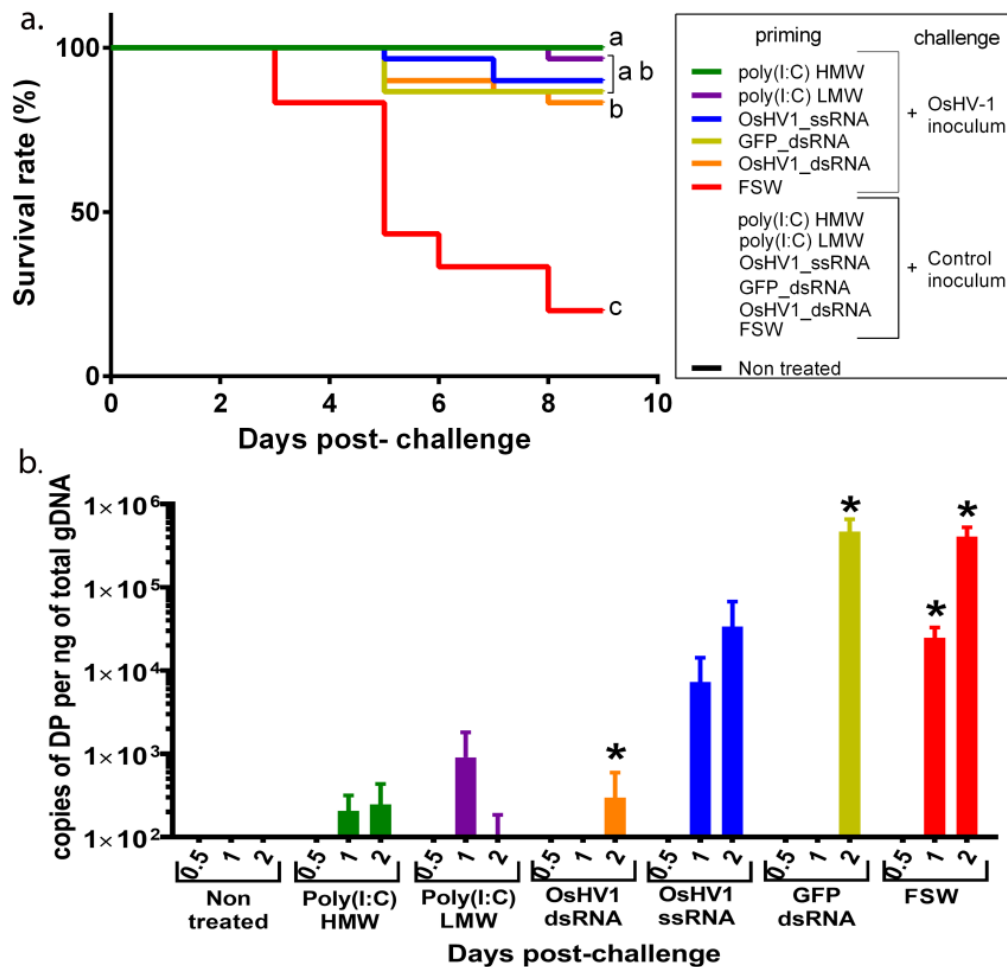


Figure 1: Poly(I:C) as other dsRNA can protect against viral infection and reduce mortality due to viral infection **a.** Kaplan–Meier survival curves were generated from spat primed by injection after anesthesia with 5µg/ animal of different nucleic acids (poly(I:C) HMW; poly(I:C) LMW ; OsHV1_dsRNA ; OsHV1_ssRNA; GFP_dsRNA) or filtered seawater (FSW) as a control and injected 1 day post-priming with OsHV-1 µvar homogenate (1.79×10^7 copies of DNA polymerase -DP- gene per oyster) or OsHV-1-free control homogenate. Mortalities in each group of 30 oysters (10 per tank, $n=3 \times 10$ per treatment) were monitored for 9 days after infection. Controls reaching 100% survival appear hidden and merged behind the poly(I:C) primed line (green). Different letters next to the graphed lines indicate statistically significant difference among treatment at a-b, p -value < 0.05 ; b-c p -value < 0.0001 (log-rank test, $n=30$). **b.** OsHV-1 DNA detection by quantitative PCR in 3 pools of 3 spat in the same experiment. Results are expressed as the mean number of DP gene copies detected per ng of genomic DNA extracted from whole spat pools. The effect of priming on OsHV-1 loads was determined using Kruskal-Wallis test (p -value < 0.05). Significant differences between treatments were performed compared to T0 using Mann-Whitney ($n=3$ pools of 3 oysters)(*, p -value < 0.1).

Poly(I:C) treatment fails to protect against a pathogenic bacteria

Next, we tested whether this protection was specific to a viral infection. In a previous study we showed that injection of heat-killed bacteria did not protect against a subsequent viral infection suggesting that priming could be specific to virus protection³⁰. To test this hypothesis, we performed the reverse experiment that is to say, priming with poly(I:C) before challenge with bacteria. But firstly, we tested the dose-dependency of poly(I:C) protection and established an optimal dose in monitoring protection efficiency from 1.9 ng to 19 μg of poly(I:C) per gram of oyster flesh (Supplementary Figure 1S). We showed that the protection efficiency was dependent on the quantity of poly(I:C) injected and was effective from a concentration of 0.019 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of oysters. We then used the maximal dose leading to the maximal survival rates (19 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of oysters) in all the experiments conducted herein. We primed oysters by injection with poly(I:C), or FSW as a control, 24h before challenging them either with an OsHV-1 inoculum or a control inoculum prepared from virus-free oysters or a lethal dose of the pathogenic *Vibrio tasmaniensis* LGP32 bacterial strain (Figure 2)³³. Results confirmed that poly(I:C) was efficient in protecting oyster against an OsHV-1 challenge with a 98% survival rate as opposed to FSW-challenged oysters demonstrating 74% survival. However, poly(I:C) failed to protect oysters against a bacterial infection demonstrating only 13% survival which was not significantly different from the FSW-primed oysters challenged by bacteria (24% survival). Altogether these results showed that poly(I:C) priming failed to protect against that one specific bacterial strain and might suggest that poly(I:C) specifically triggers antiviral response and protection.

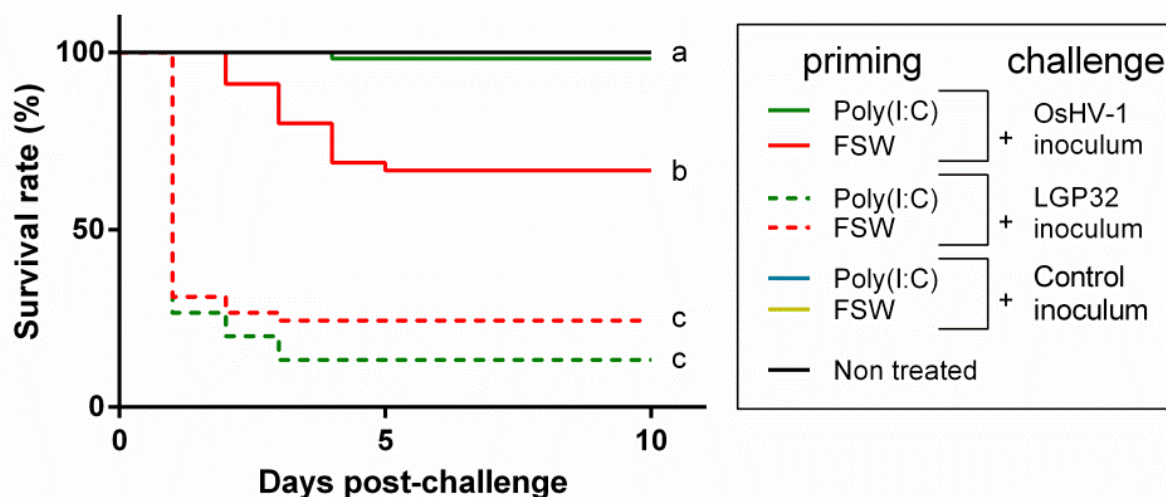


Figure 2: Poly(I:C) specifically protects against viral but not bacterial infection. Kaplan–Meier survival curves were generated from spat primed by injection after anesthesia with poly(I:C) (19 $\mu\text{g.g}^{-1}$ of oyster) or with filtered seawater as a control and injected 1 day post-priming with OsHV-1 μvar homogenate (1.1 $\times 10^7$ copies of DP gene per oyster) or OsHV-1-free control homogenate or *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (7 $\times 10^7$ UFC per oyster). One control conditions without injection is represented as non-treated (black line). Controls reaching 100% survival (poly(I:C) and FSW primed oysters challenged with the control inoculum) appear hidden and merged behind the non-treated control line. Mortalities in each group of 45 oysters (15 per tank) were monitored for 10 days after infection. a-b and b-c, p -value <0.0001; log-rank test (n=45).

Poly(I:C) treatment triggers a long lasting antiviral protection also efficient during a naturally occurring disease outbreak

In the previous experiments presented here, antiviral protection has been observed only 1 day after poly(I:C) injection. To test whether this observed protection could be long-lasting, we expanded the lapse time between prior poly(I:C) priming and OsHV-1 challenge. To this end, oyster spat were primed by injection either with poly(I:C) or FSW as a control and stored in a bio-secured nursery facility. To determine if the poly(I:C) was still protecting from OsHV-1 infection, oysters were regularly challenged by injection with an OsHV-1 inoculum prepared from the same batch of infected

oysters, at 1, 14, 28, 56 and 126 days after poly(I:C) treatment (see experimental scheme in Figure 3). Kaplan-Meier survival curves at all time points, showed that poly(I:C) was still efficient in protecting oysters from 24h to 126 days post-priming with consistent survival rates ranging from 89% to 96% (Figure 4).

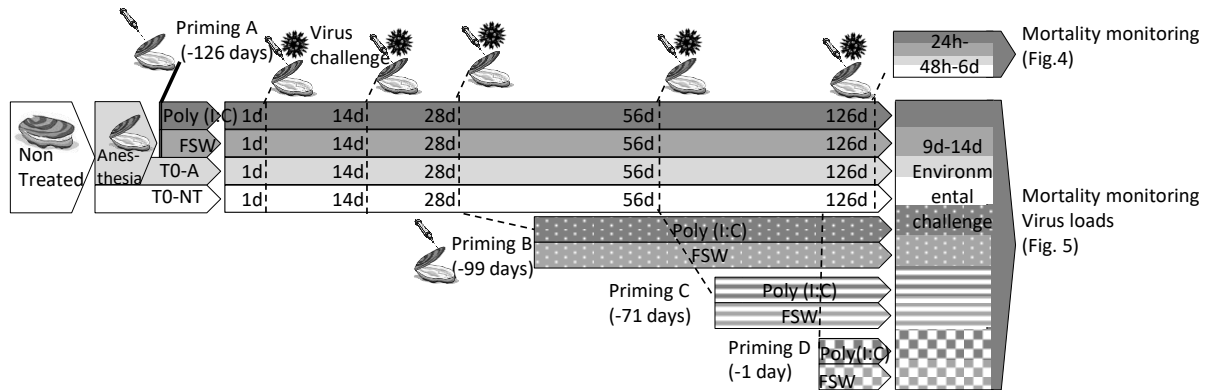


Figure 3: Schematic representation of the experimental design used to test the duration of poly(I:C) priming and the efficiency in the environment.

The same batch of oysters was anaesthetized before being injected with poly(I:C) or filtered seawater (FSW). Four priming experiments were performed at different times: at 126 days (priming A), 99 days (priming B), 71 days (priming C), 24h (priming D) before immersion in the Thau lagoon (Mediterranean Sea). For priming A, the antiviral effect of the treatment was tested at 1 day, 14 days, 28 days, 56 days or 126 days post-treatment in experimental infections with OsHV-1. Throughout all the experiments, a batch of oysters remained untreated as a control. During each experimental infection, mortalities were monitored daily post-challenge. During the environmental test, mortalities were monitored daily and sampling performed when mortalities occurred (9 and 14 days post-immersion).

We then tested the efficiency of the poly(I:C) treatment in the Thau lagoon (Mediterranean Sea, France) affected by recurrent seasonal mortality events associated with OsHV-1. We deployed two distinct oyster cohorts twice in Thau lagoon in 2015 and 2016. In the first deployment, a first cohort of oysters were injected with poly(I:C) or non-treated as a control and then placed in the field before the disease outbreak (1 day after priming). Oysters primed with poly(I:C) had a 80% survival compared to control oysters which had 29% survival. Poly(I:C)-oysters had a 51% higher survival (Figure 5a). Since mortalities occurred only 30 days after immersion in the field and that survival rates were maintained for 119 days after immersion, it suggested that priming duration could be extending largely over 1 day and could be long-term. To confirm this efficiency in the field and the long-lasting effect of poly(I:C), we designed a second experiment. As a mirror to the duration experiment, we primed oysters at different lapse times before deploying them in the Thau lagoon on a second year (2016) (Figure 2). Using another cohort of specific pathogen-free oysters, we primed oysters by injection of poly(I:C) or filtered seawater as a control at 126 days, 99 days, 71 days and 1 day before challenge in the field (Figure 5). Mortality monitoring showed that poly(I:C) was still very efficient in protecting oysters against a natural infection with 83% to 92% survival (Figure 5b). The protection lasted until the end of the experiment, *i.e.* 156 days, more than 5 months after poly(I:C) initial exposition. In addition, in that second experiment, we quantified viral loads in oysters during the mortality outbreak (Figure 5c). Results show that viral loads were high in non-treated oysters reaching 2.10^5 copies of DP and FSW-treated oysters reaching a mean of 3.10^5 copies of DP gene. ng^{-1} of oyster gDNA. In contrast, poly(I:C)-treated oysters showed reduced viral loads however reaching a mean of 3.10^4 copies of DP. ng^{-1} at 14 days post-immersion. Nonetheless, those results confirmed that poly(I:C) is able to trigger a long-lasting antiviral state in the environment enabling oysters to resist to the disease. The maintenance of this protection over time could either be a direct consequence of the early

poly(I:C) treatment but also to the persisting presence of poly(I:C) in oysters. To address that issue, we tested poly(I:C) stability in seawater and in the oyster hemolymph (circulating fluid or blood equivalent, cell free fraction) by following its presence using the J2 antibody raised against dsRNA (Figure 6)²⁸. Poly(I:C) appeared as a smear as its size ranges from 1.5 kb to 8 kb. The J2 antibody allowed us to show that the smears observed were only due to the presence of poly(I:C), as negative controls (fluids without poly (I:C)) and gDNA did not induce any signal. No signals were obtained when blotting without the primary antibody (Supplementary Figure 2S). If poly(I:C) seemed stable in sterile water for 2 days, results showed a rapid degradation of poly(I:C) in seawater as well as in the hemolymph with a signal totally extinguished between 24h (hemolymph) and 48h (seawater) after contact. Even if we can't exclude the persistence of poly(I:C) in oyster cells, altogether these results confirmed that poly(I:C) priming is a long-lasting phenomenon, efficient in protecting oysters in the field.

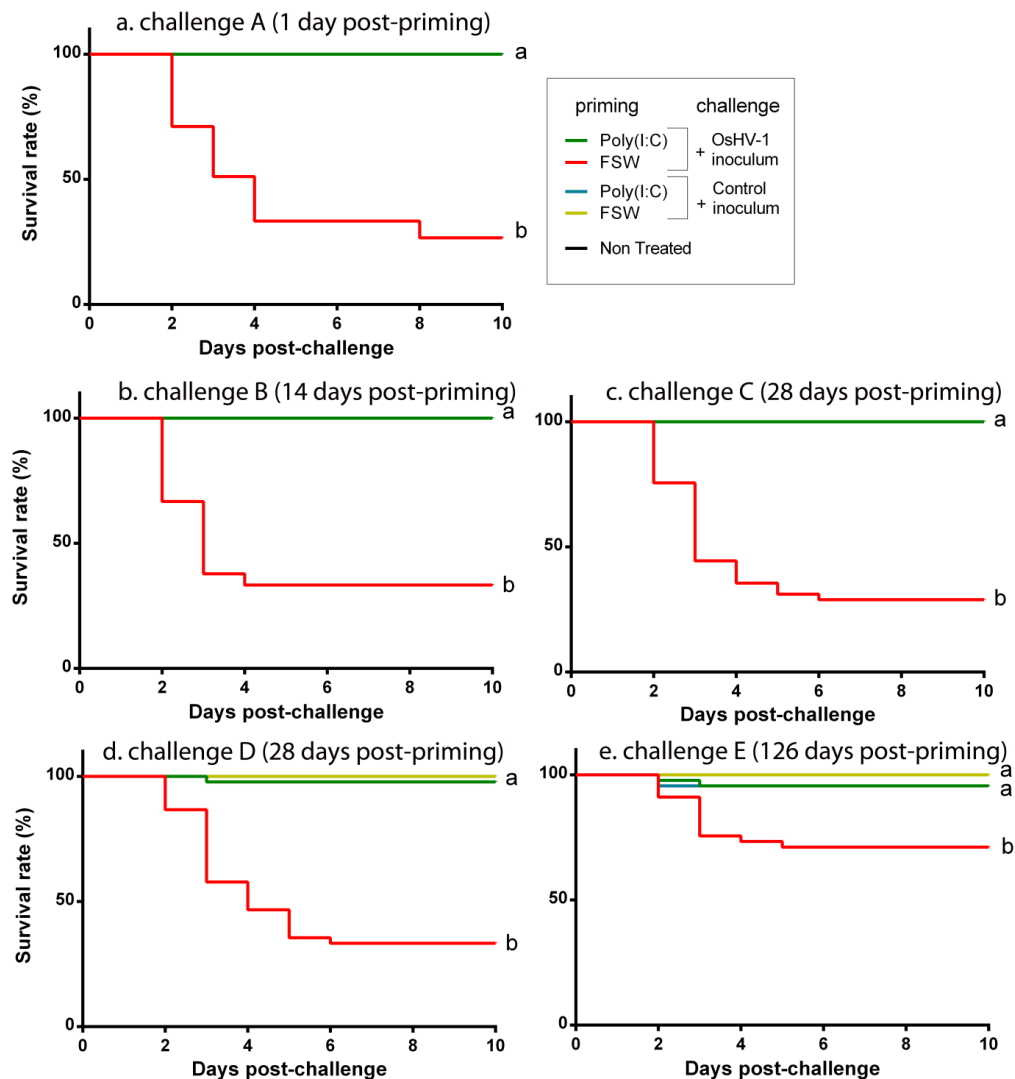


Figure 4: Duration of poly(I:C) priming. Kaplan-Meier survival curves were generated from spats primed by injection after anesthesia with poly(I:C) ($19\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of oyster) or with filtered seawater as control and injected 1 day (a), 14 days (b), 28 days (c), 56 days (d) or 126 days (e) post-priming A with OsHV-1 μ var homogenate (7.7×10^6 and 4.4×10^6 copies of DP gene per oyster, respectively) or a pathogen free control homogenate. One control conditions without injection is represented as non-treated (black line). Conditions demonstrating 100% survival rates can appear hidden and merged with other ones reaching the same survival rate. Mortalities in each group of 45 oysters (15 per tank) were monitored for 10 days after infection. a, b indicate p -value < 0.0001 ; log-rank test ($n = 45$).

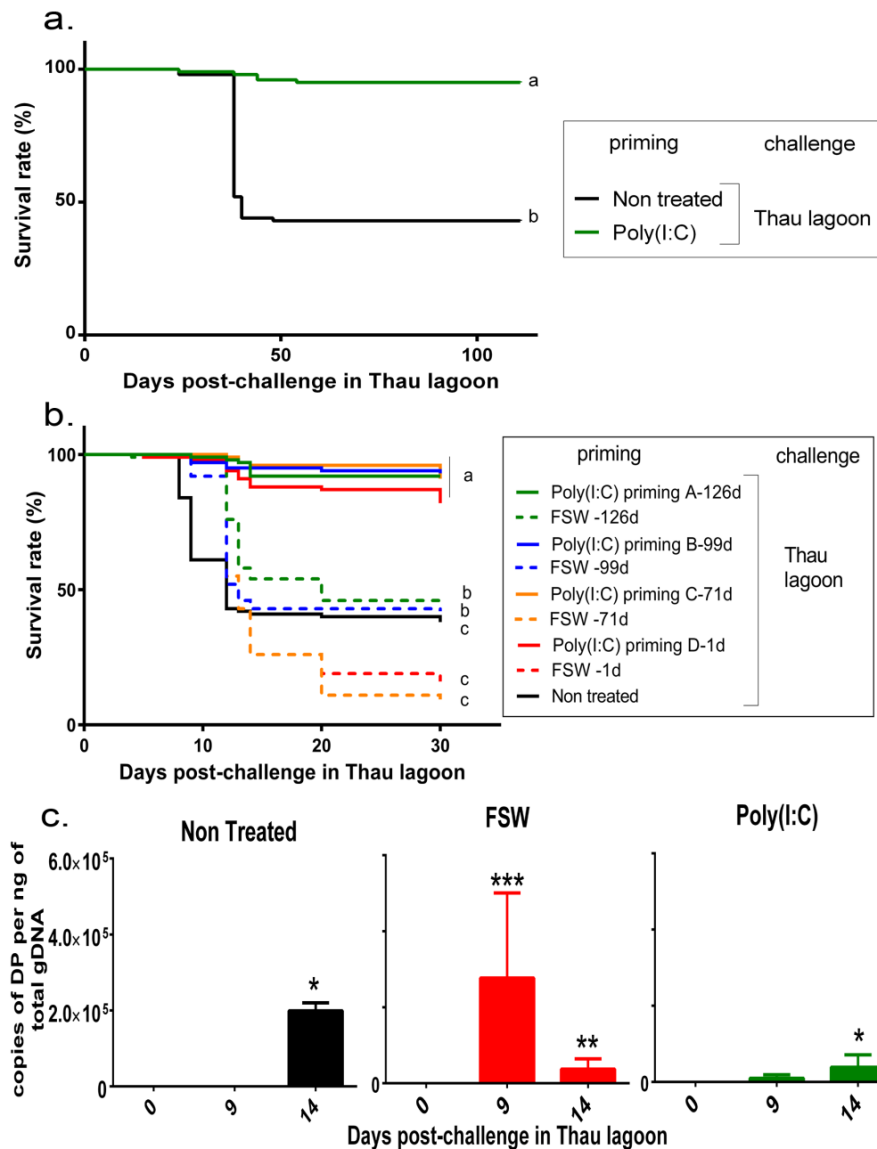
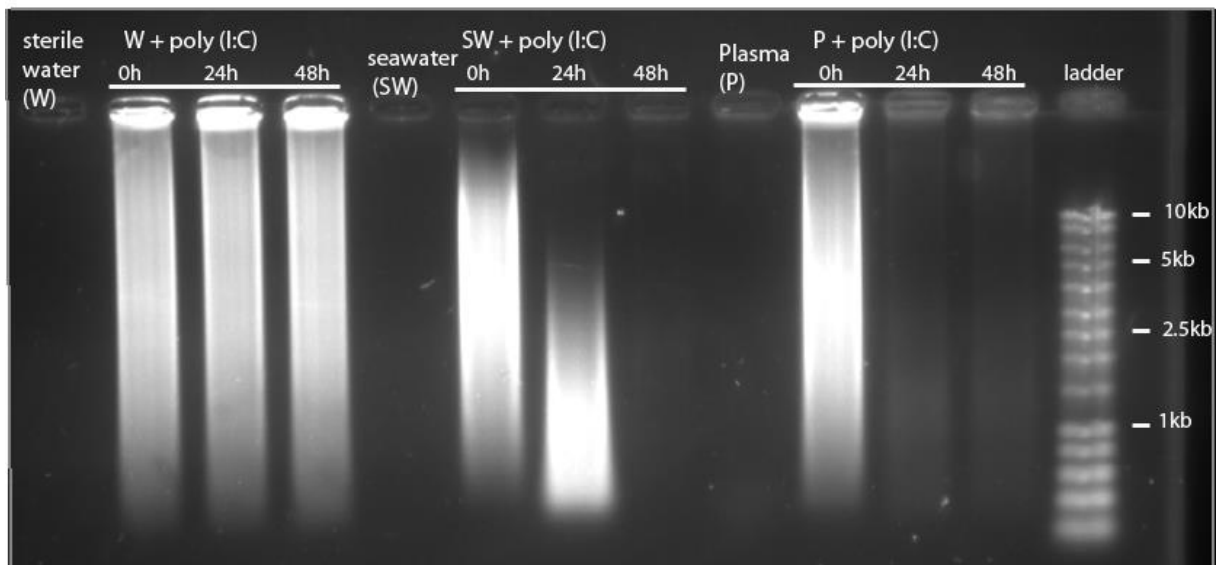


Figure 5: Poly(I:C) priming efficiency during a naturally occurring disease outbreak. **a.** Kaplan–Meier survival curves were generated from spat primed by injection after anesthesia with 10 μg of poly(I:C) per oyster (green line) 1 day before deployment in a coastal lagoon of the Mediterranean sea (Thau Lagoon, France) before a disease outbreak (April 2015). Animals without treatment are represented as non-treated control (black line). Mortalities in groups of 100 oysters were monitored for 119 days after deployment. Different letters next to the graphed lines indicate statistically significant difference among treatment at p -value <0.0001 (log-rank test; $n=100$). **b.** Kaplan–Meier survival curves were generated from spat primed after anesthesia with poly(I:C) ($19\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of oyster) (green lines) or with filtered seawater as a control (FSW, red lines), 126 days (priming A), 99 days (priming B), 71 days (priming C) or 1 day (priming D) before deployment in the Thau Lagoon during a disease outbreak (June 2016). Animals without treatment are represented as non-treated control (black line). Mortalities in groups of 100 oysters were monitored for 30 days after deployment. Different letters next to the graphed lines indicate statistically significant difference among treatment at a-b p -value <0.0001 ; b-c p -value <0.05 (log-rank test, $n=100$). **c.** OsHV-1 DNA detection on 2016 experiment, by quantitative PCR. Results are expressed as the mean number of DP copies detected per ng of genomic DNA extracted from whole spat pools at 9 and 14 days post immersion. The effect of priming on OsHV-1 μvar loads was determined using Kruskal-Wallis test. Statistical differences represent an increase of OsHV-1 loads compared to the loads at the beginning of the experiment (T0). Significant differences between treatments were performed using Mann-Whitney test (* p -value <0.1 ; ** p -value <0.05 ; *** p -value <0.01 - $n = 12$ pools of 3 oysters for poly(I:C) and FSW treated oysters and $n = 3$ pools of 3 oysters for non-treated oysters).

a.



b.

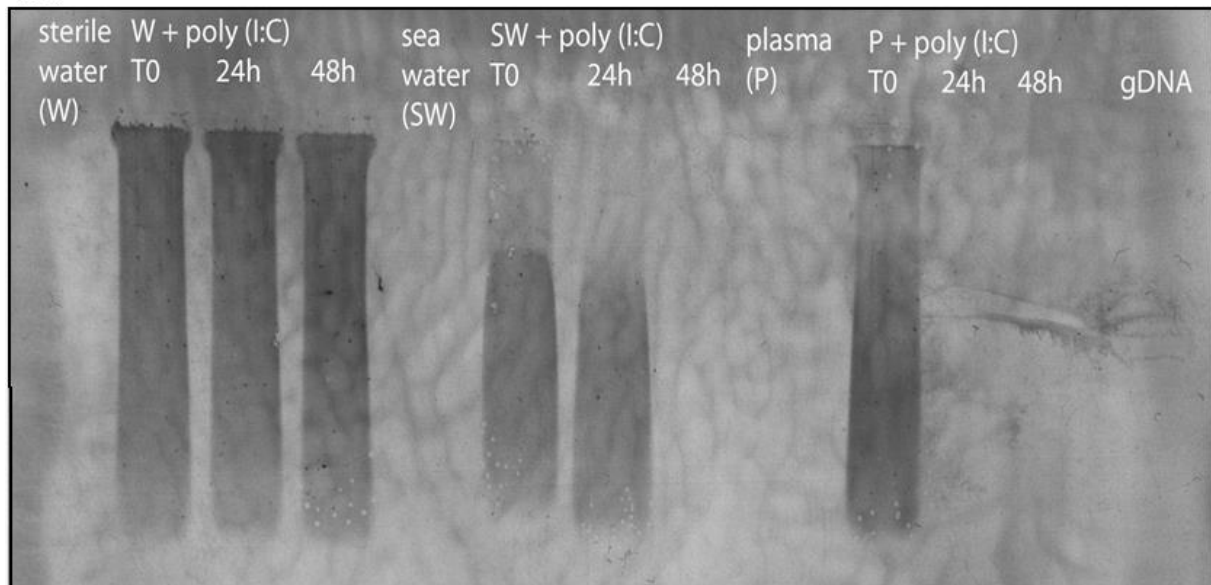


Figure 6: Poly(I:C) persistence in seawater and oyster hemolymph

Immuno-northern blotting using antibodies against double stranded RNA. Poly(I:C) was incubated for 0, 24h, 48h with sterile water (W), seawater (SW) or oyster plasma (P) (cell free hemolymph) and 1µg of each sample separated in 1% agarose non-denaturing gel. A SmartLadder (MW-1700-02, Eurogentec) was used. Sterile water, seawater and plasma without addition of poly(I:C) were used as negative controls. After electrophoresis, (a) nucleic acids were stained using GelRed (image partially cropped) or (b) blotted onto a nylon membrane and immuno-localized using the J2 antibody (Scicons) (image partially cropped). For immune-blotting, 1µg of *C. gigas* genomic DNA (gDNA) was added to the gel in place of the ladder, as a negative control. Full-length blots/gels are presented in Supplementary Figure 2S.

DISCUSSION

In the present study, we characterized the extent of nucleic acid antiviral priming in the oyster. We demonstrated for the first time that nucleic acids of different structures (single or double stranded) or various lengths (from 300 bp to 8 kb) could all be efficient in inducing an antiviral state and able to reduce mortalities upon viral infection, ranging from 83% to 100% survival. In these trials, poly(I:C) HMW was the most efficient in mitigating oyster mortalities (100% survival). These results are in accordance with studies in vertebrates that provide evidence that the length of dsRNA drives distinct innate responses in different cell lineages and demonstrate that HMW poly(I:C) induces stronger antiviral response than LMW poly(I:C)³⁴. If poly(I:C) was drastically reducing viral loads in infected oysters, viral loads and mortality rates did not seem to be clearly related for other nucleic acid tested. That discrepancy might be due to the fact that we did not obtain 100% protection rates for this priming experiment. Previous studies also showed variability in responses to dsRNA injection possibly due to variability in accurate administration, potential excretion or poor cellular uptake^{35,36}. The elevated viral loads observed might thus be due to sub-optimal injections (low doses or inefficient injections) and further sampling of infected oysters. In addition, we cannot exclude the hypothesis that oysters might, as in vertebrate systems, possess different pathways to recognize different nucleic acids inducing different antiviral responses and different kinetics of viral countermeasures. In mammals, innate immune sensing of nucleic acids represents the major antiviral defense mechanisms³⁷. Nucleic acids and poly (I:C) have been described as effective viral PAMPs recognized by cytosolic or endosomal specific receptors (RIG-I-like receptors, Toll-like receptors, cGAS) as well as various nuclease systems³⁸⁻⁴³. They participate in inducing type I IFN to restrict the propagation of foreign genetic material in ultimately interfering with virus assembly and protein translation, or in the induction of several types of cell death including apoptosis^{44,45}. In the oyster, *in silico* analyses of the *C. gigas* genome revealed the conservation of numerous nucleic acid receptors and components of the IFN pathway (TLRs, RIG-like receptors, PKR, Interferon Stimulated Genes)^{30,46-50}. Moreover, previous studies revealed that poly(I:C) and dsRNA induce genes related to the mammalian IFN pathway^{29,31,51-53}. These indications of structural or functional conservations of nucleic acid sensing pathways in the oyster could explain the potent activity of a broad range of nucleic acid^{46,48,54}. In the light of recent studies, Crisan *et al.* (2016) have also hypothesized that damage-associated molecular patterns (as nucleic acids) might induce long-term effects on the innate immune system resulting in innate immune memory^{55,56}. We could then hypothesize that nucleic acids might have a similar capacity to that observed for certain microbes or ligands in priming the immune responses to remember a previous injury. Still, more studies are needed and are currently undergoing in our laboratory to unravel the molecular and cellular bases behind immune priming and the specificity of different nucleic acids recognition. The identification of the receptors, effectors, and signaling pathways behind these processes might not only contribute to the design of other antiviral strategies for virus control in invertebrates, but might also provide a better understanding of the conservation of the invertebrate innate antiviral system.

Based on the demonstrated efficiency of HMW poly(I:C) antiviral priming, we further used this *in vivo* model of interaction to complete the characterization of the antiviral immune priming in the oyster. The use of poly(I:C) in place of a replicating virus allowed to analyze immune responses in a non-pathogenic context, in the absence of any interference that may occur *via* specific viral proteins. We originally showed that the viral load reduction (OsHV-1 DNA detection below quantification limits) due to poly(I:C) priming was related to a significant decrease in oyster mortalities when facing the OsHV-1 virus with an average survival rate of 95% (ranging from 100% to 78%) over experiments in laboratory conditions. In addition, we demonstrated for the first time that the priming effect was as efficient in experimental challenges using OsHV-1 as in the field when facing a naturally occurring disease outbreak. Priming with poly(I:C) indeed induced in the field, over two independent deployments during two successive years, an average survival rate of 88% (ranging from 80 to 93%). Once again, if viral loads remained low nine days after immersion in the field, we were able to detect virus DNA in primed oysters at 14 days after immersion, when the mortality rates were still low. This is probably due to heterogeneity in efficiency of poly(I:C) treatment and the fact that we tested a batch

of oysters that did not reached 100% survival and experienced from 8% to 17% mortality. In mammals, Poly(I:C) was also shown to be a good therapeutic agent against herpes simplex virus (HSV-2) that did not prevent viral infection but decreased disease⁴⁴. Interestingly, previous studies on the causative agents and etiology of the massive juvenile oyster mortalities revealed that the respective role of bacteria *versus* OsHV-1 was still unclear in this polymicrobial disease hampering development of effective prophylactic and therapeutic interventions⁵⁷⁻⁵⁹. Our results originally demonstrate that when the virus replication is impaired, disease does not occur which strengthens the hypothesis that the OsHV-1 virus plays a major role in triggering the disease¹⁹. However, additional studies will be required to decipher whether oysters actually die from a viral disease or from a secondary bacterial infection as demonstrated for vertebrate viral diseases. In these cases virus would act as a primary offender leading to dysfunctional innate immune response and enhanced susceptibility to bacterial infection^{60,61}.

We also investigated the specificity of poly(I:C) priming in the oyster. When challenged with a pathogenic bacterial strain, poly(I:C)-primed oyster survival did not exceed 13%. This result suggests that poly(I:C) would specifically induce an antiviral response. In invertebrates, a variety of studies have addressed the specificity of enhanced protections qualified as immune priming, and observed notable differences, from cross-reactivity (non-specific)⁶² to highly specific^{63,64}. The degree of specificity associated with this phenomenon is thus likely to be dependent on the pathogen and immune mechanisms involved. However, in the oyster, previous studies showed that *C. gigas* possesses distinct and specific antiviral and antibacterial responses⁵³, but also that priming with heat-killed bacteria wasn't efficient in protecting oysters against OsHV-1³⁰. Added to the fact that nucleic acid injection induces IFN-like pathways in vertebrates and invertebrates, not regulated following bacterial infection, it further suggests that the protection might be specific to an antiviral protection^{29-31,53}. Nevertheless, future work should test challenging poly(I:C) (or other nucleic acid)-primed oysters with different pathogenic bacterial strains to generalize this statement and confirm whether it is a hallmark of oyster antiviral immune priming.

Furthermore, we showed that poly(I:C) increased survival rates in a long-lasting way. Our results demonstrated for the first time that this protection could last for more than 5 months in laboratory and environmental conditions. In human tissues, poly(I:C) possesses a short half-life (4 hours) and is rapidly degraded likely due to endonuclease activities^{24,44,65}. In seawater or in the oyster's hemolymph, we showed that poly(I:C) persistence did not exceed 2 days⁶⁵. Likewise, Masood *et al.* observed in the oyster *Saccostrea glomerata*, that poly(I:C) detection in the hemocytes decreased significantly from 15h post-injection, also suggesting a short lifetime in oyster tissues⁶⁶. These data suggest that immune priming may not be due to a persistence of poly(I:C) in oyster tissues. Only a few studies have addressed the time course of innate immune priming and examined resistance at different time points after priming. In those studies, performed in various invertebrates including crustaceans, insects and even cnidarians, the improved response to the different pathogens was often shown to be short-lived and did not exceed 3 months^{15,67}. In molluscs, duration was not explored over 56 days for *B. glabrata*/*S. mansoni* interactions¹⁶. In *C. gigas*, the duration limit was not explored over 54h for poly(I:C) stimulation and over 7 days for vibrio immune priming^{22,23,30,31,68}. In our case, the duration observed thus largely extended over the one observed in previous experiments using poly(I:C) and might even extend over that period since we did not test longer timespans. To our knowledge this is the first demonstration of such duration in a mollusc or invertebrate species. These results, added to the fact that primed oysters are still able to induce antiviral protection a long time after elimination of poly(I:C), are suggestive of the existence of innate immune memory mechanisms in the oyster. However, the notion of innate immune memory in invertebrate is an intense subject of debate. This notion has been introduced by Kurtz *et al.* (2003)⁴ in a phenomenological approach that wasn't supported by mechanistic analyses. Since then, numerous studies have tried to come up with a general definition of this phenomenon and attributed to invertebrate innate immune memory multiple mechanisms; from the *sensu stricto* recalled response (where immune parameters have to return to a resting state) to sustained responses or even biphasic shifting responses⁶⁹. In our case, we cannot exclude that oysters are experiencing either of these scenarios and further work are granted to find relevant priming markers to help understand the mechanisms involved in this antiviral protection.

Finally, it is interesting to note that our data were obtained on different cohorts of naïve oysters tested at the same age, thus supporting the fact that the observed innate immune priming effect was not

due to a specific genetic background. Hence, these processes seem to be a general trait in oysters, even if we cannot exclude natural variations in priming capacities. Taking this trait into account would be of outmost importance in view of the therapeutic potential of innate immune priming. The possible use of immune priming has indeed been a subject of intense research to develop “pseudo-vaccines” to reduce infection in economically important invertebrates, notably in crustaceans to mitigate recurrent viral diseases^{15,70,71}. The practical difficulties associated with vaccine administration and potential safety issues that should be considered for food sources underlie the need to further explore this new strategy of pathogen control. Regarding application potential, it is noteworthy that the observed protection by poly(I:C) was not relevant to the route of priming used^{11,72,73}. When testing bathing oysters in poly(I:C), we obtained similar protection results as for injection (Supplementary Figure 3S).

In conclusion, in the present study we demonstrate that antiviral immune priming processes are not restricted to arthropods and are also present in Lophotrochozoans, further highlighting the diversity of invertebrate immune processes. This model may provide better understanding of disease mechanisms underlying viral infections and could be used to explore novel antiviral strategies to help mitigate disease threats upon marine bivalves. Numerous questions are still emerging about characteristics of innate immune priming and more work is warranted to try and draw a comprehensive view of all these processes existing across phyla in regard to the diversity of interactions studies and multiplicity of mechanisms involved. To try and understand the nature and origin of these convergent or conserved innovations, a recurrent question is the molecular bases of immune priming and memory. Future studies should endeavour to investigate molecular bases of this phenomenon as well as its ecological and adaptive significance in oyster populations.

MATERIALS & METHODS

Experimental animals

Experiments have been performed on specific pathogen -free (SPF) (*i.e.* free of mortality, negative for OsHV-1 detection and very low *Vibrio sp.* bacteria concentrations⁷⁴) juvenile *C. gigas* oysters (or *Magallana gigas*, Thunberg, 1793) (4-8 months old, less than one-year old) from the FINA Ifremer project and from the DECIPHER ANR program (ANR-14-CE19-0023). SPF oysters were produced following standardized protocols under sanitary controlled conditions at the Ifremer research facility of Argenton. These batches of oysters were chosen for their naive and pathogen-free character and were used indifferently, depending on their availability at the time of the experiments, independently of their genetic background. For reproducibility issues, oysters were always tested at comparative ages (4 months old), except for duration and field experiments where priming efficiencies were monitored until 8 months-old.

Preparation of pathogens or control inoculums

OsHV-1 inoculums (or virus homogenates) were prepared according to⁷⁵ from moribund oysters experimentally infected with OsHV-1 in previous trials and frozen at -80°C. All inoculums used in the different experiments discussed in this study were prepared from the same batch of infected oysters to ensure reproducibility (except for experiment in supplementary files). Viral DNA loads (OsHV-1 μ var genomes copies. μ L⁻¹) in inoculums were estimated by qPCR¹⁹ and indicated for each experiment. Viral inoculums were confirmed to be free of cultivable bacteria by plating 40 μ l on LB NaCl agar plates. Control inoculums (control homogenate) were prepared following the same protocol from healthy naïve oysters showing no detectable amount of viral DNA.

Vibrio inoculum was prepared from *Vibrio tasmaniensis* LGP32 strain that was isolated from *C. gigas* undergoing a mortality episode⁷⁶. *Vibrios* were grown under agitation at 20°C in Zobell medium for 24h. Cultures of *V. tasmaniensis* LGP32 were centrifuged (1000 x g, 10 min, 20°C) and re-suspended two successive times in sterile seawater to an optical density (OD600) of 1 (1 x 10⁹UFC/ml).

Priming solutions

For priming experiment, the following nucleic acids were used: poly(I:C) HMW (Invivogen, cat. code:tlrl-pic), poly(I:C) LMW (Invivogen, cat. code:tlrl-picw), double stranded RNA GFP (GFP_dsRNA), double stranded RNA OsHV-1 (OsHV1_dsRNA), single stranded RNA OsHV-1 (OsHV1_ssRNA). Poly(I:C) comprises long strands of inosine poly(I) homopolymer annealed to strands of cytidine poly(C) homopolymer. The average size of Poly(I:C) HMW is from 1.5 kb to 8 kb and the average size of Poly(I:C) LMW is from 0.2 kb to 1 kb. Poly(I:C) solutions were prepared following manufacturer instructions and diluted in sterile filtered (0.02µm) seawater to the desired concentration. Double stranded and single stranded RNAs were synthesized using the Ambion MEGAscript®RNAi kit (cat.#AM1626). To generate transcription template for both strands of the dsRNA, two separate PCRs with a single T7 promoter-containing PCR primer in each were performed. For OsHV-1 dsRNA and ssRNA, a 330 pb fragment targeting the ORF 87 genomic sequence (Genbank AN KF517121) was amplified using primers from ⁷⁷ (with the T7 promoter appended to the 5' end of the primers) using cDNAs synthesized from RNA extracted from OsHV-1 infected animals. For GFP dsRNA, a 692 bp fragment targeting the green fluorescent protein sequence was amplified using primers GFP-T7-F-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGAGGAGCTGTTCA and GFP-T7-R-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCATGCCGAGAGT using the plasmid pJGFPH as a template.

Priming and challenge experiments

For each experimental priming and challenge experiment, animals were previously anesthetized in hexahydrate MgCl₂ (ACROS, cat.# 197530250, 50g.L⁻¹, 100 oysters/liter) according to ⁷⁸ for 4 to 10h. Oysters were injected using 26-gauge needle attached to a multi-dispensing hand pipette, either with 20µL or 40µL of the priming solution and 20µl of the pathogen/control inoculums in the adductor muscle to spread into the circulatory system. Injection of sterile filtered seawater (FSW- in the same proportion used for nucleic acids resuspension) was used as a priming injection control. For all experimentations, a group of oysters were only anesthetized or non-treated as non-injected control. Non-treated oysters refer to oysters that were not primed, nor challenged in controlled conditions and not primed in the field experiment. For short term rearing (<24h) oysters were replaced in seawater in plastic tanks at room temperature; for long term rearing after priming (>24h), oysters were maintained at 14±1°C and fed in a biosecure nursery facility at Ifremer's Aquaculture Research Facility in Palavas-les-Flots (Laboratoire Aquaculture en Languedoc-Roussillon, LALR, Southern France). All challenge experimentation were performed in 3 replicates with spats in 1L of seawater in plastic tanks regulated at 20 ±1°C. In each tank, spats were separated in two groups; one for mortality monitoring and one for sampling. Sampling consisted in individually removing shells of each oyster with a sterile scalpel blade and snap-froze the whole oyster in liquid nitrogen by pool of three animals. The oysters were stored at -80°C before grinding to powder and nucleic acid purification. Mortality was followed daily and dead spats were removed from tanks and stored at -80°C. Survival rate data were analyzed for statistical differences between treatments by log rank test on Kaplan-Meier survival curves. Figure 3 is depicting priming experiments 4 and 5.

(1) Priming specificity studies: testing various nucleic acid injections

Different nucleic acid were used (poly(I:C) HMW, poly(I:C) LMW, GFP_dsRNA, OsHV1_dsRNA, OsHV1_ssRNA). For each condition, 270 spats of a susceptible oyster line (F15-Decipher project) were primed after anesthesia (6h) with 20µL (5 µg/oyster) different nucleic acids or with filtered seawater as a control. For each priming condition, 24h after priming, 135 spats were injected with 20µl of OsHV-1 inoculum (8.9 x 10⁵ copies of DP gene.µL⁻¹) and 135 spats injected with control inoculums, excepted for anesthesia and non-treated conditions.

(2) Poly(I:C) HMW dose effect

Different doses of poly(I:C) HMW (19µg, 1.9µg, 190ng, 19ng and 1.9ng.g⁻¹ of oyster) were injected to oysters after anesthesia. For each condition, 360 spats of a susceptible oyster line (F11-Decipher project) were primed with 40µL of poly(I:C) HMW at different concentrations after anesthesia (5h) or injected with filtered seawater as a control. For each condition, 24h after priming, 180 spats were

injected with 20 μ L of OsHV-1 inoculum (1.1×10^6 copies of DP gene. μ L⁻¹) and 180 spatulae injected with a control inoculum, excepted for anesthesia and non-treated conditions.

(3) Poly(I:C) specificity of protection against *Vibrio* and virus

For each condition, 300 spatulae from the same 01-2016 FINA cohort (Ifremer production)⁷⁴ were injected after anesthesia (10h) with poly(I:C) HMW (19 μ g.g⁻¹ of oyster) or filtered seawater as a control. For each priming condition, 24h after priming, 100 spatulae were infected with OsHV-1 (5.6×10^5 copies of DP gene. μ L⁻¹), 100 spatulae with a control inoculum and 100 spatulae with *V. tasmaniensis* LGP32 (3.5×10^6 UFC. μ L⁻¹).

(4) Duration of the poly(I:C) protection

For each priming condition (figure 3), 1200 spatulae from the same 01-2016 FINA cohort (Ifremer production)⁷⁴ were injected after anesthesia with poly(I:C) HMW (19 μ g.g⁻¹ of oyster) and 1200 spatulae with filtered seawater as a control on the same day. At different time post-priming, i.e. 1, 14, 28, 56 or 126 days after priming, a group of oysters (120 spatulae) was infected with OsHV-1 (mean: 7.4×10^5 copies of DP gene. μ L⁻¹) or control inoculum (120 spatulae) to determine if the poly(I:C) was still protecting from OsHV-1 infection.

(5) Efficiency and duration of the poly(I:C) protection in the environment

A first experiment was performed in 2015. SPF oysters used are from the same 8-months old SPF 01-2015 FINA cohort (Ifremer production). Four groups of 100 oysters were anesthetized in MgCl₂ and injected with poly(I:C) HMW (10 μ g per oyster) or non-treated as a control, 1 day before immersion in the Thau lagoon (43°22'45.1"N 3°34'16.1"E, France).

A second experiment was performed in 2016. SPF oysters from the 01-2016 FINA cohort (Ifremer production) were injected after anesthesia with poly(I:C) (19 μ g.g⁻¹ of oyster) or filtered seawater as a control, 126, 99, 71 days or 24h (priming A to D, respectively, see figure 3) before deposition in the Thau lagoon (43°22'45.1"N 3°34'16.1"E, France). Each condition was divided in two: one for sampling (72 spatulae) and one for mortality monitoring (100 spatulae). In parallel to immersion in the natural environment, for each priming times, laboratory infections with OsHV-1 μ var (2.2×10^5 copies of DP gene. μ L⁻¹) have been carried out following previous protocol.

(6) Poly(I:C) protection through bath treatment

After anesthesia, 20 oysters were exposed to two doses of poly(I:C) HMW (dose 1 was 0.76 μ g.mL⁻¹ and dose 2 was 0.38 μ g.mL⁻¹) in 100 mL seawater baths for 2 and a half hours. Each treatment was performed in duplicate. After 2h30 of exposure, oysters were replaced in a 1L tank with fresh seawater for 24h. Each oyster group was then anaesthetized and divided in 2. Twenty oysters for each treatment, as well as non-treated oysters as a control, were injected with a viral homogenate containing OsHV-1 (3.6×10^7 copies of DP gene per oyster) and the 20 others with a pathogen free control homogenate (0 copies of DP gene per oyster) and mortalities were monitored daily for 8 days.

Nucleic acid purification

Oyster pools were homogenised by bead-beating (Retsch, Mixer Mill MM400) with a stainless steel ball bearing and housing that had been pre-chilled with liquid nitrogen. Genomic DNA was purified from homogenised oyster tissues using the Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue kit (cat.# 740952.250) following manufacturer's instruction with an additional step of RNaseA treatment (Macherey-Nagel, cat.# 740505). The quality and quantity of genomic DNA was estimated on Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoScientific®). Total DNA was resuspended to a final concentration of 20 ng. μ L⁻¹ prior to quantitative PCR.

Viral detection and quantification

Detection and quantification of OsHV-1 DNA was performed using quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were performed in duplicate using a Roche LightCycler 480 Real-Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University). PCR reaction volumes were 6 μ L containing LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche), 100 nM of pathogen specific primers and 20 ng of DNA using an initial denaturation (95°C for 10 min) followed by 40

cycles of denaturation (95°C, 10s), hybridization (60°C, 20s) and elongation step (72°C, 25s). Virus specific primer pairs targeting a region of the OsHV-1 genome, predicted to encode a DNA polymerase catalytic subunit (DP) were chosen as previously described (ORF100, nucleotides 147655–153291 of AY509253): OsHVDPFor- ATTGATGATGTGGATAATCTGTG/ OsHVDPRev- GGTAATACCATTGGTCTTGTTC) ^{79,80}. For absolute quantification, DP amplification products were cloned into the pCR4-Topo vector and replicated in *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen). Plasmids were extracted using the Wizard Plus SV miniprep DNA purification system (Promega) and standard curves of known concentration of plasmid generated according to the Applied Biosystems manual of absolute real-time RT-PCR quantification. Absolute quantification of OsHV-1 genome copies in oyster samples was then estimated by comparing the observed crossing point (Cp) values to known plasmid standards from 10³ to 10⁹ copies of DP. The effect of priming on OsHV-1 μ var load was determined using Kruskal-Wallis test (p<0.05) using the computer software package, GraphPad Prism® v. 6.0. Mann Whitney test was used to compare rank of means if significant differences were found (p<0.1).

Immuno-northern-blotting for Poly(I:C) persistence assay

20 μ g of poly(I:C) was diluted in 500 μ L of filtered seawater (0.02 μ m) or filtered hemolymph (0.2 μ m extracted from a pool of 13 oysters) or sterile RNase-DNAse free water as a control and incubated at 17°C. Each condition was sampled at time 0h, 24h, 48h and 4 days. Presence of poly(I:C) in each sample was first monitored by gel electrophoresis on a 1% agarose in Tris-acetate-EDTA 1X gel. 20 μ L of each sample (1 μ g of poly(I:C)) and 5 μ L of ladder (SmartLadder MW-1700-02, Eurogentec) was electrophoresed during 2 hours at 4°C and 50V; nucleic acid presence was revealed by GelRed nucleic acid stain (Biotium) for 10 min. Gel image was taken using the Molecular Imager® Gel Doc™ XR system (Bio-Rad) and the Quantity One® Software Version 4.6.3 (Bio-Rad) after 4 seconds of exposition. Presence of poly (I:C) was secondly revealed by immuno-northern-blotting using the J2 antibody (Scicons) specific to dsRNA²⁸, based on the “DIG DNA labeling and detection kit” protocol from Roche (cat.No. 11093657910). A total of 20 μ L of each sample, 1 μ g of *C.gigas* genomic DNA and 2 additional lanes deposited with 1 μ g of poly(I:C) were deposited on a non-denaturing 1% agarose TAE gel and electrophoresed for 2h at 50V and 4°C. Gel was blotted onto an Hybond-N nylon membrane (GE Healthcare) by semidry electroblotting in 1X TAE buffer for 45 min (appligene vacuum blotter, 50mbar) before UV crosslinking using the spectrolinker (spectronics corporation-optimal crosslink at 120000 μ J/cm²). The membrane was blocked with a blocking solution containing 10% blocking reagent (Roche Diagnostics) in maleic acid buffer (0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH7.5) for 30 min at room temperature (RT) and then cut in two. The first part was incubated with the primary antibody (J2-scicons) diluted at 1:600 in blocking solution for 1h at RT. The second one with the 2 additional poly(I:C) lanes was not incubated with the J2 primary antibody and then treated the same way as the first membrane. After washing twice with washing buffer (0.1M maleic acid, 0.15M NaCl, pH7.5- 0.3% (v/v) tween 20) for 15 min at RT, membranes were incubated with appropriate AP-conjugated secondary antibody (Goat anti-mouse, SIGMA#A0162) diluted 1:5000 in blocking solution. After washing, color revelation was performed by incubating the membrane in color substrate solution (2% NBT/BCIP stock solution (Roche Cat. No. 11681451001) diluted in a detection buffer composed of 0.1M Tris-HCl-0.1M NaCl, pH 9.5) in the dark. Membranes were scanned to TIFF files using the Ilsemoquentdenous™ Version 10 (Max®) with no contrast modifications.

Acknowledgements

C.M. and M.L. are grateful to A. Pérignon and D. Regler from the “Comité Régional de Conchyliculture de Méditerranée” and E. Gervasoni from the Cepralmar for their support throughout the project and help on the field. C.M. is very grateful to Delphine Destoumieux-Garzon for team leadership and continuous support. The authors wish to thank P. Haffner, A. Delort, M. Leroy and the IHPE MIMM team for laboratory assistance and help during the multiple injection trials. We thank M. Eychenne for pJGFPH plasmid. The authors acknowledge the use of the facilities of the experimental platform of the Ifremer Palavas Station; the Ifremer nursery team in Bouin (France); the FINA Ifremer program and the DECIPHER project (ANR-14-CE19-0023) for SPF oyster production. C.M. and M.L. would like to thank Jean-Michel Escoubas, Yannick Labreuche, T.J. Green and Arnaud Huvet for manuscript improvements. M.L. was supported by grant from the Perpignan University (UPVD) and Ifremer. This work was part of the PROVIGAS project (“Protection antivirale de l’huître *Crassostrea gigas*” - antiviral protection of the Pacific oyster) financially supported by “la région Occitanie/ Pyrénées-Méditerranée” (project call “Chercheuse(r) d’avenir” 2013) and Ifremer.

Author contributions statement

Conceptualization, C.M., M.L.; Writing original draft, C.M., M.L.; Writing corrections C.M., M.L., B.G., M.P., A.S.; Sample treatments C.M., M.L., A.V. Production of biologic material, B.P.; Biostatistics treatment, M.L.; M.L. supervision, C.M., B.G. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

All authors concur to declare that there are no professional or personal competing interests regarding this original work.

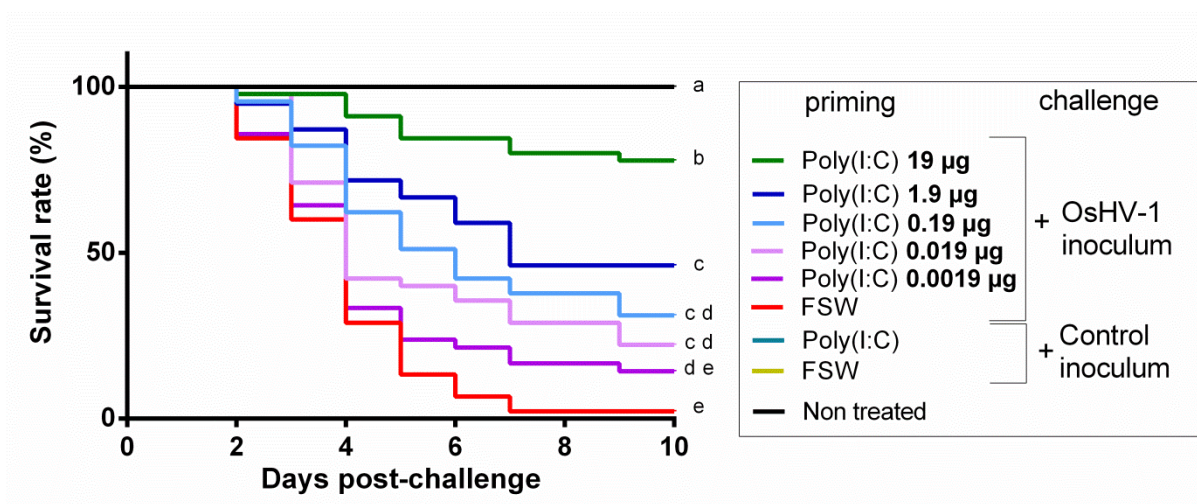
Additional information

Competing financial interests: All authors concur to declare that there are no financial competing interests regarding this original work.

Additional-supplementary files

Supplementary figure 1 S: Poly(I:C) specifically protects against viral infection in a dose dependent manner

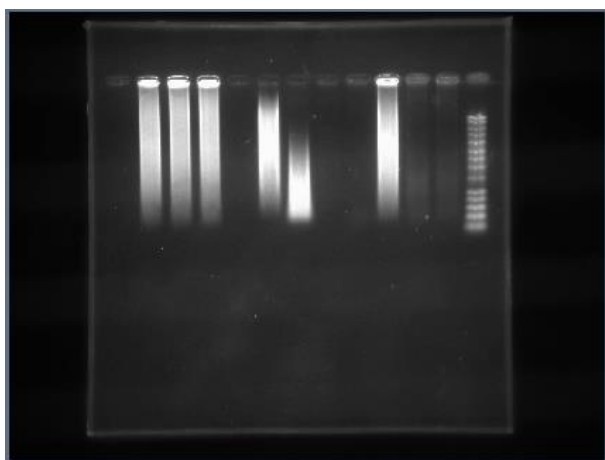
Kaplan–Meier survival curves generated from spats primed by injection with poly(I:C) HMW at different doses (19µg, 1.9µg, 0.19µg, 0.019µg or 0.0019µg per g of oyster) and injected 1 day post-priming with OsHV-1 µvar homogenate (2.3×10^7 copies of DP per oyster). Priming with sterile filtered seawater (FSW) or poly(I:C) (19µg per gram of oyster) before challenge with control inoculums was used as control (lines are hidden behind non-treated control). Mortalities were monitored for each treatment group comprising 45 oysters (15 per tank) for 10 days after infection. Different letters next to the graphed lines indicate statistically significant difference among treatment with a-b corresponding to p -value <0.05; b-c to p -value <0.01; c-d to p -value <0.001; d-e to p -value <0.01 (log-rank test, n=45).



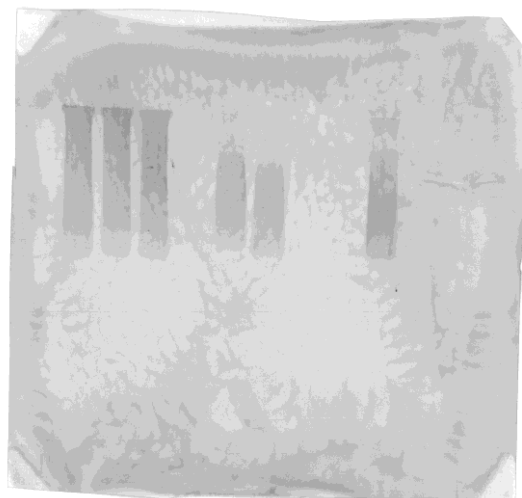
Supplementary figure 2S: Immuno-northern-blotting for Poly(I:C) persistence assay

a.Uncropped image of Poly(I:C) electrophoresis referencing to Figure 6a. **b.**Uncropped image of poly(I:C) immuno-localized using the J2 antibody (Scicons) referencing to Figure6b.**c.**Uncropped image of control membrane for immune-northern-blotting: 2 lanes loaded with 1 μ g of poly(I:C) were separated on 1% TAE agarose gel and blotted onto the same membrane. Membrane was cut in two and one part (Figure 6b and supplementary Figure 2sb) was treated with the J2 antibody whereas for the other part (supplementary Figure 2Sc) was only treated with the secondary antibody.

a.



b.

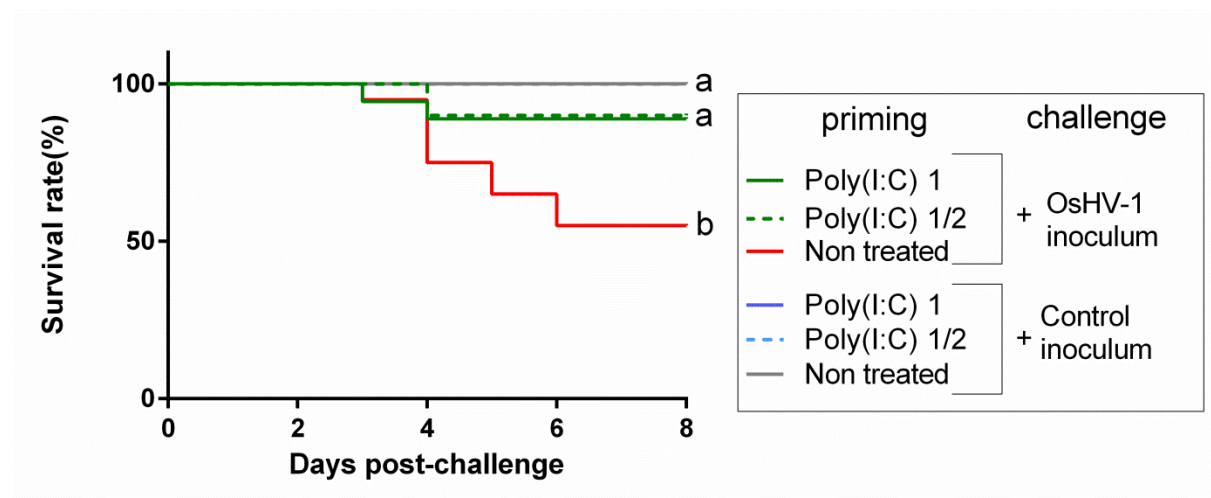


c.



Supplementary figure 3S: Poly(I:C) protection through bath treatment

Kaplan–Meier survival curves were generated from spats exposed after anesthesia to two different poly(I:C) bath treatments ((1) $76\mu\text{g.mL}^{-1}$, solid green and blue lines or (1/2) $38\mu\text{g.mL}^{-1}$, dotted green and blue lines) or only anesthetized as control (red and grey lines) during 2h30. Twenty four hours after treatment, oysters were injected with OsHV-1 homogenate (3.6×10^7 copies of DP gene per oyster; solid green, dotted green and red line) or with a pathogen free control homogenate (0 copies of DP gene per oyster; solid blue, dotted blue and grey line). Mortalities in groups of 20 oysters per treatment were monitored for 8 days after injection. Different letters next to the graphed lines indicate statistically significant difference among treatment at p -value <0.05 (log-rank test; $n=20$).



References

- 1 Criscitiello, M. F. & de Figueiredo, P. Fifty shades of immune defense. *PLoS Pathog* **9**, e1003110 (2013).
- 2 Kurtz, J. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes Infect* **6**, 1410-1417 (2004).
- 3 Sadd, B. M. & Schmid-Hempel, P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Curr Biol* **16**, 1206-1210 (2006).
- 4 Kurtz, J. & Franz, K. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* **425**, 37-38 (2003).
- 5 Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R. & Barillas-Mury, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* **329**, 1353-1355 (2010).
- 6 Cooper, E. L., Rinkevich, B., Uhlenbruck, G. & Valembois, P. Invertebrate immunity: another viewpoint. *Scand J Immunol* **35**, 247-266 (1992).
- 7 Portela, J. *et al.* Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. *J Innate Immun* **5**, 261-276 (2013).
- 8 Schmid-Hempel, P. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. *Bioessays* **27**, 1026-1034 (2005).
- 9 Netea, M. G. & van der Meer, J. W. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe* **21**, 297-300 (2017).
- 10 Netea, M. G. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *Eur J Clin Invest* **43**, 881-884 (2013).
- 11 Milutinovic, B., Peuss, R., Ferro, K. & Kurtz, J. Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology (Jena)* **119**, 254-261 (2016).
- 12 Contreras-Garduno, J. *et al.* Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol Entomol* **41**, 351-366 (2016).
- 13 Tidbury, H. J., Pedersen, A. B. & Boots, M. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proc Biol Sci* **278**, 871-876 (2011).
- 14 Rechavi, O., Minevich, G. & Hobert, O. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell* **147**, 1248-1256 (2011).
- 15 Chang, Y. H., Kumar, R., Ng, T. H. & Wang, H. C. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Dev Comp Immunol* (2017).
- 16 Sire, C., Rognon, A. & Theron, A. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* **117** (Pt 2), 117-122 (1998).
- 17 Pinaud, S. *et al.* A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathog* **12**, e1005361 (2016).
- 18 Salvi, D. & Mariottini, P. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zool J Linn Soc-Lond* **179**, 263-276 (2017).
- 19 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).
- 20 Pernet, F. *et al.* Spatial and Temporal Dynamics of Mass Mortalities in Oysters Is Influenced by Energetic Reserves and Food Quality. *Plos One* **9** (2014).
- 21 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).
- 22 Zhang, T. *et al.* The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **45**, 141-150 (2014).
- 23 Li, Y. *et al.* The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev Comp Immunol* **71**, 59-69 (2017).

- 24 Gowen, B. B. *et al.* TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *J Immunol* **178**, 5200-5208 (2007).
- 25 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **413**, 732-738 (2001).
- 26 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384 (2010).
- 27 Gosu, V., Basith, S., Kwon, O. P. & Choi, S. Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. *Molecules* **17**, 13503-13529 (2012).
- 28 Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R. & Paludan, S. R. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**, 5059-5064 (2006).
- 29 Pauletto, M. *et al.* Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus replication. *Journal of Experimental Biology, in press* (2017).
- 30 Green, T. J. & Montagnani, C. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 muvar). *Fish Shellfish Immunol* **35**, 382-388 (2013).
- 31 Green, T. J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N. & Speck, P. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **36**, 151-157 (2014).
- 32 Green, T. J., Helbig, K., Speck, P. & Raftos, D. A. Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Mol Immunol* **78**, 113-120 (2016).
- 33 Vanhove, A. S. *et al.* Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environ Microbiol* (2014).
- 34 Mian, M. F. *et al.* Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. *J Leukoc Biol* **94**, 1025-1036 (2013).
- 35 Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P. & Huvet, A. In vivo RNA interference in oyster--vasa silencing inhibits germ cell development. *FEBS J* **276**, 2566-2573 (2009).
- 36 Shim, M. S. & Kwon, Y. J. Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J* **277**, 4814-4827 (2010).
- 37 Schlee, M. & Hartmann, G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol* **16**, 566-580 (2016).
- 38 Orzalli, M. H. *et al.* cGAS-mediated stabilization of IFI16 promotes innate signaling during herpes simplex virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E1773-1781 (2015).
- 39 Barber, G. N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* **23**, 10-20 (2011).
- 40 Yoneyama, M. & Fujita, T. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 545-551 (2007).
- 41 Goubau, D., Deddouche, S. & Reis e Sousa, C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* **38**, 855-869 (2013).
- 42 Dempsey, A. & Bowie, A. G. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology* **479-480**, 146-152 (2015).
- 43 Chen, Q., Sun, L. & Chen, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* **17**, 1142-1149 (2016).
- 44 Herbst-Kralovetz, M. M. & Pyles, R. B. Quantification of poly(I:C)-mediated protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol* **80**, 9988-9997 (2006).
- 45 Chen, H., Wang, D. L. & Liu, Y. L. Poly (I:C) transfection induces mitochondrial-mediated apoptosis in cervical cancer. *Mol Med Rep* **13**, 2689-2695 (2016).
- 46 Green, T. J., Raftos, D., Speck, P. & Montagnani, C. Antiviral immunity in marine molluscs. *J Gen Virol* **96**, 2471-2482 (2015).
- 47 Escoubas, J. M. *et al.* in *Encyclopedia of Immunobiology* Vol. 1 (ed M.J.H. Ratcliffe) 417-436 (Oxford: Academic Press, 2016).
- 48 Zhang, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49-54 (2012).
- 49 He, Y. *et al.* Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol* **46**, 131-144 (2015).
- 50 Zhang, Y., Yu, F., Li, J., Tong, Y. & Yu, Z. The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **40**, 466-471 (2014).

- 51 Green, T. J., Benkendorff, K., Robinson, N., Raftos, D. & Speck, P. Anti-viral gene induction is absent upon secondary challenge with double-stranded RNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **39**, 492-497 (2014).
- 52 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).
- 53 Green, T. J., Vergnes, A., Montagnani, C. & de Lorgeril, J. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Vet Res* **47**, 72 (2016).
- 54 Zhang, L. *et al.* Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep* **5**, 8693 (2015).
- 55 Crisan, T. O., Netea, M. G. & Joosten, L. A. Innate immune memory: Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* **46**, 817-828 (2016).
- 56 Collins, S. E. & Mossman, K. L. Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* **25**, 525-531 (2014).
- 57 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).
- 58 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).
- 59 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).
- 60 Melvin, J. A. & Bomberger, J. M. Compromised Defenses: Exploitation of Epithelial Responses During Viral-Bacterial Co-Infection of the Respiratory Tract. *PLoS Pathog* **12**, e1005797 (2016).
- 61 Bakaletz, L. O. Viral-bacterial co-infections in the respiratory tract. *Curr Opin Microbiol* **35**, 30-35 (2016).
- 62 Moret, Y. & Siva-Jothy, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc Biol Sci* **270**, 2475-2480 (2003).
- 63 Roth, O. & Kurtz, J. Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Dev Comp Immunol* **33**, 1151-1155 (2009).
- 64 Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D. S. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog* **3**, e26 (2007).
- 65 de Clercq, E. Degradation of poly(inosinic acid) - poly(cytidylic acid) [(I)n - (C)n] by human plasma. *Eur J Biochem* **93**, 165-172 (1979).
- 66 Masood, M., Raftos, D. A. & Nair, S. V. Two Oyster Species That Show Differential Susceptibility to Virus Infection Also Show Differential Proteomic Responses to Generic dsRNA. *J Proteome Res* **15**, 1735-1746 (2016).
- 67 Brown, T. & Rodriguez-Lanetty, M. Defending against pathogens - immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian. *Sci Rep* **5**, 17425 (2015).
- 68 Green, T. J. *et al.* Oyster viperin retains direct antiviral activity and its transcription occurs via a signalling pathway involving a heat-stable hemolymph protein. *J Gen Virol* (2015).
- 69 Coustau, C., Kurtz, J. & Moret, Y. A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate-Parasite Interface. *Trends Parasitol* **32**, 353-355 (2016).
- 70 Lin, Y. C. *et al.* Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. *Plos One* **8**, e69722 (2013).
- 71 Musthaq, S. K. S. & Kwang, J. Evolution of specific immunity in shrimp - A vaccination perspective against white spot syndrome virus. *Developmental and Comparative Immunology* **46**, 279-290 (2014).
- 72 Greenwood, J. M. *et al.* Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. *BMC Genomics* **18**, 329 (2017).
- 73 Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. & van Hulten, M. C. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol* **78**, 2057-2061 (2004).
- 74 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).
- 75 Schikorski, D. *et al.* Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res* **155**, 28-34 (2011).
- 76 Gay, M., Renault, T., Pons, A. M. & Le Roux, F. Two *vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis Aquat Organ* **62**, 65-74 (2004).

- 77 Corbeil, S., Faury, N., Segarra, A. & Renault, T. Development of an in situ hybridization assay for
the detection of ostreid herpesvirus type 1 mRNAs in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Virol*
Methods **211**, 43-50 (2015).
- 78 Suquet, M. *et al.* Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat Living Resour* **22**, 29-34
(2009).
- 79 Webb, S. C., Fidler, A. & Renault, T. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1
(OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* **272**, 126-139 (2007).
- 80 Davison, A. J. *et al.* A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**, 41-53 (2005).

III. Synthèse des résultats et conclusions

Nous avons étudié le priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* avec une approche phénoménologique pour en définir les limites en terme d'impact sur la survie à OsHV-1, de spécificité et de durée, pour répondre à différentes questions:

Questions (i) et (ii) : « Le poly(I:C) protège-t-il des mortalités virales et est-ce que cette protection est spécifiquement induite par le poly(I:C) ? »

Oui, l'injection de poly(I:C) 24h avant une infection virale à l'OsHV-1 protège des mortalités. Cependant, d'autres types d'acides nucléiques sont capables d'induire cet effet protecteur. Ces différents acides nucléiques sont : (i) du poly(I:C) à haut poids moléculaire (poly(I:C) HMW ; 1.5-8kb) ; (ii) du poly(I:C) à bas poids moléculaire (<1kb) ; (iii) de l'ARN double brin synthétique dessiné sur la GFP ; (iv) ou sur l'OsHV-1 et (v) de l'ARN simple brin dessiné sur l'OsHV-1. L'injection de ces différents types d'acides nucléiques 24h avant l'infection virale permettait de protéger les huîtres des mortalités, allant de 100% à 78% de survie, le poly(I:C) HMW étant le plus efficace. Par ailleurs, l'analyse de la charge virale chez ces animaux stimulés avec les différents acides nucléiques a permis de confirmer les résultats précédents d'une charge virale réduite chez les stimulés par rapport à ceux non stimulés.

Question (iii) : « Est-ce que le poly(I:C) protège uniquement du virus OsHV-1 ? »

Le poly(I:C) protège des virus dont l'OsHV-1, mais ne protège pas face à une infection bactérienne par *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Cette observation suggère un degré de spécificité de protection antivirale. Cependant à la lumière des travaux réalisés chez d'autres invertébrés montrant des degrés divers de spécificité et de protection croisées, nos résultats nécessiteraient d'être validés en testant l'effet de la stimulation du poly(I:C) lors d'infections par d'autres souches bactériennes pathogènes d'huîtres.

Question (iv) : « Le poly(I:C) est-il efficace pour protéger les huîtres pendant un épisode de surmortalité massive affectant les juvéniles en milieu naturel ? »

Oui, l'injection de poly(I:C) à des juvéniles d'huîtres avant d'être déposés en milieu naturel au milieu de parcs ostréicoles, a permis d'améliorer le taux de survie de 62% en moyenne, avec en moyenne 89.5% des huîtres stimulées avec du poly(I:C) survivantes 30 jours après la mise en eau contre seulement 27.5% en moyenne pour les huîtres non stimulées.

Question (v) : « Quelle est la durée de la protection induite par le poly(I:C) ? »

Une durée minimale de 5 mois. Des huîtres ayant reçu une injection unique de poly(I:C) entre 24h et 126 jours (environ 4 mois) avant (i) des infections virales à l'OsHV-1 réalisées au laboratoire ou (ii) déployées dans le milieu naturel, ont permis de montrer un effet protecteur du poly(I:C). Pour les huîtres infectées en milieu contrôlé, les tests n'ont pas été réalisés au-delà de 126 jours, et en milieu naturel, les huîtres étaient encore protégées 1 mois après la mise en eau soit 5 mois après l'injection de poly(I:C). Cette protection ne proviendrait pas d'une stimulation continue du poly(I:C) puisque nous avons démontré par marquage anticorps que le poly(I:C) était rapidement dégradé, entre 24h dans l'hémolymphe et 48h dans l'eau de mer. Toutefois, il sera nécessaire de tester la stabilité du poly(I:C) au sein des tissus de l'huître.

En conclusion, ces résultats identifiés grâce à notre modèle et l'utilisation du poly(I:C) à haut poids moléculaire comme stimulant ont permis de mieux caractériser le phénomène de protection antivirale chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Le poly(I:C) protège des mortalités lors d'infections virales à l'OsHV-1 mais est inefficace contre une bactérie pathogène (introduisant la notion de spécificité). La stimulation protège sur le long terme et suggère une forme de mémoire immunitaire. L'ensemble de ces résultats démontre l'existence d'un priming immunitaire antiviral chez *C. gigas*. Par ailleurs, ce modèle poly(I:C)/*C. gigas*, peut fournir un très bon outil dans la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents au priming immunitaire antiviral.

IV. Données complémentaires

A. Le priming immunitaire antibactérien

Dans le contexte de cette maladie poly-microbienne, nous avons montré un priming immunitaire antiviral efficace pour protéger les huîtres d'infections virales. Cependant, dans cette maladie poly-microbienne, l'huître est soumise à différentes populations bactériennes au cours de sa vie, dont certaines sont pathogènes (LeRoux et al. 2015, Bruto et al. 2017). Des travaux récents réalisés chez l'huître ont permis de révéler l'existence d'un priming immunitaire antibactérien lors de stimulations des huîtres avec des bactéries du genre *Vibrio*, du clade Splendidus (Zhang et al. 2014, Liu et al. 2016, Li et al. 2017a). Ces travaux se sont focalisés sur les réponses cellulaires de l'huître mise en place au cours de ce priming mais ne se sont pas intéressés à l'effet de cette primo-stimulation en termes de survie lors de la seconde infection. C'est un aspect que nous avons abordé au cours de ma thèse au travers de travaux préliminaires.

Pour identifier si le priming immunitaire antibactérien est efficace pour protéger des mortalités lors d'infections bactériennes, nous avons injecté 135 naissains standardisés de l'Ifremer de la cohorte 2015_1 avec chacune 50µl d'eau de mer contenant 1.88×10^8 CFU de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (Gay et al. 2004) tués à la chaleur (90°C, 10min) (LGP32 HK). Cette solution a été contrôlée comme dépourvue de bactéries vivantes par étalement de 50µl de cette solution sur milieu LB NaCl. Comme contrôle de primo-stimulation, 135 huîtres ont été injectées avec le même volume d'eau de mer autoclavée et filtrée à 0.2 µm (FSW). Vingt-quatre heures après cette primo stimulation, nous avons infecté ces différentes huîtres, soit avec un inoculum viral enrichi en OsHV-1 (1.43×10^8 unités génomiques / huîtres) (Schikorski et al. 2011b), soit avec 1.88×10^8 CFU/huître de *Vibrio tasmaniensis* LGP32, soit avec de l'eau de mer autoclavée et filtrée à 0.2µm comme contrôle négatif d'infection. Chaque condition de traitement a été réalisée en trois réplicas en déposant 15 huîtres dans des bacs contenant 800ml d'eau de mer filtrée. Un suivi de mortalité quotidien a été réalisé pendant 15 jours (**Figure 15**) et les huîtres mortes ont été retirées des bacs d'infection.

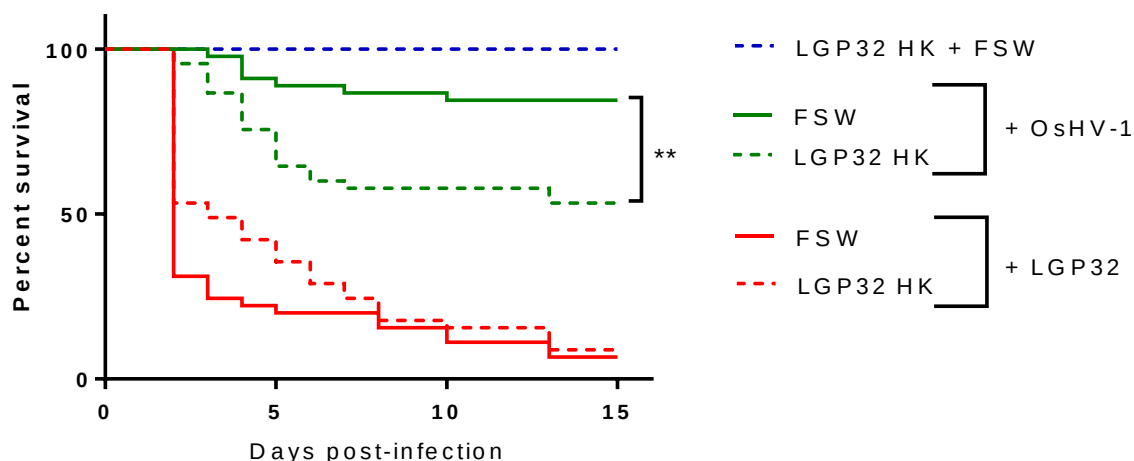


Figure 15 : Effet du priming bactérien sur la survie des huîtres lors d'infections bactériennes. Courbe de survie d'huîtres injectées avec de l'eau de mer autoclavée et filtrée à 0.2µm (FSW, courbes pleines) ou avec 1.88×10^8 CFU/huître de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 tués à la chaleur (LGP32 HK, courbes pointillées), puis injectées 24h après par 1.43×10^8 copies de virus OsHV-1/huître (vert) ou par 1.88×10^8 CFU/huître de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (rouge) ou avec de l'eau de mer autoclavée et filtrée à 0.2µm (bleu). Test de log-rank ; p -value=0.0013 ; $n=45$.

Concernant les infections bactériennes, le taux de survie des huîtres non stimulées avec les bactéries tuées (*i.e.* FSW + LGP32) est faible, avec 6.7% de survie 15 jours après l'infection (courbe pleine, rouge). En revanche, chez les huîtres primo-stimulées avec les bactéries tuées (courbe pointillée, rouge) bien que le taux de survie final soit similaire à la condition contrôle 8.9% de survie à 15 jours, la cinétique de la courbe de survie est différente. En effet, durant les 4 premiers jours d'infection, le taux de survie est amélioré de 20% chez les huîtres stimulées avec les bactéries tuées par rapport aux huîtres de la condition contrôle. Cette protection diminue ensuite pour finalement atteindre à 15 jours le même taux de survie que les huîtres non stimulées. Ces résultats préliminaires montrent pour la première fois que la stimulation d'huîtres par des bactéries tuées ne permet pas de protéger des mortalités aux doses utilisées dans le contexte de notre étude. Il est possible que cette inefficacité soit due à la durée entre la stimulation et l'infection qui pourrait ne pas avoir permis une réponse immunitaire efficace et adaptée en 24h. Cependant, nos résultats suggèrent pour la première fois que cette primo stimulation des huîtres par *Vibrio tasmaniensis* LGP32 permet de ralentir significativement la cinétique d'infection d'au moins 4 jours lors d'infections bactériennes. Plusieurs hypothèses peuvent être émises par rapport à cette observation. Nous pouvons émettre comme première hypothèse que le délai entre la primo-stimulation et l'infection était trop court pour permettre une activation efficace des mécanismes impliqués dans le priming immunitaire. Dans ce cas, il serait intéressant de répéter cette expérimentation avec des délais plus importants entre la

primo-stimulation et l'infection. Par ailleurs, nous pouvons émettre comme hypothèse que l'injection de bactéries tuées dans les huîtres puisse saturer les récepteurs hémocytaires et ainsi ralentir le processus infectieux lors de l'injection des bactéries *V. tasmaniensis* LGP32 virulentes. Des d'études réalisées par d'autres auteurs sur le priming immunitaire antibactérien chez l'huître (Liu et al. 2016) suggèrent l'implication de la superoxide dismutase extracellulaire (EcSOD) dans les mécanismes de priming immunitaire. Cependant, il est difficile de pouvoir comparer leurs observations avec nos résultats puisque la souche bactérienne qu'ils ont utilisée dans leurs expérimentations est un *Vibrio splendidus* identifié chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* dont l'effet sur l'huître est encore inconnu (Liu et al. 2013a). Ensuite, nous pouvons émettre comme hypothèse que les mécanismes de la phagocytose pourrait être saturés par les bactéries tuées primo-injectées et ainsi les *V. tasmaniensis* LGP32 virulentes ne pourraient plus entrer dans les hémocytes et exercer leur pouvoir pathogène (Duperthuy et al. 2011, Vanhove et al. 2016). Concernant cette hypothèse, d'autres travaux réalisés sur le priming immunitaire antibactérien chez l'huître ont suggéré un rôle important de l'augmentation de l'activité de phagocytose dans ce phénomène (Zhang et al. 2014). Ces observations ont été d'ailleurs soutenues par des travaux montrant une augmentation de l'hématopoïèse suite à une primo-stimulation par des bactéries tuées (Li et al. 2017a). Ces résultats pourraient aller dans le sens de notre hypothèse impliquant le rôle de la phagocytose dans cette protection transitoire. D'une part, pour confirmer l'hypothèse que les mécanismes de phagocytose sont saturés par les bactéries injectées lors de la primo-stimulation, les contenus hémocytaires pourraient être analysés. Pour cela il pourrait être envisagé de stimuler des huîtres avec *Vibrio tasmaniensis* LGP32 tués à la chaleur alors que d'autres huîtres seraient non stimulées. Vingt-quatre heures après, l'ensemble de ces huîtres seraient infectées avec la souche *Vibrio tasmaniensis* LGP32 porteuse d'un plasmide exprimant la GFP. A partir des hémocytes prélevés dans ces différentes conditions, si la phagocytose est saturée par les bactéries tuées primo-injectées, il y aurait très peu de bactéries GFP phagocytées et par mesure de fluorescence, nous pourrions conclure si ce phénomène est impliqué ou non. De plus, pour confirmer cette hypothèse, il serait alors intéressant de pouvoir bloquer ce mécanisme de phagocytose *via* l'utilisation de billes de latex pour ainsi confirmer le rôle de la phagocytose *in vivo*.

Concernant les infections virales, notre expérimentation nous a permis de montrer un taux de survie important de 84.4% 15 jours après l'infection chez les huîtres primo-injectées avec l'eau de mer puis infectées avec l'OsHV-1 (courbe pleine verte). En revanche, chez les huîtres primo-stimulées avec les bactéries *V. tasmaniensis* LGP32 tuées à la chaleur (courbe pointillée verte), il n'y a pas de protection croisée, au contraire les mortalités sont aggravées avec 53.3% de survie 15 jours après les infections. Des résultats obtenus récemment au laboratoire ainsi que des données de la littérature

suggèrent qu'il existe des réponses antivirales et antibactériennes bien distinctes mais dont les bases cellulaires, mécanismes d'activation voire de différenciation restent à établir (Zhang et al. 2015, Green et al. 2016b). Il se pourrait donc que dans notre étude, l'exposition préalable de l'huître à une bactérie pourrait induire une réponse spécifique antibactérienne lors du priming et empêcher l'hôte de mobiliser une réponse antivirale efficace lors de la rencontre avec le virus. Afin de pouvoir confirmer cette hypothèse, il serait important de pouvoir confirmer ces résultats dans un premier temps et de pouvoir comparer par une approche globale, les réponses immunitaires d'huîtres dans un contexte d'infection bactérienne ou virale. L'approche transcriptomique globale par RNA-seq réalisée dans le cadre de la thèse de Tristan Rubio (Thèse de Doctorat de Tristan Rubio, 2014-2017) lors d'infection bactérienne combinée à nos travaux réalisés sur l'étude des mécanismes du priming immunitaire lors d'une infection virale (cf Chapitre 1, Article 1) pourraient permettre de comprendre si l'immunité antibactérienne se met en place au détriment de l'immunité antivirale.

B. Le priming immunitaire trans-générationnel

Les travaux présentés dans l'article 1 (cf Chapitre 1, Article 1) ont permis de montrer l'existence d'un priming immunitaire antiviral efficace à l'échelle de l'individu sur le long terme. Afin d'aller plus loin dans l'étude de ce priming immunitaire antiviral, Green et collaborateurs en 2016 se sont intéressés au priming trans-générationnel chez l'huître (Green et al. 2016a). Ces travaux ont permis de montrer que la stimulation de géniteurs par le poly(I:C) 3 jours avant la reproduction permettait d'améliorer le taux de survie des larves D âgées de 24h lors d'infections virales à l'OsHV-1, pour une durée minimale de 96 heures (59.7% de survie en moyenne) par rapport à des larves issues de géniteurs non stimulées (18.9% de survie en moyenne). Ces résultats extrêmement encourageants notamment en termes d'application potentielle pour la profession ostréicole ont cependant soulevé différentes questions fondamentales sur l'origine de cette protection. Différentes études réalisées chez les invertébrés étudiant le priming immunitaire trans-générationnel (TGIP) ont montré que ce transfert vertical d'immunité pouvait être d'origine maternelle ou paternelle suivant les espèces (Roth et al. 2010, Zanchi et al. 2011). Dans le cadre de cette thèse, j'ai eu la chance d'obtenir une bourse de financement de 3 mois, qui m'a permis d'aller étudier ces questions avec le Dr Green et le Pr David Raftos au Sydney Institut of Marine Science. Les résultats préliminaires obtenus au cours de cette mission en Australie sont présentés ci-après.

Nos travaux se sont dans un premier temps intéressés à définir si la période de stimulation des géniteurs avant les reproductions pouvait influencer cette protection. Pour aborder cette question, nous avons injecté un lot d'huître, composé de 3 mâles et 6 femelles, avec du poly(I:C) 3 jours avant les reproductions (**Figure 16 B**). Un deuxième lot de géniteurs composé de 2 femelles et

de 6 mâles a été injectés avec du poly(I:C) 10 jours avant les reproductions (**Figure 16 C**). Comme contrôle négatif de stimulation, un dernier lot de 4 femelles et 5 mâles a été injecté avec de l'eau de mer 3 jours avant les reproductions (**Figure 16 A**). L'ensemble de ces expérimentations ont été coordonnées pour pouvoir réaliser les reproductions le même jour. Vingt-quatre heures après ces reproductions, les larves issues de chaque famille d'huître provenant des géniteurs stimulés avec du poly(I:C) 3 jours avant, 10 jours avant ou contrôles ont été divisées en deux lots distincts. Un lot a été infecté par le virus OsHV-1 par ajout d'une solution infectieuse contenant l'OsHV-1 dans l'eau d'élevage larvaire d'après le protocole de Green et collaborateurs en 2016 (Green et al. 2016a). Le second lot a servi de contrôle négatif et n'a pas été infecté (NC). Le taux de mortalité larvaire a été suivi quotidiennement pendant 2 jours dans l'ensemble de ces bassins d'élevages larvaires (**Figure 16 D**). Les suivis de taux de mortalité chez les différentes familles larvaires non infectées (**Figure 16 D**, NC) montrent un faible taux de mortalité entre 8% et 15% en moyenne pour toutes les conditions. Lors d'infections avec le virus OsHV-1 (**Figure 16 D**, OsHV-1), 2 jours après l'infection, chez les larves provenant de géniteurs non stimulés (**Figure 16 D**, OsHV-1, histogramme vert), le taux de mortalité est plus élevé avec 45% de mortalité en moyenne. Chez les larves provenant de géniteurs stimulés au poly(I:C) 3 jours avant les reproductions, le taux de mortalité est plus faible, similaire aux larves non infectées avec 14% de mortalité en moyenne (**Figure 16 D**, OsHV-1, histogramme rouge). En revanche, chez les larves provenant de géniteurs stimulées au poly(I:C) 10 jours avant les reproductions (**Figure 16 D**, OsHV-1, histogramme bleu), les larves ne sont pas protégées, le taux de mortalité est similaire à celui des larves provenant de géniteurs non traités (37% de mortalité en moyenne).

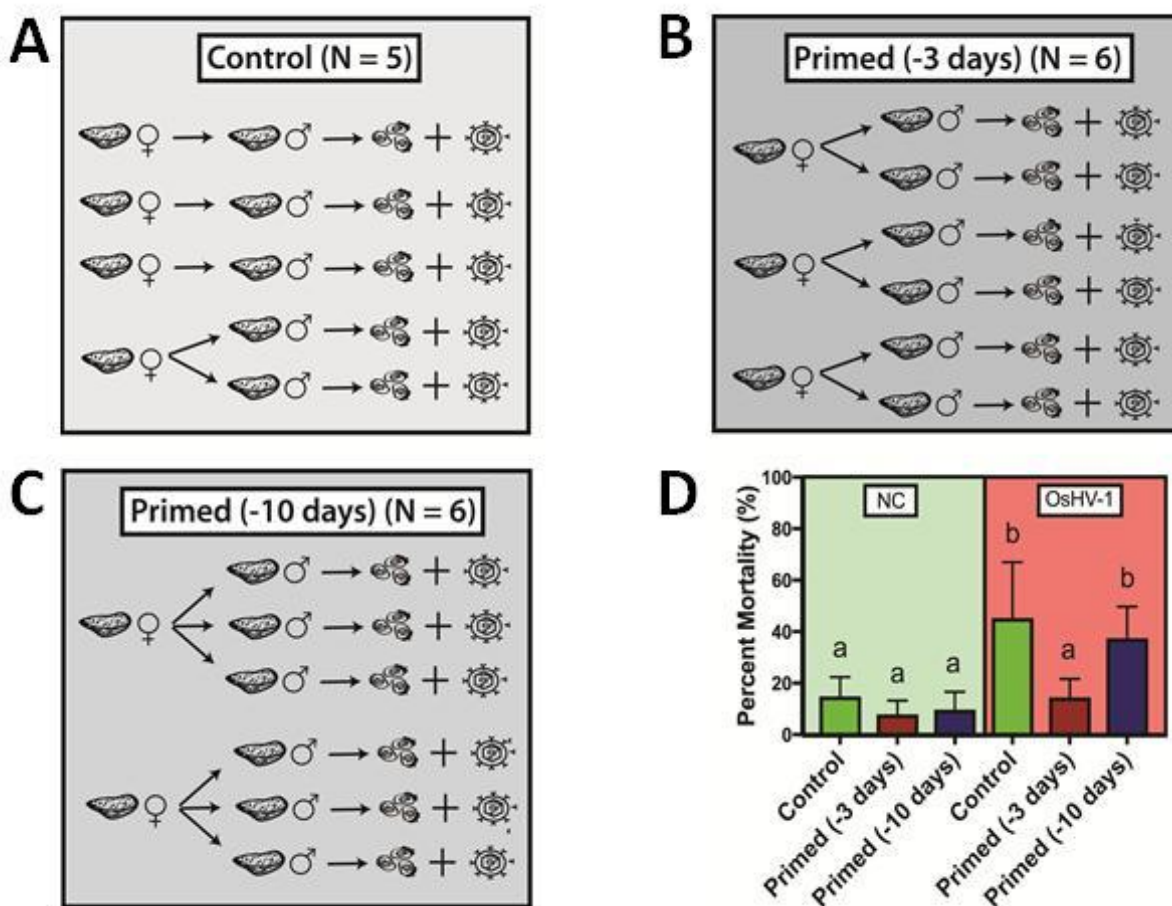


Figure 16 : Etude de la durée de la stimulation de géniteurs avant la reproduction pour le priming trans-générationnel. Schéma du design expérimental (A, B et C) et pourcentage de mortalité cumulé de larves lors d'infection à l'OsHV-1 (D). Le diagramme A représente les couples d'huîtres mâles et femelles injectés avec de l'eau de mer stérile 3 jours avant les reproductions et les diagrammes B et C, les couples d'huîtres injectés avec du poly(I:C) 3 jours avant les reproductions (B) ou 10 jours avant les reproductions (C). Les histogrammes correspondent au taux de mortalité cumulé, 2 jours après infection des larves âgées de 24h, issues de des différentes reproductions, avec le virus OsHV-1 ou non infectées (NC) (D). One-way Anova (p -value<0.05).

Ces résultats préliminaires confirment les résultats préalablement publiés chez l'huître, l'injection de poly(I:C) à des géniteurs 3 jours avant les reproductions permet de protéger la descendance larvaire âgée de 24h, contre des infections virales à l'OsHV-1 (Green et al. 2016a). Cependant, nos résultats suggèrent que cette protection transmise à la descendance est dépendante de la durée entre la stimulation avec le poly(I:C) et la reproduction. Si la stimulation des géniteurs est trop éloignée dans le temps des reproductions et donc des infections, les larves ne sont plus protégées. Nos résultats préliminaires tendent à montrer une protection transmise qui serait transitoire. Ces résultats préliminaires sont les premiers à ma connaissance suggérant la notion de dépendance du moment de la stimulation des géniteurs. Les travaux de Green et ses collaborateurs

en 2016 posaient la question des mécanismes sous-jacents à cette protection transmise à la descendance (Green et al. 2016a). Cette protection provient-elle d'une reprogrammation épigénétique lors de la primo-stimulation comme cela est suggéré dans quelques études sur d'autres modèles (Ottaviani et al. 2013, Norouzitallab et al. 2016, Vilcinskas 2016, Mukherjee et al. 2017)? Cette hypothèse reste encore à être explorée, puisque très peu de données concernant le rôle de reprogrammations épigénétiques dans les mécanismes participant au TGIP sont disponibles. La deuxième hypothèse qui pourrait-être émise serait une transmission directe par la mère. Chez d'autres organismes, des travaux ont montré cette transmission *via* des composants immunitaires comme des peptides antimicrobiens comme c'est le cas chez le poisson (Zhang et al. 2013a), de différents PAMPS bactériens comme des LPS, peptidoglycanes ou zymosan directement dans l'œuf chez l'abeille *Apis mellifera* (Salmela et al. 2015). Nous avons abordés cette hypothèse pour définir si la protection pouvait provenir de la mère et /ou du père.

Dans un second temps nos travaux ont donc porté sur visés à comprendre si dans le modèle huître, l'approvisionnement de la protection est d'origine maternelle et/ou paternelle, nous avons réalisé des expérimentations au cours desquelles des huîtres femelles ou des huîtres mâles ont été stimulées avec du poly(I:C). Pour déterminer l'effet de la stimulation maternelle, nous avons réalisé différentes familles d'huîtres à partir de reproductions entre des huîtres femelles injectées avec de l'eau de mer comme contrôles ou stimulées par le poly(I:C) 3 jours avant la reproduction, avec un seul mâle injecté avec de l'eau de mer (**Figure 17 a**). L'inverse a été réalisé pour étudier l'effet de la stimulation paternelle (**Figure 17 a**). Nous avons ainsi obtenu 17 familles d'huîtres ; 4 familles provenant de mères stimulées au poly(I:C) et 4 familles provenant de mère non stimulées ainsi que 4 familles provenant de pères stimulés au poly(I:C) et 5 familles de pères non stimulés (**Figure 17 a**). Vingt-quatre heures après les reproductions, une partie des larves D (âgées de 24h) provenant des différentes familles ont été infectées avec le virus OshV-1 par ajout d'une solution infectieuse contenant l'OshV-1 dans l'eau d'élevage larvaire. L'autre partie des larves servant de contrôle n'a pas été infectée (NC) (**Figure 17 b et c**). Le suivi de mortalité larvaire a été réalisé quotidiennement pendant 2 jours dont le taux de mortalité est présenté dans la figure 17 b pour l'effet maternel et la figure 17 c pour l'effet paternel.

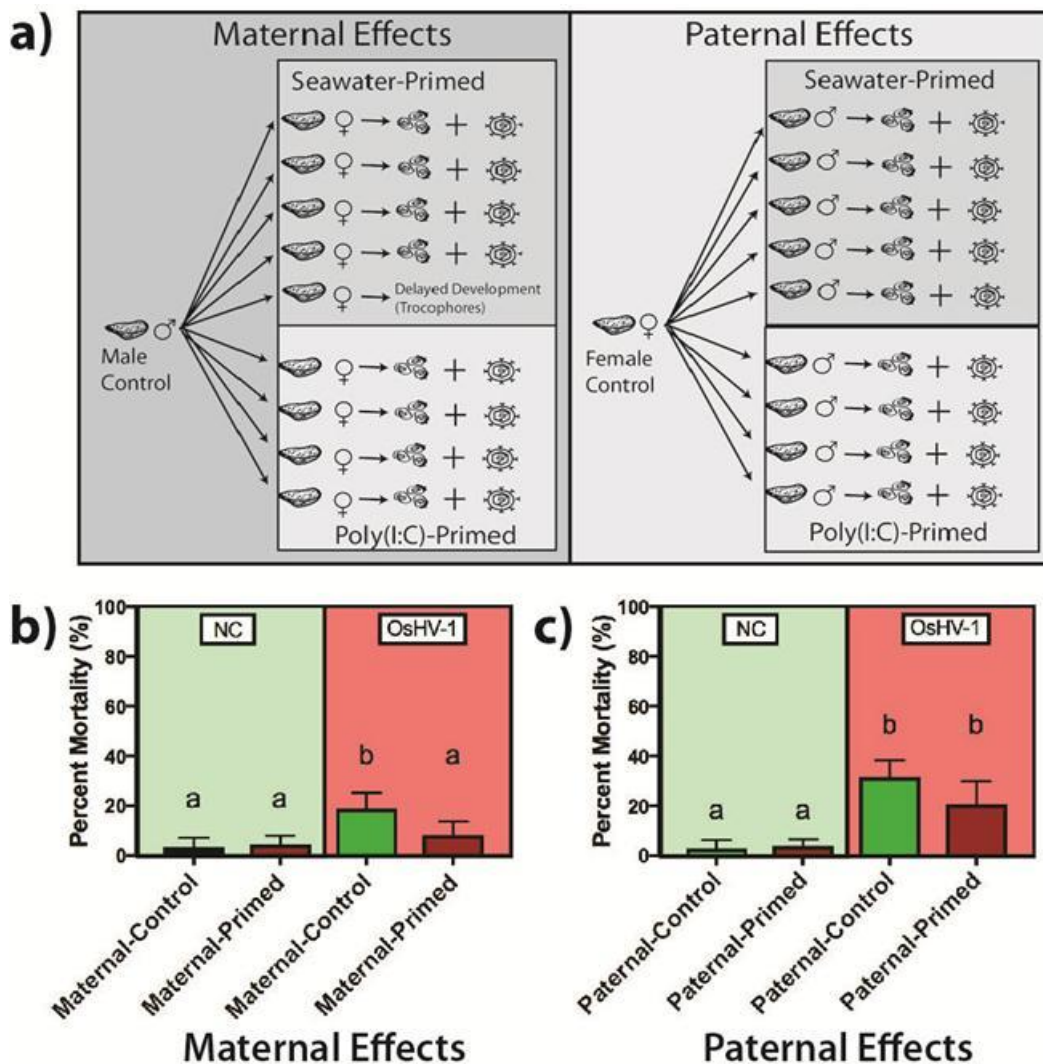


Figure 17 : Etude de l'origine maternelle ou paternelle du priming trans-générationnel. Design expérimental (a) et pourcentage de mortalité cumulé de larves d'huîtres lors d'infections à l'OsHV-1 (b et c). Le diagramme (a) représente les couples d'huîtres réalisés pour déterminer une provision maternelle ou paternelle au priming immunitaire antiviral trans-générationnel. Pour déterminer la provision maternelle (maternal effects) des huîtres femelles ont été injectées avec du poly(I:C) (poly(I:C)-primed) ou de l'eau de mer stérile (seawater-primed) et reproduites avec un seul mâle injecté avec de l'eau de mer. Pour déterminer la provision paternelle (paternal effects) des huîtres mâles ont été injectées avec du poly(I:C) (poly(I:C)-primed) ou de l'eau de mer stérile (seawater-primed) et reproduites avec une seule femelle injectée avec de l'eau de mer. Les histogrammes correspondent au taux de mortalité cumulé, 2 jours après infection, des larves âgées de 24h, issues de des différentes reproductions, avec le virus OsHV-1 ou non infectées (NC) (b et c).

Concernant les larves contrôles n'ayant pas reçu d'OsHV-1 (NC), provenant de père et de mères stimulées au poly(I:C) ou non, les taux de mortalité 2 jours après l'infection sont faibles et similaires entre les conditions (entre 2.8% et 4.4%). Dans les lots contrôles où les parents n'avaient pas été stimulés au poly(I:C), nous avons observé un taux de mortalité de 17.4% en moyenne (**Figure 17 b**, histogramme vert). Par contre, chez les larves provenant de mères stimulées au poly(I:C), le

taux de mortalité est significativement réduit avec 8.3% de mortalité en moyenne 2 jours après l'infection (**Figure 17 b**, histogramme rouge). Concernant les larves provenant de pères stimulés au poly(I:C) (**Figure 17 c**, histogramme rouge) ou non stimulés (**Figure 17 c**, histogramme vert), les taux de mortalités sont similaires et plus importants que pour les larves provenant de femelles traitées au poly(I:C) (20.6% et 31.5% en moyenne, respectivement). Ces résultats suggèrent donc une origine maternelle et non paternelle à cette protection trans-générationnelle. Ces résultats préliminaires tendent donc à supporter l'hypothèse d'un transfert de composants immunitaires ou immuno-modulateurs par l'intermédiaire des gamètes femelles. L'ensemble de ces travaux préliminaires devront par la suite être confirmés en reproduisant ces analyses. Ensuite, l'hypothèse d'un transfert, d'origine maternelle et transitoire, soulève la question de la nature des composés qui pourraient être transmis dans les ovocytes. Le premier candidat à rechercher est le poly(I:C) lui-même. Bien que le poly(I:C) soit dégradé rapidement dans l'hémolymphe et l'eau de mer en moins de 48h (cf Chapitre I, Article 1), sa persistance dans les différents tissus de l'huître n'est pas encore identifiée. La présence de poly(I:C) dans les ovocytes pourrait alors être transmise aux larves et dans ce cas, il ne s'agirait pas de priming trans-générationnel dans notre étude, mais de stimulation immunitaire directe sur les larves. Des analyses complémentaires du suivi de la persistance du poly(I:C) pourraient être envisagées par l'utilisation d'anticorps spécifiques du poly(I:C) ou le suivi de poly(I:C) marqué à la rhodamine (Masood et al. 2016, Masood et al. 2017). Par ailleurs, afin d'identifier si le contenu protéique des ovocytes pourrait influencer la protection des larves, une approche protéomique par la technique de migration sur gel en 2 dimensions (2D-PAGE) a été réalisée et est en cours d'analyse. Par ailleurs, nos résultats soulèvent la question de la durée de cette protection chez les larves. Il serait alors intéressant d'identifier la durée de la protection en réalisant le même protocole que nous avons utilisé puis d'infecter régulièrement de jeunes huîtres, à différents stades de vie, pour contrôler leur sensibilité aux infections virales à l'OsHV-1 et ainsi déterminer la durée dans le temps de cet effet protecteur.

Chapitre 2 :

Mécanismes du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse

Crassostrea gigas



Chapitre 2 :

Mécanismes du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*

I. Introduction

La seconde partie des résultats de cette thèse est consacrée à l'identification des mécanismes moléculaires sous-jacents au priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Le séquençage du génome de l'huître *C. gigas* (Zhang et al. 2012) a permis d'identifier *in silico* de nombreuses voies de signalisations antivirales conservées chez l'huître (Green et al. 2015a). Par ailleurs, différentes études se sont intéressées aux réponses transcriptomiques de l'huître lors d'infection à l'OshV-1, visant à comprendre les mécanismes moléculaire de l'huître lors d'infection à l'OshV-1 (Zhang et al. 2012, Green and Montagnani 2013, Jouaux et al. 2013, Green et al. 2014a, Segarra et al. 2014a, Segarra et al. 2014c, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016b). De plus, le génome de l'OshV-1 est séquencé et permet donc de suivre l'expression des transcrits viraux au cours d'une infection virale (He et al. 2015, Rosani et al. 2015).

Comme nous venons de le voir dans la description phénoménologique du priming immunitaire chez l'huître, l'injection de poly(I:C) à des huîtres naïves permet de les protéger des mortalités impliquant l'infection par l'OshV-1. Nous possédons donc un modèle nous permettant de comprendre les mécanismes sous-jacents du priming immunitaire antiviral chez l'huître.

Nous avons choisi d'étudier les mécanismes moléculaires du priming immunitaire antiviral chez l'huître par une approche transcriptomique globale par RNA-seq. Cette approche par « dual RNA-seq », permettra de suivre d'une part la réponse de l'hôte, mais aussi la réponse du virus. Cette étude vise à répondre principalement à deux questions : (i) quels sont les mécanismes mis en place en réponse au poly(I:C)? (ii) quels sont les mécanismes de protection antivirale au cours de l'infection par OshV-1 (au niveau des réponses de l'hôte et de l'activité du virus) ?

Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'une publication en préparation qui nécessitera la finalisation de quelques analyses complémentaires en vue d'une soumission prochaine de l'article.

II. Article 2: “Molecular mechanisms underlying antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*”

Molecular mechanisms underlying antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Keywords: Oyster; POMS; Poly(I:C); innate immunity; priming; OsHV-1; antiviral response; immune memory.

ABSTRACT

Since the last decade many discoveries evidenced a form of innate immune memory and specificity during a second encounter with a pathogen leading to an induced protection. This phenomenon called “innate immune priming” has been identified in a broad range of invertebrate species but studies were mainly focused on phenomenological approaches. The molecular mechanisms underlying this phenomenon are still unclear. The present study focuses on the mechanisms of antiviral immune priming in a Lophotrochozoan bivalve, the oyster *Crassostrea gigas*, in which innate immune priming has recently been identified using poly(I:C) as elicitor against the Ostreid herpes virus 1. Our dual RNA sequencing approach revealed for the first time that poly(I:C) induces a strong and complex antiviral response during priming. This response leads to an impaired OsHV-1 replication protecting the oyster. Our results originally suggests that poly(I:C) induces a sustained antiviral response supporting innate immune memory mechanisms.

INTRODUCTION

A wide range of organisms rely on innate immune systems to defend themselves and have thus long been considered incapable of developing adaptive immune mechanisms and to lack specificity. However, in recent years a paradigm shift has emerged showing that the innate immune system is more complex than previously thought. Indeed, multiple studies carried out on the innate immunity of invertebrates and plants have shown that they were capable to implement an improved immune response upon a second infection with a pathogen already encountered (Cooper et al. 1992, Kurtz and

Franz 2003, Kurtz 2004, Schmid-Hempel 2005, Portela et al. 2013, Cooper and Eleftherianos 2017). Interestingly, those observations were reinforced by the demonstration that, in vertebrates, cells of the innate immune system could also build immunological memory (Netea 2013, Netea and van der Meer 2017). Since this phenomenon cannot be associated with the conventional adaptive immunity found in vertebrates (lymphocyte and immunoglobulin-related), it has been associated with the term of innate immune priming, trained immunity or innate immune memory. Studies on immune priming are extremely heterogeneous in terms of invertebrate taxa studied ; host-pathogen interactions (mainly focused on interactions with bacteria and macro-parasites); elicitors used (lived or killed pathogens, active molecules); routes of inoculation (oral or injection); duration (from a few days to months); and degrees of specificity (for review, see (Milutinović and Kurtz 2016)). Consequently, numerous questions are still emerging about the very existence of innate immune memory/priming in invertebrates and more work is warranted to try and draw a comprehensive view of all these processes across phyla in regard to the diversity of interactions studied. To try and understand the nature and origin of these convergent or conserved innovations, a recurrent question is the molecular bases of these phenomena that are still poorly understood. Several mechanistic models have however been suggested to be associated with specificity and innate immune memory and priming. These processes have been suggested to rely either on (i) a sustained response consisting in a long-lasting up regulation of immune effectors after the first encounter with an intruder; (ii) a recalled response consisting in storing information after a first encounter with an intruder and then to generate a faster and stronger response after the second encounter; or (iii) an immune shift from cellular to humoral response between the first and the second encounter (Coustau et al. 2016). These models have been related to a variety of disparate molecular and cellular mechanisms. Epigenetic reprogramming has been considered as the main mechanism driving trained immunity in mammalian innate immune cells, allowing short-term adaptations of the epigenome (Netea et al. 2011, Quintin et al. 2014). In invertebrates, epigenetic mechanisms have also been investigated and have been implicated in immune priming processes (Vilcinskas 2016, Castro-Vargas et al. 2017). In addition, reports have suggested that alternative splicing of certain classes of immune recognition receptors (DSCAMs for Down syndrome cell adhesion molecule, FREPs for fibrinogen-related proteins) as well as humoral factors (antimicrobial peptides) and cellular processes as phagocytosis or hematopoietic proliferation that could also play major roles in specific recognition and immune priming (Watson et al. 2005, Dong et al. 2006, Roth and Kurtz 2009, Mone et al. 2010, Rodrigues et al. 2010, Hanington and Zhang 2011, Zhang et al. 2014, Armitage et al. 2015). Hence, untangling the molecular basis underlying invertebrate innate immune priming and memory from an increasing variety of phylogenetically distant models would shed light on the specific or universal characteristics of these phenomena.

In the present study, we focused on a member of the Lophotrochozoa phylum, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (or *Magallana gigas* (Salvi and Mariottini 2016), Thunberg 1793)), a main aquaculture species in the world. Lophotrochozoa is one of the widest groups in the animal reign that is still poorly explored regarding these processes. In this phylum, the few studies that have investigated the innate immune priming focused on only three models, the gasteropod *Biomphalaria glabrata*, and two bivalves, *Chlamys farreri* and *C. gigas*. The interaction between *B. glabrata* and the flat worm *Schistosoma mansoni* has been extensively studied. These studies have unraveled original mechanisms and established a new model for anti-parasite innate immune memory (Sire et al. 1998, Portela et al. 2013, Coustau et al. 2016, Pinaud et al. 2016). In bivalves, however, information is still scarce. A few studies focused on anti-bacterial immune priming. In the clam *Chlamys farreri*, authors showed improved survival and increased of transcripts expression of C-lectins upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum*, suggesting their involvement in the immune priming (Wang et al. 2013). In the Pacific oyster, studies on antibacterial priming with heat-killed *Vibrio splendidus* revealed an enhanced phagocytic response and hematopoiesis upon second infection with the same pathogen and a potential role of extracellular superoxide dismutase (Zhang et al. 2014, Liu et al. 2016, Li et al. 2017). But the main information regarding bivalve immune priming was obtained on antiviral immune priming in *C. gigas*. Indeed, the Pacific oyster has been plagued for years with a juvenile mortality syndrome with no existing prophylactic or therapeutic treatments. These recurrent mortalities are associated with a herpes-like virus OsHV-1 μ var (Ostreid herpes virus 1) (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011, Pernet et al. 2012) that have motivated researches on ways to protect these

commercially important animals and to deepen our knowledge on the antiviral innate immune system. To date, a few studies investigated the antiviral immune priming in invertebrates. Some studies showed failure of protection in models like *Drosophila melanogaster* (Longdon et al. 2013) while others showed success in other invertebrates such as insects, nematods and mostly crustaceans (Johnson et al. 2008, Rechavi et al. 2011, Tidbury et al. 2011). In the latter, numerous research suggested the potential application for anti-viral immune priming (pseudo- vaccination) to fight pathogenic viruses causing high mortality in shrimp farming (Chang et al. 2017). In these phyla, several molecular mechanisms have been suggested to be associated with antiviral immune priming from the RNA interference and interferon (IFN) pathways to epigenetics. In the oyster, previous work showed that prior injection of double stranded RNA (dsRNA) could induce an antiviral state hampering the replication of the OsHV-1 virus and induce protection of the oyster against that virus (Green and Montagnani 2013, Pauletto et al. 2017). In particular, we developed a model system to study antiviral immune priming in the oyster and oyster/virus interaction using a non-infectious elicitor, the viral mimic synthetic double stranded RNA (dsRNA) called poly(I:C) (Green and Montagnani 2013, Green et al. 2014, Lafont et al. 2017). Poly(I:C) has been known to be a key signature of viral infection and widely used as a viral mimic in vertebrates known to enhance antiviral defenses and IFN pathways (Matsumoto and Seya 2008, Yoshida and Azuma 2013). In the oyster, we showed that injection of poly(I:C) induced an antiviral state mitigating the viral load upon injection of a pathogenic Ostreid Herpesvirus-1 (OsHV-1) and IFN-like pathways genes (Green and Montagnani 2013, Green et al. 2014). More recently, we have demonstrated, from a phenomenological approach, that stimulation of oysters by poly (I:C) protects oysters against OsHV-1 infection (Lafont et al. in review). From our work, a long-term protection have been demonstrated since an infection carried out 4 months after poly(I:C) priming made it possible to protect the oysters, in a controlled environment, but also in the natural environment during a massive disease outbreak. This work demonstrated that antiviral immune priming is not restricted to arthropods and suggested the existence of a form of antiviral innate immune memory in the Pacific oyster. This phenomenological approach raised the question of the mechanisms underlying the antiviral immune priming. Different studies have shown that dsRNA, poly(I:C) and OsHV-1 injection could regulate genes from the IFN pathway but we still lack a comprehensive and broader view of the molecular mechanisms involved in antiviral immune priming and if it follows one of the previously described mechanistic models (Jouaux et al. 2013, Green et al. 2015, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016, Huang et al. 2017). This study is the first to carry out a global transcriptomic analysis *via* the RNA-seq technique to identify the molecular determinants involved in antiviral innate immune memory in an invertebrate. In addition, this study provides a better understanding of the immunological interactions between *Crassostrea gigas* and OsHV-1 and provides tools for the control of the disease affecting oysters in the world, representing important socio-economic issues.

MATERIAL & METHODS

Experimental animals

Experiment has been performed with specific pathogen free juveniles (SPF- *i.e.* free of mortality, negative for OsHV-1 detection and very low *Vibrio sp.* bacteria concentrations (Petton et al. 2013)) (3.5 months; 20.6 ± 0.1 mm shell length; 1.62 ± 0.1 g total weight; mean $\pm$ SE) of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (or *Magallana gigas* (Salvi and Mariottini 2016), Thunberg, 1793). Oysters were offspring of the F11 family of the DECIPHER program (ANR-14-CE19-0023) produced in July 2016. These oysters were chosen for their high susceptibility to the juvenile oyster syndrome (de Lorgeril et al., in prep.).

Preparation of pathogens/control inoculums

OsHV-1 inoculum (or OsHV-1 homogenate) was prepared according to (Schikorski et al. 2011) from moribund oysters experimentally infected with OsHV-1 in previous trials and frozen at -80°C. Viral DNA loads (OsHV-1 genomes copies. μ L⁻¹) in inoculums were estimated by quantitative PCR (qPCR) (see section: “Viral detection and quantification”). Control inoculum (control

homogenate) was prepared following the same protocol from healthy oysters showing no detectable amount of viral DNA. Inoculums were confirmed to be free of cultivable bacteria by plating 40µl on LB NaCl agar plates.

Priming experiment

As priming solution, poly(I:C) HMW (Invivogen, cat. code: tlr1-pic) was prepared following manufacturer's instructions and diluted in filtered seawater to a concentration of 475 ng.µL⁻¹. As a control, a solution of autoclaved and filtered seawater (FSW) at 0.02µm was used. For priming experiment, oysters were anesthetized in hexahydrate MgCl₂ (ACROS, cat.# 197530250, 50g.L⁻¹, 100 oysters.L⁻¹) according to Suquet *et al.* (Suquet *et al.* 2009) for 8h. Animals were then primed by injection of 40µL of priming solutions in the adductor muscle, using a 26-gauge needle attached to a multi-dispensing hand pipette. A group of oysters was kept untreated during all the experimentation (*i.e.* not primed, nor challenged). Oysters were reared in seawater at 15±1°C for 10 days. For challenge, oysters were re-anesthetized and injected with 20µL of OsHV-1 or control inoculum (same injection method). Each challenge was performed in 4 replicates in 5L seawater plastic tanks regulated at 20±1°C. In each tank, oysters were separated in two groups; one for survival monitoring (15 oysters) and one for sampling (75 oysters). Survival was followed daily and dead oysters were removed from tanks. Survival rates were analyzed for statistical differences between treatments by log-rank test on Kaplan-Meier survival curves using the computer software package GraphPad Prism® v. 6.0.

Sampling

Sampling was done at time 0 (T0), 12h (0.5 days), 1 day and 10 days post-priming (DPP) and at 0.5, 1, 2 and 7 days post-challenge (DPC). Sampling consisted in individually removing shells of each animal with a sterile scalpel blade and snap-frozen the whole oyster in liquid nitrogen by pool of 15 animals. Samples were stored at -80°C before grinding and homogenization by bead-beating (Retsch, Mixer Mill MM400) with a 20 mm stainless steel ball in a 50mL stainless steel bowls pre-chilled in liquid nitrogen. Powders obtained were then stored at -80°C and used for DNA and/or RNA extractions. Samples from T0, 0.5, 1 and 10 DPP, 0.5 and 1 DPC were used for DNA and RNA analyses, other samples for DNA analyses only (**Figure 1**).

Extraction of nucleic acids

Genomic DNA was purified from homogenized oyster powders using the Macherey-Nagel Genomic DNA from tissue kit (cat.# 740952.250) following manufacturer's instructions with an additional step of RNaseA treatment (Macherey-Nagel, cat.# 740505). The quality and quantity of genomic DNA was estimated on Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermoscientific®). Total DNA was resuspended to a final concentration of 20 ng.µL⁻¹ prior to qPCR. Total RNA was extracted from oyster pool powders (10 mg) homogenized in 500µL of Tri-Reagent (Invitrogen) by vortexing 2h at 4°C. Prior to extraction, insoluble materials were removed by centrifugation at 12000xg for 10min at 4°C and supernatant was incubated with 100µL of chloroform at 20°C for 3min. After centrifugation 12000xg for 15min at 4°C, total RNA in the aqueous phase was extracted using the Direct-Zol™ RNA Miniprep kit (Zymo Research; ref: R2052) according to the manufacturer's protocol. Quantity and purity of total RNAs were checked using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermoscientific®) and capillary electrophoresis (Agilent BioAnalyzer 2100).

Viral detection and quantification

Detection and quantification of OsHV-1 DNA was performed using quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were performed in duplicate using a Roche LightCycler 480 Real-Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University). PCR reaction volumes were 6 µl containing LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche), 100 nM of pathogen specific primers and 20 ng of DNA. PCR reactions were performed using an initial denaturation (95°C

for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 10s), hybridization (60°C, 20s) and elongation step (72°C, 25s). Virus specific primers targeting a region of the OsHV-1 genome predicted to encode a DNA polymerase catalytic subunit (DP) were chosen as previously described (ORF100, nucleotides 147655–153291 of AY509253): OsHVDPFor- ATTGATGATGTGGATAATCTGTG/OsHVDPRev- GGTAATACCATTGGTCTTGTTC) (Kovacs et al. 2005, Webb et al. 2007). For absolute quantification, DP amplification products were cloned into the pCR4-Topo vector and replicated in *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen). Plasmids were extracted using the Wizard Plus SV miniprep DNA purification system (Promega) and standard curves of known concentration of plasmid generated according to the Applied Biosystems manual of absolute real-time RT-PCR quantification (www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf). Absolute quantification of OsHV-1 genome copies in oyster samples was then estimated by comparing the observed Cp values to known plasmid standards from 10³ (limit of detection) to 10⁹ copies of DP. Viral load data, expressed in copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA, were transformed with the neperian logarithm function ($y = \ln(x + 1)$) and normality (D'Agostino and Pearson omnibus normality test, *p-value* <0.05) and variance homoscedasticity (Brown-Forsythe test, *p-value* <0.05) were tested. The effect of priming on OsHV-1 load was determined using one-way analysis of variance (Anova) using the computer software package GraphPad Prism® v. 6.0. Bonferroni's correction for multiple comparison test was used to compare the viral load from each post-challenge sample to 10 DPP.

RNA sequencing (RNA-seq)

Quality check of total RNA and total RNA integrity was analyzed by capillary electrophoresis (Agilent BioAnalyzer 2100) showing no degradation. mRNAs purification and library construction was performed by MGX (Montpellier Genomix, Institut de Génomique fonctionnelle, Montpellier, France) using the Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit according to the manufacturer's protocol. Libraries were sequenced by MGX in single-end, 50 bp length fragments, using an Illumina HiSeq 2500. RNA Sequence raw data will be deposited on GenBank (to be submitted).

OsHV-1 transcriptome analyses

All sequenced reads were aligned to the OsHV-1 reference genome (Refseq NC_005881.2;(Davison et al. 2005)) using Bowtie2 (Galaxy Version 2.3.0.1; (Langmead and Salzberg 2012)) (Supplemental table 1). The reads' count was performed using HTSeq-count (Galaxy version 0.6.1)(Anders et al. 2014). For each sample, each ORF at each time, the reads' count number was normalized (NC) accordingly to the following formula:

$$NC = \left(\frac{C_{ORF}}{S_{ORF}} \right) / \left(\frac{N_{reads}}{N_m} \right)$$

where: C_{ORF} = read count, S_{ORF} = size of the ORF in bp, N_{reads} = the total number of reads sequenced for a sample and N_m = the mean of all reads sequenced for all samples (= 37.40 million reads).

For each sample, all normalized reads' counts for all ORF were added up. The effect of priming on replication during OsHV-1 challenge was determined using one-way Anova as described in the "Viral detection and quantification" section. Bonferroni's correction for multiple comparison test was used to compare the NC from each post-challenge sample to 10 DPP (poly(I:C) or FSW).

Oyster transcriptome analyses

All data treatments were carried out on a local Galaxy server (<https://bioinfo.univ-perp.fr>) (Afgan et al. 2016). Reads quality was checked by FastQC software (version 0.11.5) and the high quality observed (Phred score >32) allowed us to keep all sequenced reads for further analyses. The sequencing depth was between 25.4 and 56.8 million reads per sample (**Supplementary Table 1**). Mapping on the *C.gigas* reference genome (version V9, (Zhang et al. 2012), (GenBank: AFTI000000000) was performed using RNA STAR (Galaxy version 2.4.0d-2) under defaults parameters (Dobin et al. 2013). The reads count was performed using HTSeq-count (Galaxy version 0.6.1), under the following parameters; union mode and minimum alignment quality = 10 (Anders et

al. 2014). With the bam file, the .gff file giving the genomic coordinate of annotated genes by Zhang *et al.* 2012 (Zhang *et al.* 2012) was used as inputs. DEseq2 (Galaxy version 2.11.39) was used to analyze the differential gene expression level between treatments (Love *et al.* 2014). Fold changes between treatments were considered significant when the adjusted *p-value* with the False Discovery Rate (FDR) (Benjamini-Hochberg procedure; (Benjamini and Hochberg 1995) was <0.05.

Gene ontology analysis

In order to identify biological functions affected by poly(I:C) priming, enrichment analyses were performed by a gene ontology (GO) analysis using a rank-based statistical test (Mann-Whitney U-test) combined to an adaptive clustering (Nielsen *et al.* 2005, Kosiol *et al.* 2008, Voolstra *et al.* 2011) selecting only specific biological processes category. Analyses were done with a R and Perl script from (Wright *et al.* 2015) with the following parameters: largest=0.1; smallest=10; clusterCutHeight= 0.25. To generate the table of significance measures, from the 28.027 genes of the oyster genome, the log2 fold change was assigned to genes differently expressed (DEseq2; FDR <0.05) in comparison between poly(I:C) and FSW treatments at 0.5, 1 and 10 DPP (**Figure 4A**), and “0” to genes that were not differentially expressed. A GO category was considered enriched for a FDR <0.01. To synthetically represent the GO results, a ratio was calculated for up-regulated and down-regulated enriched categories with the following calculations: (1) for up-regulated enriched categories “(number of genes significantly up-regulated in the category / total number of genes in this category)” or (2) for down-regulated enriched categories “-1 x (number of genes significantly down-regulated in this category / total number of genes in this category). Results were then represented on a heatmap using a Hierarchical Ascending Clustering (HAC) with Uncentred Pearson correlation (Gene Cluster 3.0 software).

Analyses of transcript differential expressions along the priming and challenge kinetics

In order to characterize the effect of priming and challenge on the expression pattern of candidate genes through time, a second DEseq2 analysis was performed on the set of genes present in the enriched GO categories previously obtained. Regarding post-priming (poly(I:C) or FSW), each time point (*i.e.* 0.5, 1 and 10 days) was compared to “T0”. Regarding post-challenge with OsHV-1, each time point (*i.e.* 0.5 and 1 day) was compared to “10 DPP” (**Table 1**). For representation purpose, Log2 fold change was set to “0” for non-significantly differentially expressed genes. To precisely determine the effect of OsHV-1, a third DESeq2 analysis was performed post-challenge by comparison between OsHV-1 and control inoculums treatments in poly(I:C) and FSW primed conditions.

RESULTS

From sensitivity to resistance against OsHV-1: Poly(I:C) priming induces a phenotypic reversal

Previous experiments evidenced in *Crassostrea gigas* the existence of a long -lasting immune priming against OsHV-1, after HMW poly(I:C) injection (Lafont *et al.* in review). Based on these observations, we used poly(I:C) in order to characterize the molecular mechanisms underlying this phenomenon. To this end, we used a full-sib oyster line from the DECIPHER ANR program (ANR-14-CE19-0023) that was highly susceptible to the juvenile oyster syndrome (de Lorgeril *et al.*, in prep). In experimental and natural infections, this oyster line reached 99.27 % mortality in ecologically realistic experimental infections and 100 % mortality in the field during a disease outbreak. We primed oysters with poly(I:C) or filtered seawater (FSW) 10 days before an OsHV-1 challenge (**Figure 1**).

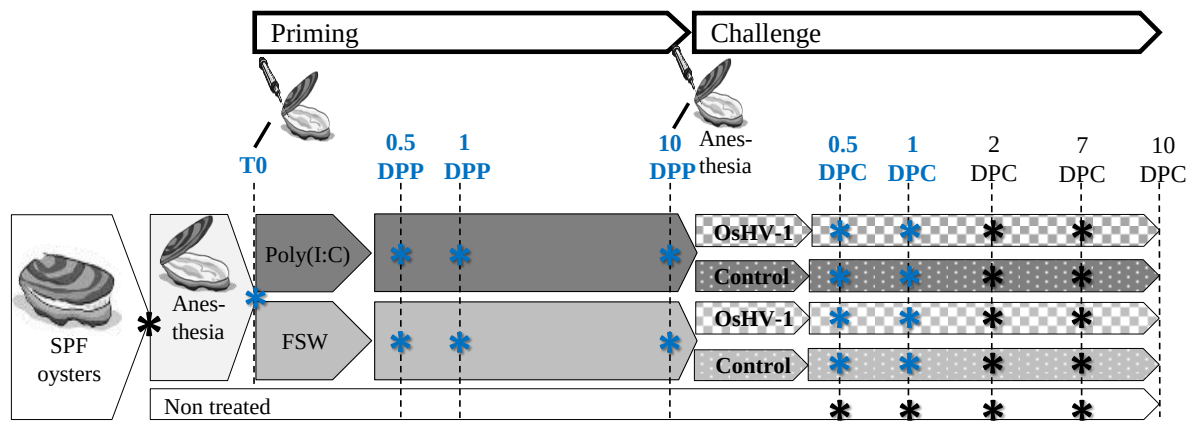


Fig. 1 : Experimental design used to identify molecular mechanisms underlying poly(I:C) priming. Specific pathogen free (SPF) oysters, highly susceptible to the juvenile oyster syndrome, were anesthetized before being primed with poly(I:C) or filtered seawater (FSW). Ten days post-priming (10 DPP) oysters from each condition were challenged with OsHV-1 homogenate (1.32×10^8 copies of DP gene per oyster) or OsHV-1-free homogenate (control). A part of the initial batch of oysters was kept untreated during the experiment. Survival of oysters was monitored during 10 days post-challenge. Three pools of 15 oysters for each condition were sampled post-priming (T0, 0.5 days, 1 day and 10 days) and post-challenge (DPC) (0.5 days, 1 day, 2 days and 7 days) for viral load analyses (* black asterisks) or RNA sequencing (* in blue).

Poly(I:C) and FSW priming led to extremely contrasted phenotypes upon OsHV-1 challenge (**Figure 2**). Control treatments injected with control inoculum or non-treated, had no effect on the phenotype with 100% survival at the end of the experiment. Oysters injected with FSW and challenged with OsHV-1 were highly susceptible to OsHV-1 with only 5% survival at the end of the experiment, 10 days post-challenge. Mortalities occurred between 2 and 6 days post-challenge. However, poly(I:C) priming led to 100% protection after OsHV-1 challenge, with a significant difference of survival rate (log-rank test p -value < 0.0001) compared to controls.

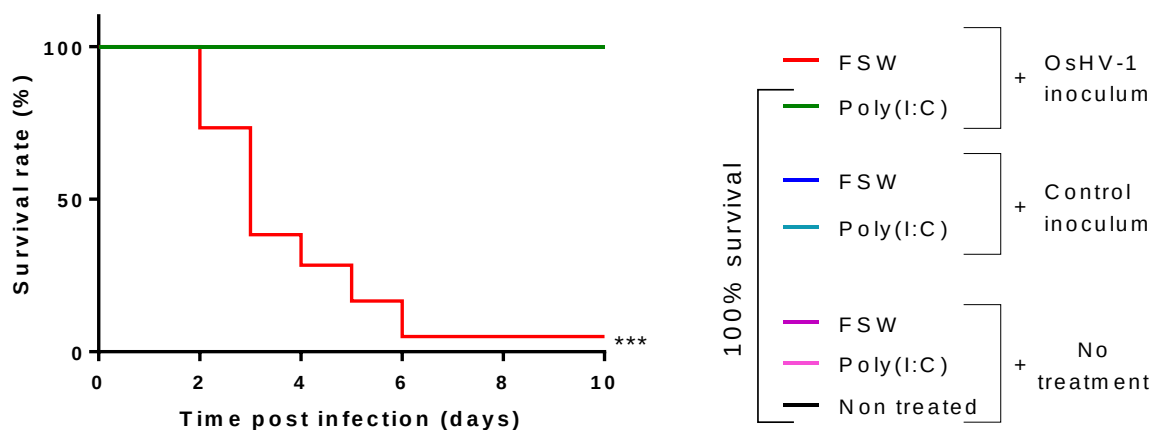


Fig. 2 : Poly(I :C) priming induces phenotypical reversal upon OsHV-1 challenge. Oysters were primed by injection with poly(I:C) ($19 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of oyster) or filtered seawater (FSW) as control or non-treated. Oysters were then challenged, 10 days post-priming, with OsHV-1 homogenate (1.32×10^8 copies of DP gene per oyster) or OsHV-1-free control homogenate by injection or non-treated as controls. Conditions demonstrating 100% survival rates can appear hidden and merged with other ones reaching the same survival rate. Survivals in each group of 60 oysters (15 per tank) were monitored for 10 days after challenge. (Kaplan-Meier survival curves, *** p -value < 0.0001 ; log-rank test; $n = 60$).

We then tested the consequences of priming on viral replication (**Figure 3**). First, we followed viral loads by quantifying OsHV-1 gDNA by qPCR in whole oyster tissues. In priming control, (oysters challenged with OsHV-1 after a FSW injection), viral loads reached $9.4 \cdot 10^4$ copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA at 0.5 days to $1.3 \cdot 10^6$ copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA at day 2 on average (one-way Anova; *p*-value <0.05) before mortalities occurred (**Figure 3A**). Seven days post-challenge, only 5% of oysters were still alive which did not enable the quantification of OsHV-1 DNA loads. In oysters primed with poly(I:C) and challenged with OsHV-1, viral loads were significantly lower than in FSW-injected oysters. The levels quantified were 280 to 13 times lower, especially in early times after infection (from $3.3 \cdot 10^2$ copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA at day 0.5 to $1 \cdot 10^5$ copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA at day 2, on average). In these animals, the viral loads never reached the level found in FSW-injected oysters and were only at $1.1 \cdot 10^3$ copies of DP.ng⁻¹ of total gDNA at 7 DPC. Secondly, as the increase of OsHV-1 DNA load is related to the transcriptional activity of the virus, we followed the expression pattern of OsHV-1 transcripts in RNA-seq data. Alignment of the Illumina sequenced reads to the OsHV-1 genome (Kovacs et al. 2005) (**Supplementary Table 1**) allowed us to estimate the number of OsHV-1 transcripts after challenge (**Figure 3B**). For oysters primed with FSW, OsHV-1 replication was detectable from 0.5 DPC (12 hours) with a total of $1 \cdot 10^4$ transcripts normalized counts on average to 1 DPC, with $5.4 \cdot 10^4$ counts on average (one-way Anova; *p*-value <0.05). Virus replication was active from 0.5 DPC and increased at 1 DPC with 5 times more transcripts. For oysters primed with poly(I:C), no transcripts were detected at 0.5 DPC and no significant increase was detected at 1 DPC with only $1.4 \cdot 10^2$ counts on average. No mortalities, no viral DNA nor transcripts were detected in negative control conditions (*i.e.* challenge with control inoculum or without treatment). Altogether, these results showed that (i) in FSW-primed oysters, high replication of OsHV-1 leads to high viral loads, associated to low survival rates and (ii) in the poly(I:C)-primed oysters, the priming restrains virus replication leading to low viral loads in oysters, associated to a high survival rate. Priming with poly(I:C) thus inverted the phenotype of susceptibility to disease under OsHV-1 challenge.

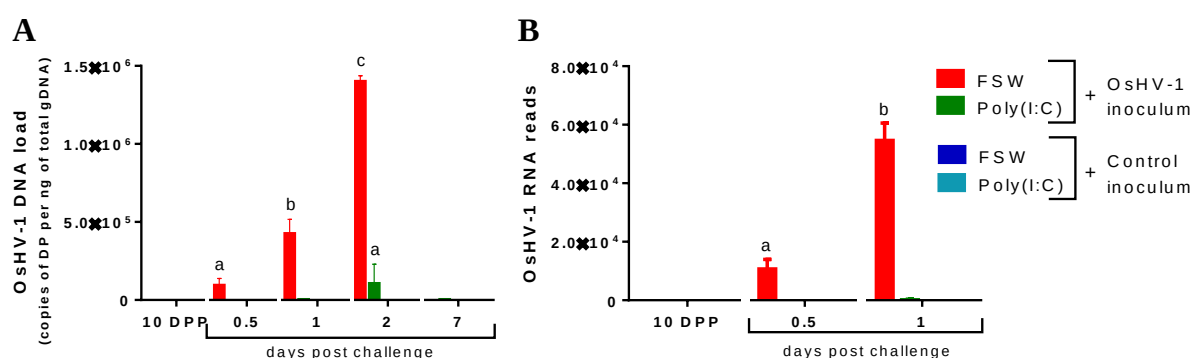


Fig. 3: Poly(I:C) stimulation restrains OsHV-1 replication in the oyster. OsHV-1 DNA detection by quantitative PCR (**A**) and total OsHV-1 transcripts normalized read counts mapped on the OsHV-1 genome (**B**) at different times after pathogenic (OsHV-1 inoculum) or non-pathogenic (control inoculum, blue) challenges. Challenges were realized 10 days post-priming (10 DPP) with filtered seawater (FSW; red) or poly(I:C) (green). Different letters above histograms indicate statistically significant differences for each time compared to 10 DPP using one-way Anova (a, *p*-value < 0.05; b and c, *p*-value < 0.001; n=3 pools of 15 oysters).

Poly(I:C) priming induces a strong and complex innate immune response in the oyster.

In order to identify molecular mechanisms underlying the contrasted phenotypes observed, the transcriptomic response of oysters was analyzed by RNA-seq after poly(I:C) priming or FSW injection at 0.5, 1 and 10 days post-priming (DPP). All Illumina sequenced reads were aligned to the *C. gigas* V9 reference genome (Zhang et al. 2012) and 73.9% of reads on average mapped on this genome (**Supplementary Table 1**). Differential expression of genes was analyzed using the DESeq2 package through the comparison between poly(I:C) priming and FSW injection at each time points. DESeq2 results showed that 2150 genes were significantly differentially expressed in at least one comparison (**Figure 4**). Among these genes, 43.3% are regulated early after priming (less than 1 day) and 56.7% are specifically regulated between 1 and 10 days (**Figure 4B**). These genes were analyzed by gene ontology (GO) to identify “biological processes” modulated by poly(I:C), using a rank-based statistical test (FDR <0.01). A total of 68 categories was significantly regulated in response to poly(I:C) at least one time (**Supplementary Fig.1**). Enriched categories and intensity of enrichment calculated by the following formula “number of genes significantly regulated in a category / total number of genes in this category” are represented in a heatmap (**Figure 5**). A hierarchical clustering was used to represent the 68 significantly regulated categories that were classified into 6 clusters. Among all clusters, four were found over-regulated (1 to 4) and two were found down-regulated (5 and 6). Clusters 1, 3 and 4 were over-regulated early after priming (0.5 and 1 DPP). Considering all enriched categories, 88% (60 functions; clusters 2 and 3) are still over-regulated 10 days after poly(I:C) priming. Cluster 6 contains categories down-regulated in response to poly(I:C) only at day 10 DPP. The majority of these categories are involved in immunity (clusters 1, 3) and interestingly, some of these categories were directly related to innate immunity and/or antiviral immunity, such as: “innate immune response”, “regulation of cell death”, “Toll signaling pathways”, “response to virus” and “regulation of type I interferon production”. Excluding the “unknown” category, the 67 other enriched categories refer to 658 genes regulated post-priming with poly(I:C).

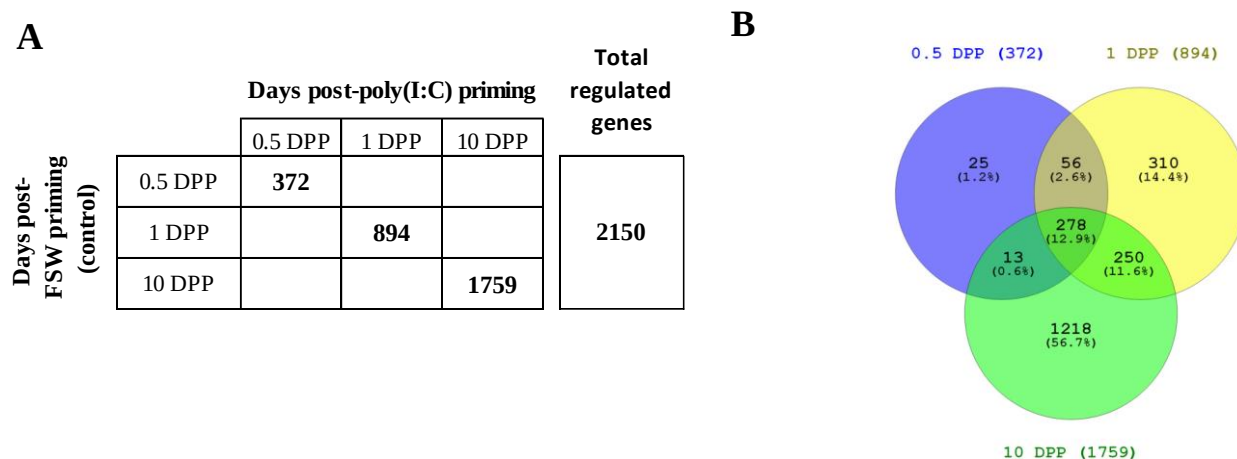


Fig. 4: DESeq comparison performed in order to identify genes involved in poly(I:C) priming in oyster. Comparisons were performed between poly(I:C) and FSW at 0.5, 1 and 10 days post-priming (DPP) and plotted values in the table represents the number of genes differentially expressed identified by DESeq2 (FDR <0.05). The total number of genes (2150) regulated in at least one comparison is represented in the last column (**A**). The Venn diagram represent the 2150 genes in each comparison (**B**).

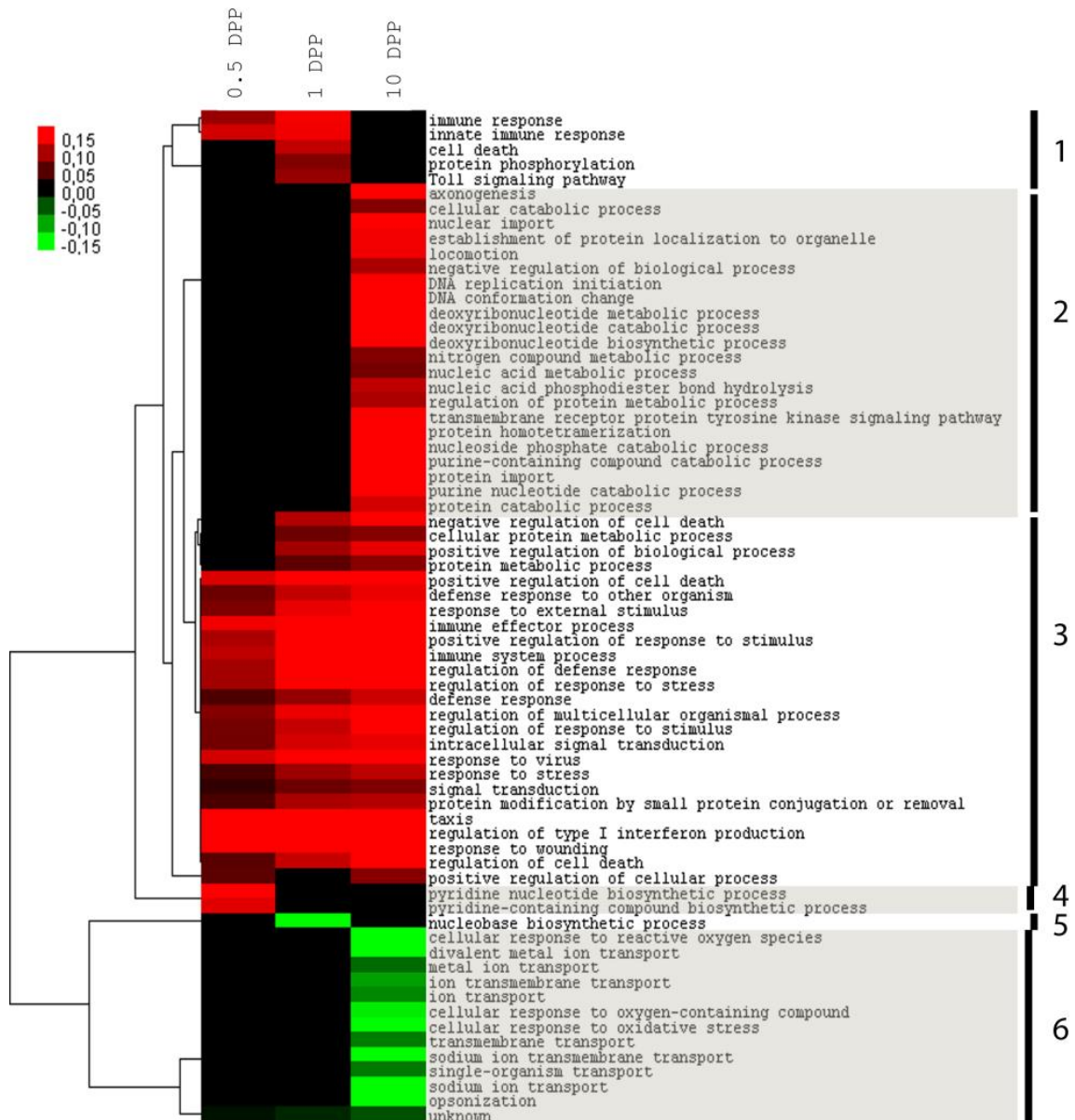


Fig. 5: Poly(I:C) stimulates a strong innate immune response in oysters. Heatmap of enrichment of Gene Ontology categories of biological processes at 0.5 days, 1 day and 10 days post-priming (DPP) with poly(I:C). GO enrichment analyses were done using a rank-based statistical test on log2 fold changes of differentially expressed genes at each time compared to control (seawater priming). A category was considered enriched under a FDR <0.01. Plotted values are ratio calculated as the number of genes significantly up-regulated (red) or down-regulated (green) in a category, divided by the total number of oyster genes in this category. Hierarchical clustering separated 6 different clusters numerated from 1 to 6 (Gene Cluster 3.0 software).

Poly(I:C) induces an efficient antiviral response responsible for protection against OsHV-1

In order to identify the molecular mechanisms behind these 2 contrasted phenotypes, we analyzed the expression pattern and functions associated with the 658 genes belonging to the gene ontology categories previously identified in post-priming analyses, all along the kinetic of our experiment. We first identified the expression profiles of this set of genes using DESeq2. We compared the expression profile of the 658 genes at each time point post-poly(I:C)/FSW priming (*i.e.* 0.5, 1 and 10 DPP) to the initial T0. Then, to analyse the effect of OsHV-1 challenged in primed or non-primed oysters, we compared the expression profile of these genes at each time post-challenge (*i.e.* 0.5 and 1 DPC) with the 10 days post-priming conditions (10 DPP poly(I:C) or 10 DPP FSW) (**Table 1 & suppl. Table 2**). For each comparison, the log2 fold change of significantly differentially expressed genes (FDR <0.05) was plotted, while “0” was assigned to non-significant differences.

Firstly, concerning the priming response, poly(I:C)-primed oysters showed early transcriptional regulation at 0.5 DPP with 40.7% (268/658) of the candidate genes that were differentially expressed, among which 30.6% (82/268) are strongly regulated (regulated with a fold change >1 or <-1) (Table 1). At 1 DPP, 63.4% (417/658) of the candidate genes are regulated among which 47% (196/417) are strongly regulated and at 10 DPP, 75.5% (497/658) genes are regulated with 52.7% (262/497) regulated with a fold change >1 or <-1. From these strongly regulated genes at 10DPP, 88.2% (231/262) are up-regulated and only 11.8% down-regulated (31/262). Interestingly, from the whole set of genes, 56.8% (374/658) were regulated at early points 0.5 DPP and/or 1 DPP and their expression still regulated at 10DPP. Then, concerning OsHV-1 challenge response of poly(I:C)-primed oysters, the results showed very low transcription modifications compared to 10 DPP. At 0.5 DPC, only 9.6% (63/658) genes among which 41.3% (26/36) are regulated with a fold change >1 or <-1. At 1 DPC, 12.6% (83/658) of genes are regulated among which 10.8% (9/83) are strongly regulated. Altogether, for all candidate genes post-challenge at 0.5 DPC and/or at 1 DPC compared to 10 DPP different expression patterns are observed: 72.3% (476/658) of genes are maintained ; 13.7% (90/658) of genes are regulated at 10 DPP and over-regulated post-challenge ; 11.6 % (76/658) of genes are not regulated either post-poly(I:C) priming nor post-challenge ; 1.5% (10/658) of genes are specifically regulated post-challenge and 0.9% (6/658) of genes have a recalled expression pattern (*i.e.* regulated in early times post-priming but not at 10 DPP and regulated post-challenge) (**Figure 6A**). These results indicated that a majority of these genes (86%) adopted a “sustained” and “sustained and regulated post-challenge” following poly(I:C) priming. Interestingly, no genes were found differentially expressed in comparisons between poly(I:C)-primed oysters after either OsHV-1 or control inoculum challenges, revealing no additional effect of OsHV-1 injection. These results are illustrated in figure 7 in a heatmap where all the 658 transcripts are plotted at the different times post-priming and post-challenge (**Figure 7A**). This illustration shows that the pattern of expression of these genes is mainly sustained post-priming and predominantly up-regulated. Indeed, 68 transcripts were down-regulated (18%) *versus* 306 up-regulated (82%) among the 374 genes whose expression was sustained post-priming. Those genes were not regulated after OsHV-1 challenge demonstrating that poly(I:C) priming strongly induced gene transcription predominantly following a sustained response pattern all along the experiment.

Secondly, concerning the non-efficient response to OsHV-1, we assessed in a first step the effect of FSW injection (**Table 1**). At 0.5 DPP 28.4% (187/658) of genes are regulated among which 11.8% (22/187) are strongly regulated. At 1 DPP, 30.9% (203/658) of genes are regulated among which 16.7% (34/203) are strongly regulated and at 10 DPP, 48% (317/658) of genes are regulated among which 32.8% (104/317) are strongly regulated. Among all these candidate genes, 24.2% (159/658) previously regulated in early response at 0.5 DPP and/or 1 DPP whose regulation is sustained during priming. Then, concerning OsHV-1 challenge response of FSW-injected oysters, the results showed strong transcription modifications compared to 10 DPP. At 0.5 DPC, only 39.1% (257/658) genes among which 42% (110/257) are regulated with a fold change >1 or <-1. At 1 DPC, 64.3% (423/658) of genes are regulated among which 61.5% (260/423) are strongly regulated.

Altogether, for all candidate genes post-challenge at 0.5 DPP and/or at 1 DPP compared to 10 DPP different expression patterns are observed: 22.5% (148/658) of genes are maintained ; 30.1% (198/658) of genes are regulated at 10 DPP and over-regulated post-challenge ; 11.1 % (73/658) of genes are not regulated either post-FSW injection nor post-challenge ; 28.5% (188/658) of genes are specifically regulated post-challenge and 7.8% (51/658) of genes have a recalled expression pattern (*i.e.* regulated in early times post-FSW injection but not at 10 DPP and regulated post-challenge) (**Figure 6B**). These results revealed different patterns of expression induced in FSW priming after OsHV-1 challenge with only 52.6% of genes with a “sustained” or “sustained and regulated PC” but 28.6% that were specifically up-regulated post-challenge. As illustrated in figure 7, these results show that in non-primed oysters, that set of 658 genes is poorly regulated after FSW injection and mainly up-regulated after OsHV-1 challenge. Interestingly, as all genes were plotted on the same lines, we showed that most genes involved in a sustained response after poly(I:C) priming are also up-regulated in a non-primed context after virus challenge (**Figure 7B**). These results illustrate that the same set of genes might be involved in responses to poly (I:C) and to the virus but was inefficient in protecting the oyster in the latter case. Altogether, this strongly suggests that the implementation of an efficient antiviral response in the oyster is highly dependent on the timely activation of antiviral mechanisms.

			transcript regulation		fold change		expression pattern									
priming		challenge	global*		-1<; >1**		sustained		sustained & regulated		regulated only PC		not regulated		recalled	
			#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
PIC	0,5DPP		268	40,7	82	30,6	374	56,8								
PIC	1DPP		417	63,4	196	47,0										
PIC	10DPP		497	75,5	262	52,7										
PIC	10DPP	0,5DPC	63	9,6	26	41,3	476	72,3	90,0	13,7	10,0	1,5	76,0	11,6	6,0	0,9
PIC		1DPC	83	12,6	9	10,8										
FSW	0,5DPP		187	28,4	22	11,8	159,0	24,2								
FSW	1DPP		203	30,9	34	16,7										
FSW	10DPP		317	48,2	104	32,8										
FSW	10DPP	0,5DPC	257	39,1	110	42,8	148,0	22,5	198,0	30,1	188,0	28,6	73,0	11,1	51,0	7,8
FSW		1DPC	423	64,3	260	61,5										

Table 1: DESeq comparison performed in order to calculate the level of expression of candidate genes during priming (poly(I:C) or filtered seawater (FSW)) and OsHV-1 challenge. Expression pattern of the 658 genes identified by gene ontology analysis during priming, was analysed using DESeq2 package in comparing each time point post-priming (*i.e.* 0.5, 1 and 10 days post-priming (DPP)) to “T0”; and each time point post-challenge (*i.e.* 0.5 and 1 day post-challenge (DPC)) with OsHV-1, to “10 DPP”. *Indicated values represent the number of genes differentially expressed identified by DESeq2 (FDR <0.05) from the 658 genes. **Percentages of genes with a fold change -1< or >1 were calculated from the global number of regulated genes.

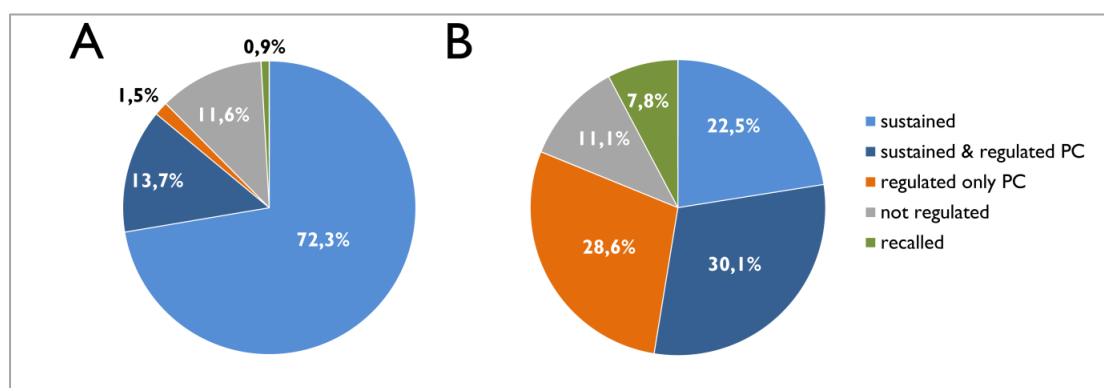


Fig. 6: Regulation profile of primed transcripts after OsHV-1 challenge.

Pie chart of the percentage of genes following different expression profile following poly(I:C) (A) or FSW (B) priming and OsHV-1 infection. Five expression profiles were identified (1) “sustained” when gene expression is maintained between 0.5DPP and/or 1DPP and still regulated at 10DPP; (2) “sustained and regulated” when genes are regulated at 10 DPP and over-regulated post-challenge ; (3) “regulated only PC” when genes were not regulated during priming but only after challenge; (4) “not regulated” when genes are not regulated either post-priming injection nor post-challenge ; (5) “recalled” when genes are regulated in early times post-priming but not at 10 DPP and regulated post-challenge.

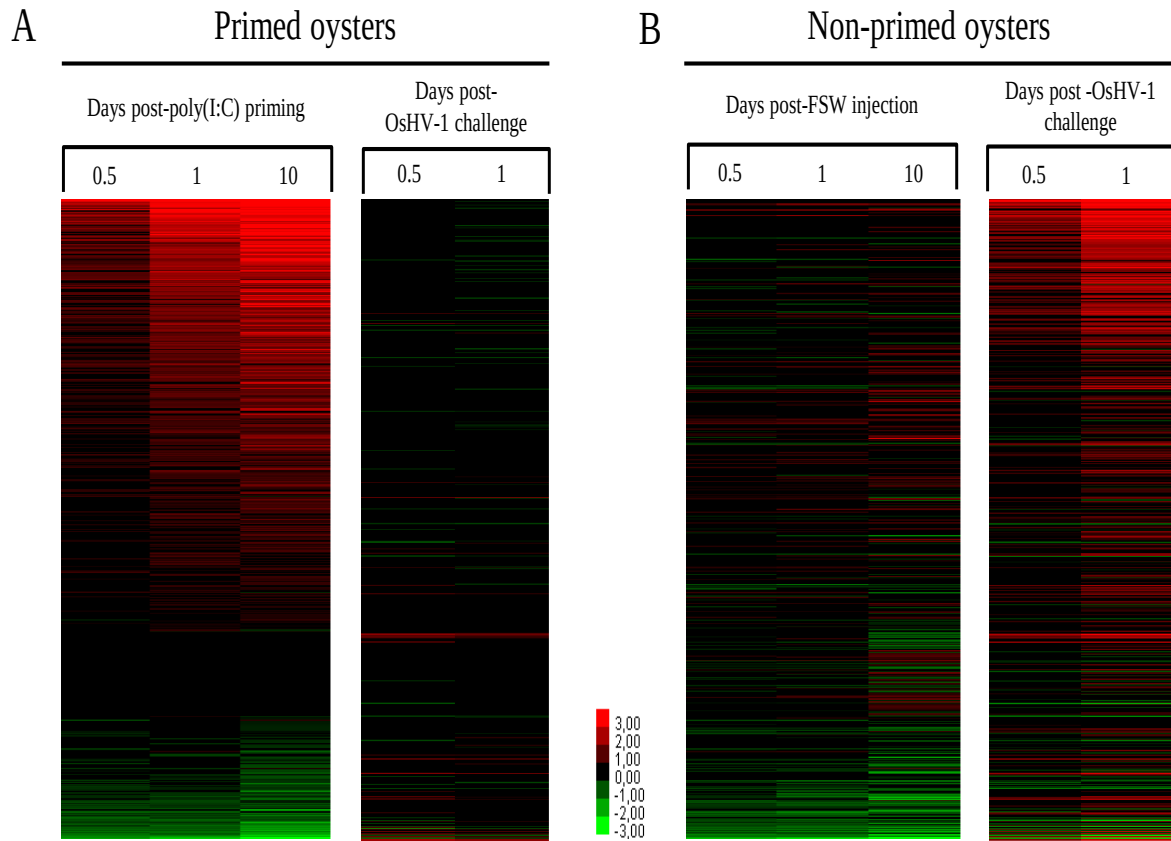


Fig. 7: Poly(I:C) induces an antiviral immune response protecting the oyster against OsHV-1 challenge. Heatmap showing expression kinetics of the 658 transcripts of oyster primed with poly(I:C) (A) or injected with filtered seawater (FSW) as control (B) and challenged after 10 days with OsHV-1. Color scale indicates the log2 fold change calculated by DEseq2, of the 658 transcripts identified by GO in comparing: post-priming (poly(I:C) or FSW): 0.5, 1 and 10 days to T0 (FDR <0.05) ; post-challenge: 0.5 and 1 days were compared to 10 days post-priming (poly(I:C) or FSW) (FDR <0.05). Same transcripts are indicated in the same position for each condition (Gene Cluster 3.0 software).

To get a deeper insight into the mechanisms involved in the antiviral protection observed, we then analyzed the functions associated to these sets of genes. We assigned a function (antiviral, antibacterial, or both when possible) to each gene compared to the known literature. We focused here on the genes that followed a sustained expression profile post-poly(I:C) priming (374/658, 56.8%) that were also up-regulated (306/374, 82%) (**Figure 8, Suppl. Table 2**). We found that 56% (171/306) could be assigned to an antiviral response (“virus”), 10% to an antibacterial response (“bacteria”) or potentially to both responses (22%, “V/B”) while 12% could not be directly associated with an immune function (“other”) (**Figure 8A**). Most genes could thus be associated with an antiviral function (237/306, 77%). Out of the “virus” and “V/B” categories (237/306), we then assigned the genes to known antiviral pathways (**Figure 8B**). We evidenced that most genes (93/237; 39%) could be associated with the IFN-like pathway including RLR and STING dependent pathways (*e.g.* RIG-1, helicase, IRF), and ISG (*e.g.* ADAR-L, IFI44, viperin, SAMHD-1). A number of genes could also be associated the Toll/NF- κ B (15/237; 6%) and the JAK/STAT (12/237; 5%) pathways that are tightly linked to the IFN pathway. The second most represented category is the apoptosis pathway (20/237; 9%; *e.g.* TNF, Fas, caspases, IAP). The RNAi pathway was poorly represented within this set of genes (1/237; 0.42%) suggesting that it is poorly involved in poly(I:C) response or not regulated. Finally, 41% of the genes could not be clearly associated with known antiviral pathways. Altogether these analyses allowed us to identify sets of candidate genes that will help to confirm the sustained profile hypothesis on long-lasting experiments (Lafont *et al.*, 2017- cf chapitre 1, Article 1) and get a better inside into the mechanisms involved in antiviral protection.

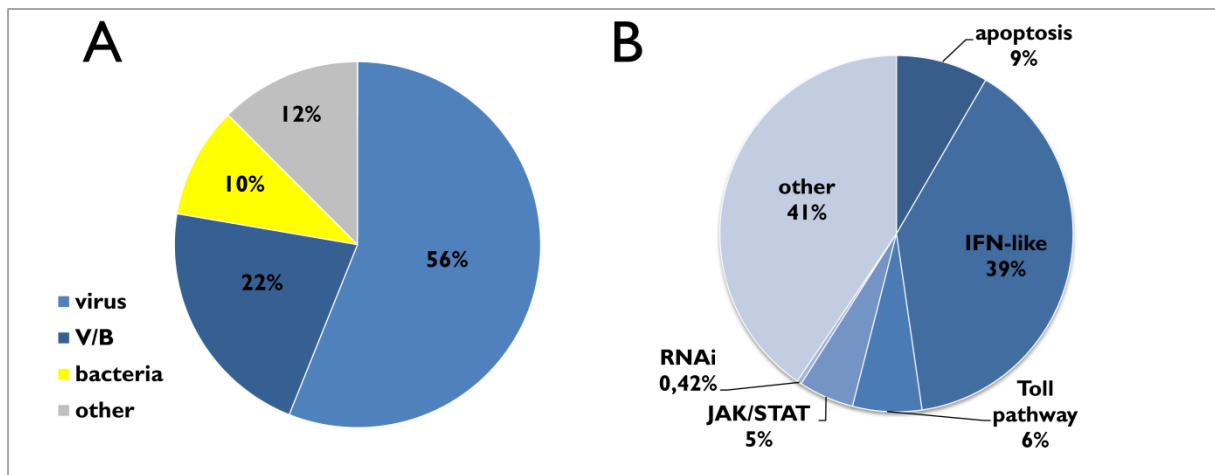


Fig. 8: Putative immune functions of up-regulated genes with a “sustained” expression profile post poly (I:C) priming.

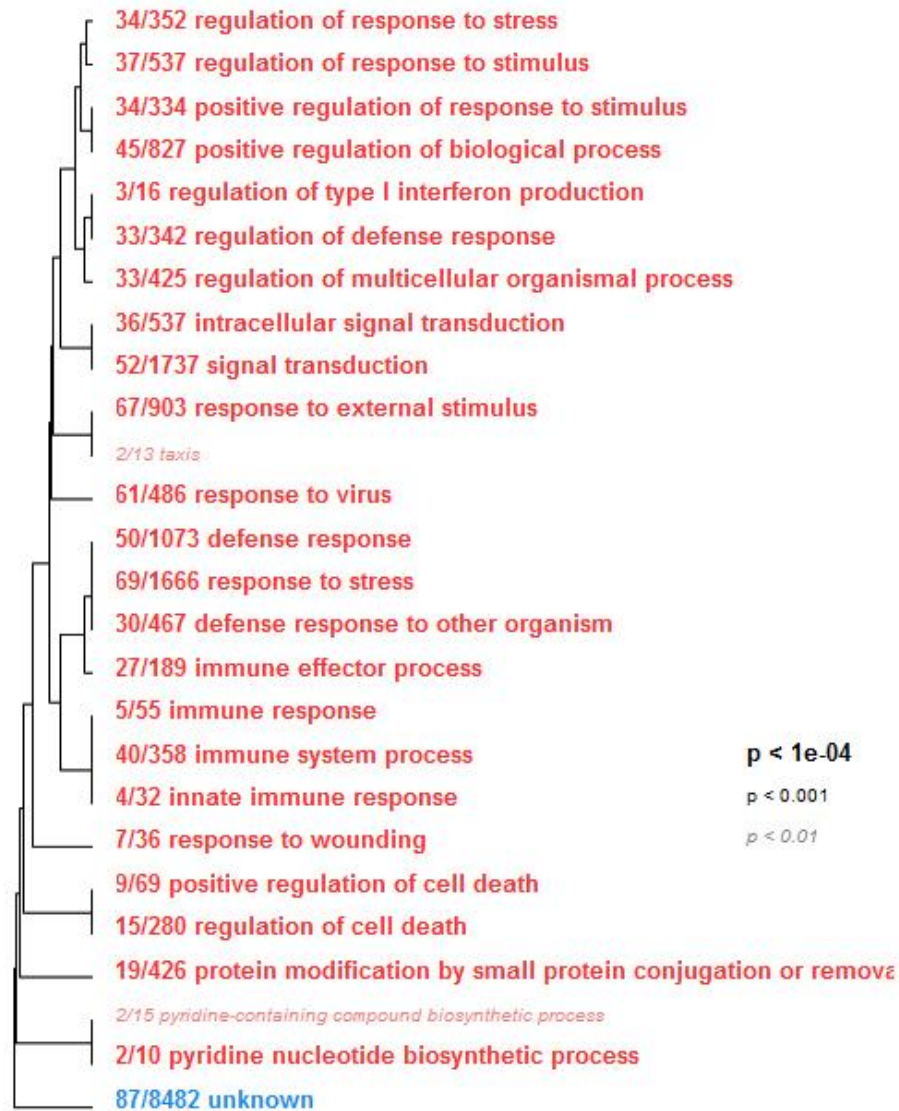
A. Putative functions of up-regulated genes following a “sustained” expression pattern during poly (I:C) priming were identified according to the literature and each of the gene were assigned to the antibacterial response (“bacteria”), antiviral response (“virus”), both responses (“V/B”) or with no direct implication in immunity (“other”). B. Among the “virus” and “V/B” response, genes were assigned to known signaling pathways implicated in antiviral response (apoptosis, IFN-like pathway, RNAi, JAK/STAT, Toll/NF-kB pathway) or not (“other”).

Additional-supplementary files

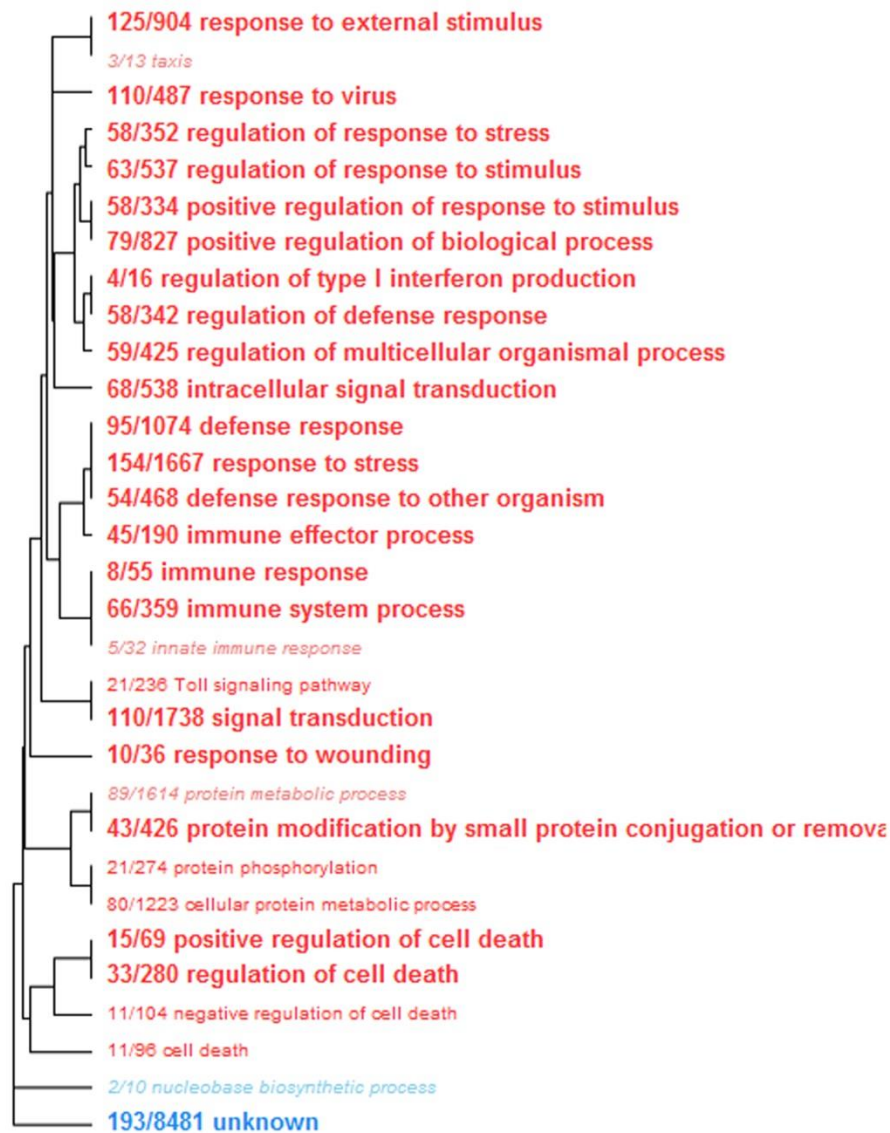
Supp. Table 1: Library and mapped reads on *C. gigas* genome or OsHV-1 genome used for RNA-seq analyses. The percentage of reads mapped (%) to the *C. gigas* genome (Zhang et al. 2012) or OsHV-1 genome (Kovacs et al. 2005) correspond to the number of mapped reads (MR) relatives to the total sequenced reads for a library sequenced in single-end. Each library is related to replicate of a sampling of oysters at T0 and different days post-priming (DPP) with poly(I:C) or filtered seawater (FSW) and at days post-challenge (DPC) with OsHV-1 injected 10 days after priming.

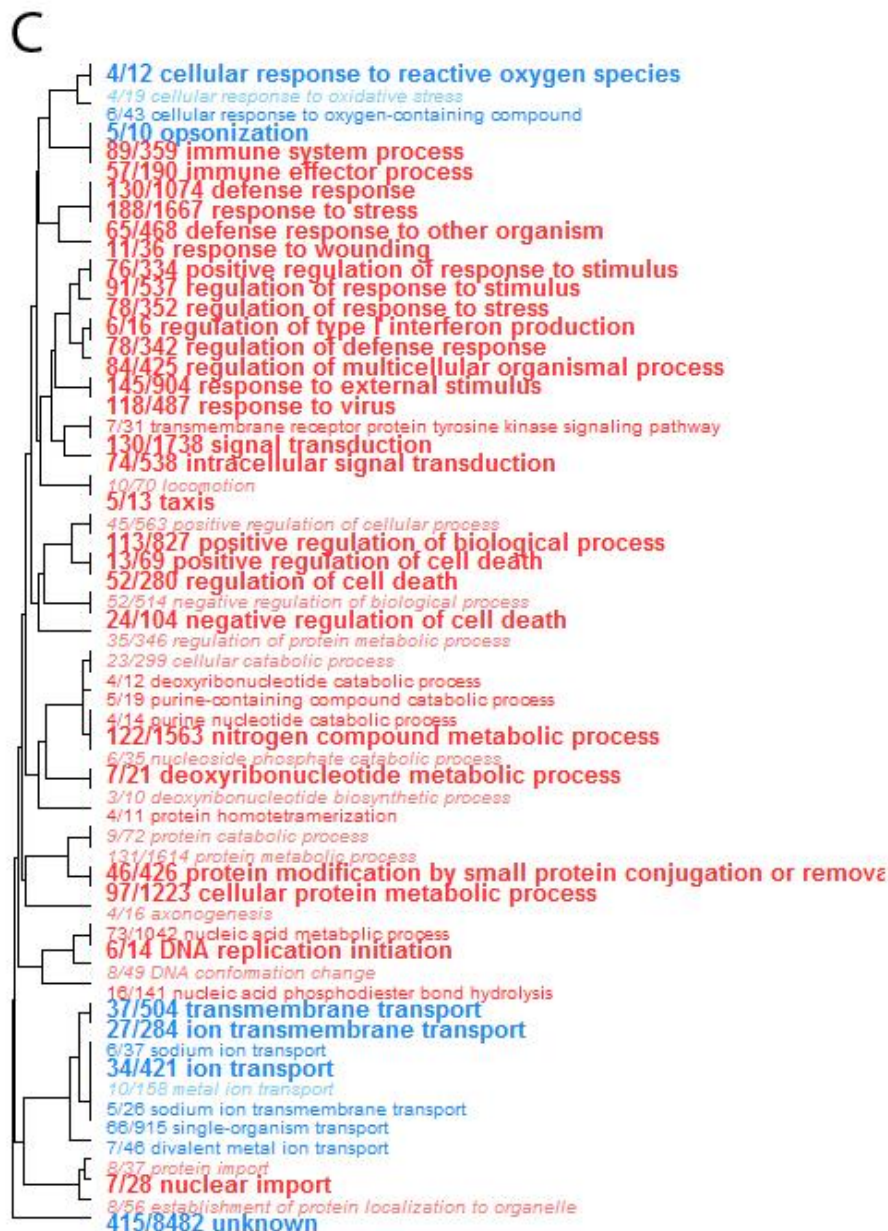
			Total Sequenced Reads (Million)	<i>C. gigas</i>		OsHV-1	
				MR (Million)	%	MR	%
Poly(I:C)	T0	1	48,8	36,22	74,2	0	0
		2	39,0	29,45	75,5	0	0
		3	33,3	25,04	75,3	0	0
	0.5 DPP	1	34,1	25,69	75,3		
		2	41,8	31,15	74,5		
		3	56,8	41,17	72,4		
	1 DPP	1	33,8	24,35	72,1		
		2	50,0	36,91	73,8		
		3	34,5	25,48	73,8		
	10 DPP	1	29,0	21,80	75,2	0	0,00
		2	49,1	36,65	74,7	0	0,00
		3	28,3	20,98	74,2	0	0,00
	0.5 DPC	1	32,2	24,21	75,1	8	0,00
		2	40,8	30,08	73,8	34	0,00
		3	25,4	19,08	75,1	1	0,00
	1 DPC	1	25,9	19,51	75,3	2	0,00
		2	37,7	28,07	74,4	2705	0,01
		3	29,1	21,95	75,3	7	0,00
FSW	0.5 DPP	1	33,7	25,12	74,5		
		2	29,9	22,35	74,7		
		3	31,8	23,86	75,0		
	1 DPP	1	33,3	23,99	72,1		
		2	29,4	21,88	74,4		
		3	53,8	40,03	74,5		
	10 DPP	1	41,9	31,11	74,3	6	0,00
		2	35,5	26,28	74,0	0	0,00
		3	42,2	30,74	72,9	12	0,00
	0.5 DPC	1	36,6	27,63	75,4	5,6E+04	0,15
		2	35,4	22,96	64,9	1,0E+05	0,28
		3	28,3	20,62	72,8	5,0E+04	0,18
	1 DPC	1	39,0	28,68	73,5	4,6E+05	1,19
		2	39,8	29,54	74,2	3,4E+05	0,86
		3	51,9	37,81	72,8	5,6E+05	1,08

A



B





Supp. Figure 1: Gene ontology categories affected by poly(I:C) priming

Gene ontology categories enriched by Log2fold change of genes up-regulated (red) or down-regulated (blue) in oysters primed with poly(I:C) compared to FSW at 0.5 days post-priming (**A**), 1 day post-priming (**B**) or 10 days post-priming (**C**), summarized by categories belonging to biological process. The size of the font indicates the significance of the term calculated by Mann-Whitney U-test ($p < 0.01$, $p < 0.001$ or $p < 0.0001$). The fraction preceding the GO term indicates the number of genes significantly regulated in a category (numerator) and the total number of genes in this category (denominator). Branching indicates shared genes among GO categories.

References

- Afgan, E., D. Baker, M. van den Beek, D. Blankenberg, D. Bouvier, M. Čech, J. Chilton, D. Clements, N. Coraor, C. Eberhard, B. Grüning, A. Guerler, J. Hillman-Jackson, G. Von Kuster, E. Rasche, N. Soranzo, N. Turaga, J. Taylor, A. Nekrutenko, and J. Goecks. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research* **44**:W3-W10.
- Anders, S., P. T. Pyl, and W. Huber. 2014. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**:166-169.
- Armitage, S. A. O., R. Peuss, and J. Kurtz. 2015. Dscam and pancrustacean immune memory - A review of the evidence. *Developmental and Comparative Immunology* **48**:315-323.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg. 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**:289-300.
- Castro-Vargas, C., C. Linares-Lopez, A. Lopez-Torres, K. Wrobel, J. C. Torres-Guzman, G. A. Hernandez, K. Wrobel, H. Lanz-Mendoza, and J. Contreras-Garduno. 2017. Methylation on RNA: A Potential Mechanism Related to Immune Priming within But Not across Generations. *Front Microbiol* **8**:473.
- Chang, Y. H., R. Kumar, T. H. Ng, and H. C. Wang. 2017. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Developmental and Comparative Immunology*.
- Cooper, D. and I. Eleftherianos. 2017. Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges. *Frontiers in Immunology* **8**.
- Cooper, E. L., B. Rinkevich, G. Uhlenbruck, and P. Valembois. 1992. Invertebrate Immunity - Another Viewpoint. *Scandinavian Journal of Immunology* **35**:247-266.
- Coustau, C., J. Kurtz, and Y. Moret. 2016. A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate-Parasite Interface. *Trends in Parasitology* **32**:353-355.
- Davison, A. J., B. L. Trus, N. Q. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff, and T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* **86**:41-53.
- Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**:15-21.
- Dong, Y. M., H. E. Taylor, and G. Dimopoulos. 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *Plos Biology* **4**:1137-1146.
- Green, T. J. and C. Montagnani. 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish & Shellfish Immunology* **35**:382-388.
- Green, T. J., C. Montagnani, K. Benkendorff, N. Robinson, and P. Speck. 2014. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **36**:151-157.
- Green, T. J., D. Raftos, P. Speck, and C. Montagnani. 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* **96**:2471-2482.
- Green, T. J., A. Vergnes, C. Montagnani, and J. de Lorgeril. 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Veterinary Research* **47**.
- Hanington, P. C. and S. M. Zhang. 2011. The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. *Journal of Innate Immunity* **3**:17-27.
- He, Y., A. Jouaux, S. E. Ford, C. Lelong, P. Sourdaie, M. Mathieu, and X. M. Guo. 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:131-144.

- Huang, B., L. Zhang, Y. Du, F. Xu, L. Li, and G. Zhang. 2017. Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates. *Sci Rep* **7**:8217.
- Johnson, K. N., M. C. W. van Hulten, and A. C. Barnes. 2008. "Vaccination" of shrimp against viral pathogens: Phenomenology and underlying mechanisms. *Vaccine* **26**:4885-4892.
- Jouaux, A., M. Lafont, J. L. Blin, M. Houssin, M. Mathieu, and C. Lelong. 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* **14**.
- Kosiol, C., T. Vinar, R. R. da Fonseca, M. J. Hubisz, C. D. Bustamante, R. Nielsen, and A. Siepel. 2008. Patterns of Positive Selection in Six Mammalian Genomes. *PLoS Genetics* **4**.
- Kovacs, G. M., B. Harrach, A. N. Zakhartchouk, and A. J. Davison. 2005. Complete genome sequence of simian adenovirus 1: an Old World monkey adenovirus with two fiber genes. *Journal of General Virology* **86**:1681-1686.
- Kurtz, J. 2004. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes and Infection* **6**:1410-1417.
- Kurtz, J. and K. Franz. 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* **425**:37-38.
- Lafont, M., B. Petton, A. Vergnes, M. Pauletto, A. Segarra, B. Gourbal, and C. Montagnani. 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Scientific Reports* **under review**.
- Langmead, B. and S. L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**:357-359.
- Li, Y. Q., X. R. Song, W. L. Wang, L. L. Wang, Q. L. Yi, S. Jiang, Z. H. Jia, X. Y. Du, L. M. Qiu, and L. S. Song. 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**:59-69.
- Liu, C. H., T. Zhang, L. L. Wang, M. Q. Wang, W. L. Wang, Z. H. Jia, S. Jiang, and L. S. Song. 2016. The modulation of extracellular superoxide dismutase in the specifically enhanced cellular immune response against secondary challenge of *Vibrio splendidus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Developmental and Comparative Immunology* **63**:163-170.
- Longdon, B., C. Cao, J. Martinez, and F. M. Jiggins. 2013. Previous Exposure to an RNA Virus Does Not Protect against Subsequent Infection in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **8**.
- Love, M. I., W. Huber, and S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaille, J. P. Malas, and M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* **160**:25-31.
- Matsumoto, M. and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I : C). *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**:805-812.
- Milutinović, B. and J. Kurtz. 2016. Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology* **28**:328-342.
- Mone, Y., B. Gourbal, D. Duval, L. Du Pasquier, S. Kieffer-Jaquinod, and G. Mitta. 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**.
- Netea, M. G. 2013. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *European Journal of Clinical Investigation* **43**:881-884.
- Netea, M. G., J. Quintin, and J. W. van der Meer. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* **9**:355-361.
- Netea, M. G. and J. W. M. van der Meer. 2017. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host & Microbe* **21**:297-300.
- Nielsen, R., C. Bustamante, A. G. Clark, S. Glanowski, T. B. Sackton, M. J. Hubisz, A. Fledel-Alon, D. M. Tanenbaum, D. Civello, T. J. White, J. J. Sninsky, M. D. Adams, and M. Cargill. 2005. A scan for

- positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *Plos Biology* **3**:976-985.
- Pauletto, M., A. Segarra, C. Montagnani, V. Quillien, N. Faury, J. Le Grand, P. Miner, B. Petton, Y. Labreuche, E. Fleury, C. Fabioux, L. Bargelloni, T. Renault, and A. Huvet. 2017. Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *J Exp Biol*.
- Pernet, F., J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Degremont, F. Lagarde, J. F. Pepin, and N. Keck. 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**:215-237.
- Petton, B., F. Pernet, R. Robert, and P. Boudry. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **3**:257-273.
- Pinaud, S., J. Portela, D. Duval, F. C. Nowacki, M. A. Olive, J. F. Allienne, R. Galinier, N. M. Dheilly, S. Kieffer-Jaquinod, G. Mitta, A. Theron, and B. Gourbal. 2016. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens* **12**.
- Portela, J., D. Duval, A. Rognon, R. Galinier, J. Boissier, C. Coustau, G. Mitta, A. Theron, and B. Gourbal. 2013. Evidence for Specific Genotype-Dependent Immune Priming in the Lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* Snail. *Journal of Innate Immunity* **5**:261-276.
- Quintin, J., S. C. Cheng, J. W. van der Meer, and M. G. Netea. 2014. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr Opin Immunol* **29**:1-7.
- Rechavi, O., G. Minevich, and O. Hobert. 2011. Transgenerational inheritance of an acquired small RNA-based antiviral response in *C. elegans*. *Cell* **147**:1248-1256.
- Rodrigues, J., F. A. Brayner, L. C. Alves, R. Dixit, and C. Barillas-Mury. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* **329**:1353-1355.
- Rosani, U., L. Varotto, S. Domeneghetti, G. Arcangeli, A. Pallavicini, and P. Venier. 2015. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* **17**:4200-4212.
- Roth, O. and J. Kurtz. 2009. Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental and Comparative Immunology* **33**:1151-1155.
- Salvi, D. and P. Mariottini. 2016. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Schikorski, D., N. Faury, J. F. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez, and T. Renault. 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* **155**:28-34.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. *Bioessays* **27**:1026-1034.
- Segarra, A., J. F. Pepin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury, and T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* **153**:92-99.
- Sire, C., A. Rognon, and A. Theron. 1998. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* **117**:117-122.
- Suquet, M., G. de Kermoisan, R. G. Araya, I. Queau, L. Lebrun, P. Le Souchu, and C. Mingant. 2009. Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* **22**:29-34.
- Tidbury, H. J., A. B. Pedersen, and M. Boots. 2011. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**:871-876.

- Vilcinskas, A. 2016. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology (Jena)* **119**:273-280.
- Voolstra, C. R., S. Sunagawa, M. V. Matz, T. Bayer, M. Aranda, E. Buschiazzi, M. K. DeSalvo, E. Lindquist, A. M. Szmant, M. A. Coffroth, and M. Medina. 2011. Rapid Evolution of Coral Proteins Responsible for Interaction with the Environment. *Plos One* **6**.
- Wang, J. J., L. L. Wang, C. Y. Yang, Q. F. Jiang, H. Zhang, F. Yue, M. M. Huang, Z. B. Sun, and L. S. Song. 2013. The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology* **40**:142-147.
- Watson, F. L., R. Puttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel, and D. Schmucker. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* **309**:1874-1878.
- Webb, S. C., A. Fidler, and T. Renault. 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* **272**:126-139.
- Wright, R. M., G. V. Aglyamova, E. Meyer, and M. V. Matz. 2015. Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus*. *BMC Genomics* **16**.
- Yoshida, I. and M. Azuma. 2013. An alternative receptor to poly I:C on cell surfaces for interferon induction. *Microbiology and Immunology* **57**:329-333.
- Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P. W. H. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Lošo, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jiang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, J. Wang, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, S. Zhang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, J. Wang, Q. Wang, C. E. W. Steinberg, H. Wang, N. Li, L. Qian, G. Zhang, Y. Li, H. Yang, X. Liu, J. Wang, Y. Yin, and J. Wang. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**:49-54.
- Zhang, T., L. M. Qiu, Z. B. Sun, L. L. Wang, Z. Zhou, R. Liu, F. Yue, R. Sun, and L. S. Song. 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology* **45**:141-150.

III. Synthèse des résultats, conclusions et perspectives à court terme

Dans cette expérimentation, la stimulation par du poly(I:C) réalisée 10 jours avant une infection avec l'OsHV-1 a permis d'**inverser le phénotype, rendant la totalité des huîtres résistantes aux mortalités**. A partir de ce matériel biologique présentant des phénotypes extrêmement contrastés, l'analyse du transcriptome de ces huîtres a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents au priming immunitaire antiviral précédemment décrit dans le chapitre 1 : (cf Chapitre 1, Article 1). Cependant, des analyses complémentaires sont nécessaires pour comprendre ces mécanismes et sont exposées en perspective à court terme au travers des différentes questions posées, permettant de compléter et de soumettre l'article présenté.

Question (i) : « quels sont les mécanismes mis en place en réponse au poly(I:C) »

Les analyses comparatives entre des huîtres stimulées avec du poly(I:C) et des huîtres contrôles, injectées avec de l'eau de mer, ont révélé que 2150 gènes étaient différentiellement exprimés. Les analyses d'enrichissement ont permis de mettre en évidence 67 catégories de « gene ontology » enrichies, contenant 658 gènes des 2510 précédemment identifiés. Parmi ces catégories, de nombreuses fonctions sont liées à l'immunité innée ("immune response", "innate immune response", "Toll signaling pathway", "regulation of cell death", "defense response to other organism", "Immune effector process", "immune system process", "regulation of defense response", "response to stress". Parmi ces différentes fonctions immunitaires, l'implication de l'immunité antivirale est suggérée particulièrement par les fonctions « response to virus » et « regulation of type I interferon ». Le système interféron est bien décrit chez les vertébrés (Der et al. 1998) mais n'est pas identifié chez les arthropodes et plus généralement chez les invertébrés (Paradkar et al. 2012, Kingsolver et al. 2013). Cependant, des analyses *in silico* du génome de l'huître ont suggéré l'existence d'un système « interferon-like » (Zhang et al. 2012, Green et al. 2015a). Différentes études ont montré la régulation de différents gènes liés au système interféron chez l'huître lors d'infections avec l'OsHV-1 suggérant son implication dans les mécanismes antiviraux (Jouaux et al. 2013, Segarra et al. 2014c, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016b). Des travaux réalisés sur la réponse antivirale en utilisant du poly(I:C) et des ARNs doubles brins ont également suggéré l'implication d'un système de type interféron chez l'huître (Green and Montagnani 2013, Green et al. 2014a, Green et al. 2015a, Green et al. 2016b, Pauletto et al. 2017). De plus, des auteurs ont montré une augmentation du niveau d'expression d'un homologue à un récepteur à interféron (CgIFNR-3)

ainsi que l'implication du récepteur RIG-1 lors de stimulations des huîtres par le poly(I:C) (Zhang et al. 2016, Huang et al. 2017). Nos travaux sont les premiers à suggérer par une approche globale un investissement fort de ce système de type interféron en réponse au poly(I:C). Pour compléter cette analyse, l'identification du nombre de gènes significativement régulés, impliqués dans différentes voies des signalisations permettra d'avoir une vision plus globale des différentes voies régulées par le poly(I:C).

Question (ii) : « quels sont les mécanismes de protection antivirale au cours de l'infection par OsHV-1 (au niveau des réponses de l'hôte et de l'activité du virus) ? »

- Les mécanismes de protection au niveau de l'hôte

Parmi l'ensemble des gènes identifiés par « gene ontology » (658 gènes), nous avons observé différents profils d'expression en réponse à l'OsHV-1 chez des huîtres stimulées avec le poly(I:C). Les profils majoritaires correspondent à un profil de type maintenu (« sustained ») pour 72.3% des gènes et un profil maintenu post-priming puis à nouveau régulé lors du challenge pour 13.7% des gènes. A eux deux, ces profils représentent 86% des gènes (566/658 gènes). En revanche, lors d'infections virales, chez des huîtres infectées avec l'OsHV-1 n'ayant pas été « primées » (primo-injectée avec FSW), 52.6% des gènes (271/658 gènes) ont ces profils. Lors de l'infection virale, 28.5% des gènes (188/658 gènes) sont régulés spécifiquement au challenge. Ces différences de profils entre les deux conditions de primo-stimulation lors d'infections virales suggèrent que la réponse de type maintenu pourrait être la clé de la protection et qu'une activation précoce permettrait de protéger les huîtres des infections virales. De plus, chez les huîtres stimulées avec le poly(I:C), qu'elles aient subi une infection à l'OsHV-1 ou non, aucun gène n'est significativement différentiellement régulé. Cependant, ces résultats nécessitent plus d'analyses. L'objectif de la suite des analyses sera d'identifier un « cœur » de gènes parmi les gènes candidats que nous avons identifiés participant aux mécanismes de protection. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux 658 gènes. Nous allons traiter séparément tous les différents profils d'expression et les comparer entre les différentes conditions d'infection (stimulées au poly(I:C) ou non). La fonction putative de chaque gène sera identifiée pour en déduire l'implication potentielle dans ces mécanismes. Cette information permettra de discriminer les gènes essentiels et d'identifier les différentes voies de signalisations régulées. Dans un deuxième temps, l'étude de l'ensemble des gènes régulés par le poly(I:C) (2150 gènes) devra être réalisée pour étudier les gènes qui n'appartiennent pas aux catégories GO enrichies. Cette approche nous permettra (1) d'enrichir les données sur les voies de signalisations identifiées et (2) d'identifier d'autres gènes candidats pouvant être décrits dans la littérature comme étant impliqués dans une stimulation par un acide nucléique ou par un virus pouvant être de bons

candidats pour comprendre les mécanismes de priming immunitaire. Ensuite, dans le génome de l'huître, il existe de nombreuses familles multi-géniques. Par exemple, pour les récepteurs Toll, 83 gènes ont été identifiés ou pour les récepteurs RIG-like, 11 gènes sont identifiés (Zhang et al. 2012, Zhang et al. 2015). L'identification précise des gènes impliqués dans ces familles multi-géniques permettra de caractériser plus finement les voies de signalisation affectées. Enfin, les différents profils que nous avons obtenus tendent à montrer qu'une réponse de type maintenue est principalement mise en place, soulevant la question du coût physiologique chez l'huître pour le maintien du niveau d'expression de ces gènes au cours du temps. Afin de confronter ces hypothèses non plus à 10 jours, mais sur le long terme, nous allons suivre le niveau d'expression de gènes candidats, par qPCR, sur un autre lot d'huîtres stimulées sur une cinétique plus longue. Dans l'article 1 présenté dans le chapitre 1, l'expérimentation ayant montré un effet protecteur du poly(I:C) permettra de suivre l'expression des gènes candidats sur une cinétique de 126 jours.

- Les mécanismes de protection au niveau de l'activité de l'OsHV-1

Le suivi de la charge virale et de l'activité de réplication du virus *via* l'étude des transcrits viraux a permis de révéler que la stimulation avec du poly(I:C) restreint la réplication du virus dans les huîtres. Dans cette expérimentation, nous avons confirmé que, dans les huîtres non stimulées, l'injection de virus OsHV-1 a entraîné une augmentation de la charge d'ADN viral quantifiable suggérant une réplication virale. Pour les huîtres stimulées par le poly(I:C), ce travail a confirmé que la stimulation des huîtres avant une infection virale avec OsHV-1 réduisait la charge virale (*cf* Chapitre 1, Article 1 et (Green et Montagnani 2013b)). En outre, le séquençage du transcriptome a permis d'étudier l'expression des gènes de l'OsHV-1 suite à l'infection chez des huîtres stimulées ou non. En ce qui concerne les huîtres non stimulées, suite à l'infection virale, notre expérience a confirmé une activité transcriptionnelle du virus dès 12 heures après l'infection, plus important encore à 24 heures après l'injection d'OsHV-1, en accord avec la littérature (Segarra et al. 2014b, Segarra et al. 2014c, He et al. 2015). D'autre part, chez les animaux stimulés avec du poly(I:C) 10 jours avant l'injection d'OsHV-1, nous n'observons aucune activité transcriptionnelle 12 heures après l'infection. Cependant, la charge virale d'ADN détectée 2 jours après l'infection pourrait correspondre à une activité transcriptionnelle faible du virus identifiée par RNA-seq 24 heures après l'infection. Il est possible que cette détection très faible de transcrits viraux 24 heures après l'infection puisse provenir d'une stimulation mal effectuée du poly(I:C) ou incomplète n'ayant pas permis d'enrayer cette infection virale. Par ailleurs, il est possible que le poly(I:C) restreigne l'entrée du virus dans la cellule, mais que certains virus réussissent à se répliquer. Chez les vertébrés, des

travaux ont caractérisé les étapes de réplication d'herpès virus et ont montré que la synthèse d'ADN viral précède la sécrétion des nouveaux virions (Roizman and Sears, 1987). Chez l'huître, des travaux ont montré la détection de transcrits viraux correspondant à de l'ADN polymérase (ORF100) essentiel pour la réplication du génome viral dès 18h après l'injection de l'OsHV-1 (Segarra et al. 2014b). Il est donc possible que l'ADN détecté soit de l'ADN néo-synthétisé mais ne corresponde pas à de nouveaux virions. Cependant, il semble clair que l'injection de poly(I:C) dans les huîtres a permis de stimuler les mécanismes immunitaires permettant de restreindre la réplication virale. Par ailleurs, durant la rédaction de cette thèse, après que les analyses par RNA-seq aient été réalisées, le génome de l'OsHV-1 μ var a été séquencé (Burioli et al. 2017, Rosani and Venier 2017) et est maintenant disponible. L'ensemble de nos analyses par RNA-seq devront être à nouveau effectuées sur ce nouveau génome.

En conclusion, d'une part, l'injection de poly(I:C) entraîne une surexpression d'un ensemble de gènes, notamment impliqués dans l'immunité, dont l'expression est majoritairement maintenue jusqu'à au moins 10 jours après stimulation. Ce fort niveau de régulation dès l'infection avec le virus OsHV-1 semble être efficace puisqu'il est associé à une réplication de l'OsHV-1 quasi-inexistante et à une protection totale de ces huîtres. D'autre part, l'injection d'eau de mer comme contrôle n'entraîne qu'une très faible régulation de ces gènes dont l'expression va être très fortement régulée après l'infection avec l'OsHV-1. Cette régulation transcriptomique à l'arrivée du virus est probablement trop tardive et donc inefficace, le virus se réplique fortement et le taux de survie des huîtres est proche de zéro.

IV. Données complémentaires

Différentes études réalisées dans le cadre de différents types d'interactions ont montré l'implication de mécanismes cellulaires dans le phénomène priming immunitaire, telle que la phagocytose (Mori and Stewart 2006, Pham et al. 2007, Rowley and Powell 2007, Roth and Kurtz 2009, Fu et al. 2010, Pope et al. 2011, Zhang et al. 2014). Chez l'huître, les principales cellules immunocompétentes et phagocytaires sont les hémocytes (Bachere et al. 2015) qui ont été classés en 3 grandes catégories, les blastes, les hyalinocytes et le granulocytes en fonction de leur taille et de leur morphologie (Bachere et al. 1988, Bachere et al. 2015). Nous avons réalisé au cours de cette thèse des travaux préliminaires visant à déterminer l'implication des hémocytes dans le phénomène de priming immunitaire. Pour cela, nous avons réalisé une expérimentation visant à suivre l'évolution des populations hémocytaires sur des temps courts après la stimulation des huîtres avec différentes solutions. Pour cela, nous avons injecté trois lots de 15 huîtres avec trois types de solutions stimulantes :

- Poly(I:C) (10 μ g), pour suivre son effet lors du priming immunitaire antiviral
- *V. tasmaniensis* LGP32 tués à la chaleur, afin d'identifier s'il existe des différences de réponses antivirales/antibactériennes.
- de l'eau de mer filtrée comme contrôle d'injection.

Nous avons prélevé l'hémolymph de 5 des 15 animaux à 3 temps post injection : 24h, 48h et 96h. L'hémolymph prélevée a été analysée en cytométrie en flux (FACS) permettant d'analyser les proportions des différentes populations hémocytaires. La proportion relative de chaque population hémocytaire par rapport au nombre total d'hémocytes analysés a été calculée pour chaque type de stimulant utilisé (**Figure 18**)

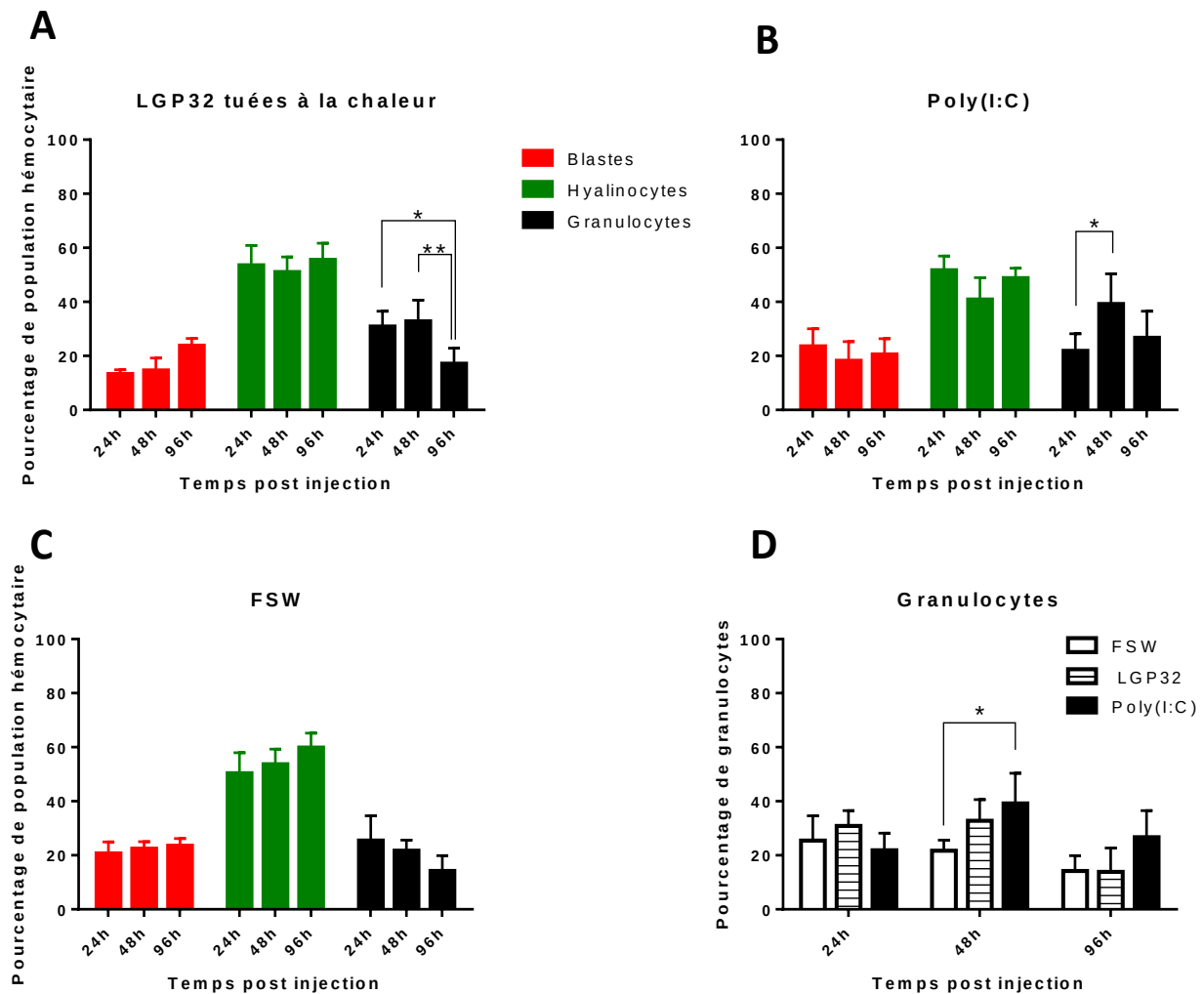


Figure 18 : Proportion relative de 3 populations hématocytaires d'huîtres lors de stimulation bactériennes ou avec du poly(I:C). Trois populations hématocytaires (blastocytes, hyalinocytes et granulocytes) étudiées chez du naissain d'huître injecté par (A) de l'eau de mer filtrée (FSW), (B) du poly(I:C) ou (C) *V. tasmaniensis* LGP32 à 24h, 48h et 96h après l'injection des solutions. (D) la sous-population de granulocytes pour les différentes conditions aux différents temps. n=5, p-value <0.005, two-way Anova.

Les résultats montrent que les animaux contrôles injectés avec de l'eau de mer seule (FSW) ne présentent pas de différence significative entre les populations hématocytaires, blastocytes, hyalinocytes et granulocytes aux différents temps post injection (**Figure 18 A**). Concernant les huîtres injectées avec *V. tasmaniensis* LGP32 tués à la chaleur, il n'y pas de différences de pourcentage pour les blastocytes et les hyalinocytes aux différents temps. Par contre, nous observons une diminution du pourcentage de granulocytes à 96h (17%), par rapport à 24h et 48h (30 et 32 %, respectivement) (**Figure 18 B**). Concernant les huîtres stimulées avec le poly(I:C) là non plus il n'y a pas de changements populationnels pour le blastocytes et les hyalinocytes. Cependant, nous observons une

augmentation du pourcentage de granulocytes entre 24h (22%) et 48h (39%), qui redescend ensuite au niveau basal à 96h (26%) (**Figure 18 C**).

Ces résultats montrent donc des profils distincts entre les variations de pourcentages de granulocytes chez des animaux stimulés avec des bactéries tuées ou du poly(I:C). Nous pouvons émettre différentes hypothèses pour expliquer ces variations. Une diminution des granulocytes pourrait être due à un phénomène de dégranulation ou une mobilisation, par infiltration, dans d'autres tissus de l'huître. La diminution du pourcentage de granulocytes suite à une dégranulation a déjà été mise en évidence dans les hémocytes en réponse à l'exposition à une protéine de reconnaissance des peptidoglycanes (Iizuka et al. 2014). Une augmentation des granulocytes pourrait reposer sur une différenciation de cellules agranulaires en cellules granulaires. L'induction de la production de composés granulaires au sein des hémocytes (au cours de la phagocytose par exemple). L'observation d'une augmentation puis d'une diminution de la quantité de granulocytes lors d'une infection virale a par ailleurs déjà été observée chez le pétoncle *Chlamys farreri* face au virus AVNV suggérant son implication dans les processus immunitaires (Lin et al. 2011). De plus, des travaux portant sur les réponses cellulaires antivirales chez les vertébrés, ont identifié la présence de granules de stress impliqués dans une réponse antivirale (Simpson-Holley et al. 2011, Rozelle et al. 2014). Ces granules de stress sont des corps cytoplasmiques capables de stocker des ARNm et des protéines recrutés en condition de stress (Anderson and Kedersha 2009). Cette composition serait adaptée spécifiquement à un type de stress (réponse antivirale, stress thermique, stress oxydatif, hyperosmolarité, etc.). Il a été démontré que la quantité de ces granules augmentait en nombre dans le cas d'infections virales chez les vertébrés (Anderson and Kedersha 2009). Ces granules de stress ont été caractérisées comme contenant différents composants d'initiation à la traduction (Buchan and Parker 2009). La présence de granules de stress a été caractérisée chez la drosophile lors de stress thermiques (van der Laan et al. 2012, Gareau et al. 2013, Jevtov et al. 2015).

Dans l'hypothèse de la conservation de ces granules de stress chez l'huître, il serait intéressant de rechercher leur présence au sein des populations de granulocytes, notamment par microscopie électronique et par des techniques de révélations par anticorps (protocole établi chez les vertébrés) pour comprendre leur rôle dans le priming. De manière plus générale, nos résultats soulèvent la question de la nature et de la fonction de ces granulocytes. Il serait intéressant de caractériser et d'étudier leur fonction pour comprendre leur implication dans les phénomènes de priming. Ces résultats devront être confirmés en répétant ces expérimentations, sur des temps plus longs après l'injection de poly(I:C) ou de bactéries tuées pour en déterminer la persistance de l'effet. Par ailleurs, en utilisant cette même technique utilisée dans nos travaux préliminaires, les proportions hémocytaires chez des huîtres stimulés puis infectés avec les pathogènes virulents

pourraient être suivies afin d'identifier leurs réponses au cours de la primo-stimulation et du challenge. De plus, afin d'évaluer les modifications fonctionnelles des populations hémycytaires, des suivis d'activités de phagocytose pourraient être envisagés. Ensuite, comme il n'existe pas de consensus clair sur les lignages hémycytaires (Bachere et al. 2015), des travaux pourraient être réalisés pour identifier d'éventuels progéniteurs. Grâce au suivi des événements de mitoses par incorporation d'un analogue nucléotidique, l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) puis une révélation en fluorescence analysable en FACS.

Discussion générale et perspectives



Lafont M.

Discussion générale et perspectives

L'huître creuse est victime d'une maladie poly-microbienne tuant depuis 2008 les juvéniles et le naissain dans des proportions alarmantes pouvant atteindre 100% et pour laquelle il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement prophylactique ou thérapeutique (Segarra et al. 2010). Dans cette maladie, la présence d'un agent infectieux, le virus OsHV-1 est fortement associé à ces épisodes de surmortalité massive (Segarra et al. 2010, Martenot et al. 2011). Au début de ces travaux, très peu de données étaient disponibles sur la réponse antivirale chez les mollusques et l'huître. C'est dans ce contexte qu'ont été développés, au sein de mon laboratoire d'accueil, des projets visant à comprendre et décrire la réponse antivirale et envisager des moyens de protection en utilisant le priming immunitaire. Le priming immunitaire correspond à une amélioration de la réponse immunitaire lors d'une seconde rencontre avec un agent pathogène déjà rencontré. Des premiers travaux avaient permis de mettre en évidence qu'une injection d'ARN double brin synthétique, le poly(I:C), permettait d'entraîner une réponse antivirale efficace lors d'une infection avec l'OsHV-1 (Green and Montagnani 2013). Ces résultats ont donc suggéré pour la première fois l'existence d'un priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. En se basant sur des données préliminaires obtenues au laboratoire, ces travaux de thèse avaient pour objectif de caractériser le priming immunitaire antiviral l'huître creuse *Crassostrea gigas* face au virus pathogène, l'Ostreid herpes virus 1 (OsHV-1). Ces travaux de thèse se sont focalisés dans un premier temps sur une approche phénoménologique permettant de décrire le phénomène de priming immunitaire et dans un deuxième temps sur une approche globale permettant d'appréhender les mécanismes moléculaires sous-jacents au priming immunitaire antiviral chez l'huître.

1. Le priming immunitaire et ses mécanismes chez l'huître creuse

La caractérisation du priming immunitaire est un aspect très important pour la compréhension de ce phénomène et beaucoup d'études ne se focalisent encore que sur une description partielle de ce phénomène. Il est important de pouvoir intégrer différents aspects comme l'effet sur l'amélioration de la survie, mais aussi 2 éléments importants, à la base de ce phénomène, la spécificité de la réponse et la mémoire immunitaire. A l'heure actuelle, le priming immunitaire antiviral est encore très peu décrit dans la littérature et beaucoup de questions restent encore sans réponse concernant ces mécanismes. C'est ce que ces travaux de thèse ont entrepris : décrire le priming immunitaire antiviral de la manière la plus exhaustive possible pour clairement

identifier et caractériser ce priming immunitaire. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vivo* utilisant le virus pathogène OsHV-1, un agent mimétique viral, le poly(I:C) et un hôte expérimental, l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

a. Spécificité du priming immunitaire chez l'huître

Une des caractéristiques et sujet de débat concernant le priming immunitaire est sa spécificité. Des travaux ont mis en évidence des cas de protections croisées comme par exemple entre une primo stimulation avec du LPS qui protège d'une infection fongique chez *Tenebrio molitor* (Moret and Siva-Jothy 2003). D'autres travaux ont suggéré le rôle d'une primo-stimulation avec la bactérie du genre *Wolbachia* chez le moustique *Aedes aegypti* entraînant une forte protection antivirale contre le virus de la dengue (Rances et al. 2012). Les travaux précédents réalisés au laboratoire suggèrent que le poly(I:C) induit une protection spécifiquement antivirale. En effet, ces travaux ont montré que la stimulation des huîtres par des bactéries pathogènes *V. tasmaniensis* LGP32 tuées à la chaleur ne permettait pas de protéger des infections virales à l'OsHV-1 (Green and Montagnani 2013)(Lafont et al. en révision). Chez l'huître, nous n'avons pas observé ce phénomène de protection croisée par une stimulation bactérienne entraînant une protection antivirale. Nos résultats suggèrent donc une forme de spécificité de réponse. Nous avons donc au cours de cette thèse mené des approches pour pouvoir caractériser la spécificité du priming antiviral et explorer d'autres formes de priming immunitaire.

Dans un premier temps, nous avons testé la spécificité de la protection induite par le poly(I:C). Nous avons montré qu'une protection antivirale efficace pouvait être induite par l'injection du poly(I:C) mais aussi de différents types d'acides ribonucléiques doubles brins et simples brins, de tailles et de séquences variables (cf Chapitre 1, Article 1). Des travaux réalisés chez la crevette ont montré que cette diversité d'acides nucléiques permettait de protéger des infections virales au WSSV (white spot syndrome virus) (Escobedo-Bonilla et al. 2015). Cependant, le poly(I:C) ne protégeait que transitoirement des infections virales (Robalino et al. 2004, Wang et al. 2013b). Chez la truite arc-en-ciel tout comme chez les mammifères, des travaux ont montré que différents ARN doubles brins induisaient une protection antivirale mais que cette protection était dépendante de la taille des fragments d'ARN utilisés (Mian et al. 2013, Poynter and DeWitte-Orr 2015). Les ARNs de grande taille entraînaient une réponse plus robuste que ceux de petite taille (Poynter and DeWitte-Orr 2015). L'ensemble de ces travaux suggère chez les vertébrés et les invertébrés que les réponses immunitaires sont dirigées par différents mécanismes et différentes voies de signalisations (Robalino et al. 2007, de Faria et al. 2013, Labreuche and Warr 2013, Mian et al. 2013, Wang et al. 2015). Il serait intéressant de pouvoir, chez l'huître, identifier précisément les mécanismes mis en jeu lors des

stimulations avec ces différents acides nucléiques. Pour cela, nous pourrions d'une part comparer les profils d'expression transcriptomique des gènes candidats identifiés par nos travaux de RNA-seq lors de stimulation avec du poly(I:C) avec les profils de réponse lors de stimulation avec les autres acides nucléiques. Une autre approche plus globale par RNA-seq *de novo* permettrait alors de pouvoir identifier les différences de mécanismes mis en place lors de la stimulation par ces différents acides nucléiques. Enfin, afin de décrire ce priming immunitaire antiviral de manière plus exhaustive à des fins appliquées et pour comprendre plus en profondeur les mécanismes mis en jeu, il serait important de pouvoir tester une plus grande amplitude de stimulant pour caractériser les limites de ce priming. Pour cela, d'autres types de molécules ayant montré des effets antiviraux chez d'autres modèles pourraient être utilisées comme : du LPS ayant montré un potentiel d'activation de TLR3 (agoniste du poly(I:C)) chez les vertébrés (Pan et al. 2011) ; de l'ADN CpG (Wang et al. 2013b) ; de l'ADN codant des protéines virales de l'OshV-1 (Rout et al. 2007) ou encore directement des protéines virales de l'OshV-1, dont la technique a été testée à partir de protéines de WSSV chez la crevette (Witteveldt et al. 2004).

Dans un second temps, nous voulions tester si la protection induite par le poly(I:C) était spécifique de la protection au virus OshV-1. A l'heure actuelle, aucun autre virus pathogène n'est identifié chez *Crassostrea gigas*, associé aux mortalités, rendant impossible l'étude de l'effet du poly(I:C) sur d'autres virus que l'OshV-1 chez *C. gigas*. Nous nous sommes donc intéressés à un autre microbe pathogène associé aux mortalités chez les juvéniles de *C. gigas*, la bactérie pathogène *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Chez l'huître, nous avons montré que le poly(I:C) ne protégeait pas des infections contre *V. tasmaniensis* LGP32 suggérant donc une réponse immunitaire poly(I:C) dépendante, spécifiquement antivirale. Ce résultat est cohérent avec la littérature. En effet aucune étude ne faisant état d'une protection croisée suite à une primo-stimulation virale contre des bactéries n'a encore été publiée à notre connaissance. Cependant, il faudrait confirmer ce résultat d'absence de protection croisée en testant l'effet du poly(I:C) sur d'autres agents pathogènes et notamment d'autres espèces bactériennes pathogènes chez l'huître de l'espèce *Vibrio tasmaniensis* et de l'espèce *Vibrio crassostreae* (Gay et al. 2004, Lemire et al. 2015, Bruto et al. 2017). Enfin, des travaux suggèrent que le priming immunitaire n'est pas restreint à la protection antivirale chez l'huître mais que des mécanismes antibactériens pourraient aussi exister (Zhang et al. 2014, Liu et al. 2016, Li et al. 2017a). Nos résultats préliminaires restent à être confirmés et les mécanismes restent encore à être identifiés. Ces observations représentent une perspective intéressante dans le modèle huître où des priming immunitaires antibactériens et antiviraux sont identifiés et pourraient permettre de comprendre le poids relatif de chaque agent pathogène dans cette maladie multifactorielle.

b. Une protection à long terme

Une autre question au cœur des débats concernant le priming immunitaire est celle de l'existence d'une forme de mémoire immunitaire innée. Dans nos travaux, nous avons montré une amélioration de la survie sur le long terme, lors d'infections réalisées en milieu contrôlé et en milieu naturel plus de 4 mois après la stimulation avec le poly(I:C). Comparée à d'autres études, cette durée est la plus longue identifiée chez un invertébré. Cependant, il est important de tenir compte de la durée de vie de l'animal. Chez l'huître creuse, les larves, le naissain et les juvéniles sont sensibles aux infections à l'OsHV-1 tandis que les adultes le sont beaucoup moins. Sachant que cette transition des stades larvaires aux stades adultes dure environ 2 ans (dépendant de l'élevage et extrêmement variable suivant les zones géographiques), la durée de protection que nous avons identifiée représente environ 20% de la période sensible de l'huître. Il est donc nécessaire de pouvoir tester la durée de la protection du poly(I:C) sur toute la vie de l'huître pour déterminer si cet effet protecteur est durable et stable ou alors à long terme mais transitoire. De plus, il est intéressant de noter que cette protection induite par le poly(I:C) est relativement longue et semble stable chez l'huître en comparaison aux protections transitoires observées chez différents modèles invertébrés (Milutinović and Kurtz 2016). En effet, chez la crevette, l'injection de poly(I:C) 6h avant une infection virale par le WSSV protège des mortalités (Wang et al. 2013b) tandis que si le poly(I:C) est injecté 72h avant l'infection, aucune protection n'est observée (Robalino et al. 2004). Ces résultats suggèrent chez la crevette une réponse antivirale précoce et transitoire qui ne permet pas de protéger sur le long terme. A l'inverse, chez l'huître, nous avons montré que cette protection est précoce et durable suggérant ainsi l'existence d'une forme de mémoire immunitaire.

Une des possibilités de cette protection sur le long terme serait une persistance du poly(I:C) dans l'huître qui stimulerait de manière continue les mécanismes antiviraux. Nos travaux ont montré que le poly(I:C) est dégradé en moins de 24h dans l'hémolymph et en moins de 48h dans l'eau de mer (cf Article 1, chapitre 1) et les travaux de Masood et collaborateurs ont montré que la détection du poly(I:C) diminuait après 15h post-injection chez l'huître *Saccostrea glomerata* (Masood et al. 2016) et après 24h chez *C. gigas* en suggérant sa persistance à 48h (Masood et al. 2017). De plus, chez l'homme, le poly(I:C) a un temps de demi-vie de 6 minutes dans le plasma humain (Declercq 1979). Il est peu probable que cette protection sur le long terme soit due à une stimulation continue induite par la persistance du poly(I:C) dans l'huître. Cependant, il est nécessaire de pouvoir identifier la localisation du poly(I:C) dans les différents tissus de l'huître et d'y suivre sa persistance. Pour cela, il est envisageable d'effectuer des marquages anticorps anti-poly(I:C) sur des coupes histologiques d'huîtres.

Cependant, une réponse immunitaire de type maintenue pose la question du coût énergétique pour l'huître. En effet, une réponse maintenue est extrêmement coûteuse et un investissement aussi important ne peut pas être sans répercussion sur l'huître (Moret and Schmid-Hempel 2000). Dans le cas d'un « trade-off » entre une diminution de l'investissement physiologique d'une fonction ou d'un processus biologique au détriment de l'immunité a été démontré notamment chez les plantes (Huot et al. 2014) et les invertébrés (Schwenke et al. 2016). Dans le cas de l'huître, cet effet de l'investissement énergétique dans l'immunité pourrait avoir un impact dans les populations d'huîtres en zones d'élevages. Il serait intéressant dans ce cas d'étudier la « fitness » des huîtres au cours du priming par du poly(I:C) et de déterminer si une réponse maintenue pourrait se faire au détriment de la croissance des animaux ou de tout autre processus physiologique.

c. Les mécanismes du priming immunitaire antiviral

Pour étayer les hypothèses concernant la spécificité et la mémoire induite par le priming immunitaire, la question clé reste celle des bases moléculaires sous-jacentes à ces processus. Au cours de cette thèse, nous avons entrepris d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents au phénomène de priming immunitaire antiviral, encore peu décrits et dont les données sont extrêmement fragmentaires dans la littérature. Pour ce faire, nous avons réalisé une approche globale par séquençage des ARN pour identifier les gènes régulés au cours de ce priming immunitaire antiviral chez *C. gigas*. Par cette approche, nous avons pu constater que le poly(I:C) entraînait la régulation de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions immunitaires et notamment des fonctions antivirales, ce qui expliquerait pourquoi la protection est spécifique contre l'OsHV-1 et ne protège pas contre *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Parmi ces fonctions nous pouvons relever le système interféron de type I ainsi que des mécanismes de mort cellulaire programmée. Alors que bien décrit chez les vertébrés (Randall and Goodbourn 2008), le système interféron est un des mécanismes antiviraux absents chez les insectes (Kingsolver et al. 2013). Chez l'huître, la voie des interférons semble être conservée d'après les analyses *in silico* du génome (Green et al. 2015a). Les travaux réalisés par Green et collaborateurs en 2015 ont en effet pu mettre en évidence la présence dans le génome de différentes voies de signalisation antivirales suggérant l'existence d'un système de type interféron (Green et al. 2015a). Des analyses transcriptomiques réalisées lors d'infections par l'OsHV-1 ou de stimulations d'huîtres par le poly(I:C), suggèrent son existence fonctionnelle, bien qu'à ce jour, aucun interféron n'a encore été identifié chez l'huître (Segarra et al. 2014c, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016b, Pauletto et al. 2017). Cependant, l'expression de différents ISGs (interferon stimulated genes) peut aussi être directement induite en l'absence d'interféron (Sen and Peters 2007). D'autres fonctions identifiées lors de l'approche RNA-seq sont les mécanismes de mort cellulaire. Ces fonctions de mort cellulaire, sont des mécanismes permettant de juguler

l'infection virale en limitant la réplication du virus dans les cellules. L'apoptose est un des mécanismes souvent décrits comme impliqués dans les réponses antivirales lors d'infections avec l'OshV-1 (pour revue, voir (Wang et al. 2017) et (Arzul et al. 2017)). De plus, il n'est pas surprenant de voir l'apoptose régulée en réponse à un ARN double brin, ce phénomène est caractérisé chez les vertébrés (Gantier and Williams 2007). Cependant, chez l'huître, quelle est la fonction de l'apoptose lors d'une stimulation avec des acides nucléiques alors que l'OshV-1 n'est pas présent dans l'organisme ? Bien qu'*a priori* ce mécanisme ne présente aucun intérêt pour l'huître dans ce cas, dans nos analyses, nous avons identifié différentes molécules pro-apoptotiques telles que des caspases et d'autres anti-apoptotiques tels que des IAP (inhibitor of apoptosis proteins). Il serait nécessaire d'identifier l'apoptose d'un point de vue fonctionnel, dans des coupes histologiques d'huîtres stimulées par du poly(I:C) et suivre par marquage TUNEL ou TMRNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase TetraMethylRhodamine Nick End Labelling) des fragmentations d'ADN et ainsi déterminer si des cellules rentrent en apoptose en réponse à la stimulation avec du poly(I:C).

Un autre mécanisme antiviral bien connu chez les vertébrés et les invertébrés est l'interférence de l'ARN. C'est une des voies préférentielles dans l'immunité antivirale des arthropodes (Kemp et al. 2013, Nayak et al. 2013). Ce mécanisme a été identifié chez la crevette (pour revue, voir (Labreuche and Warr 2013)), notamment lors de primo-stimulations avec des acides nucléiques, efficaces pour lutter contre le virus WSSV (Nilsen et al. 2017). Chez l'huître, le génome de l'huître a révélé la présence de ce mécanisme conservé au cours de l'évolution (Green et al. 2015a). Cette voie est fonctionnelle chez les mollusques (voir pour revue, voir Owens et al. 2015), mais la stimulation de cette voie par des acides nucléiques synthétiques tels que le poly(I:C), n'ayant pas d'homologie de séquence avec des ARNm suggère qu'elle n'est pas impliquée dans la réponse au poly(I:C). Nos analyses transcriptomiques par RNA-seq tendent à confirmer cette hypothèse puisque nous n'observons pas de régulation transcriptomique de cette voie. En revanche, des ARNs doubles brins présentant des homologies de séquences avec le virus OshV-1 pourraient jouer un rôle dans cette immunité antivirale. Cette piste reste encore à être étudiée.

Par ailleurs, la diversification des récepteurs (PRRs) pourrait participer aux mécanismes de priming immunitaire antiviral. Dépourvus d'un système adaptatif, les invertébrés possèdent cependant de nombreux récepteurs extrêmement diversifiés pouvant être impliqués dans la spécificité de réponse comme c'est le cas notamment des Dscam et des FREPs. En effet, les Dscam sont impliqués dans le phénomène de spécificité de réponse lors d'infections récurrentes permettant de répondre plus efficacement lors d'infections consécutives de manière spécifique (Dong et al. 2006, Kurtz and Armitage 2006, Dong et al. 2012). Concernant les FREPs, ces protéines ont été suggérés comme participant aux mécanismes de spécificité de réponse dans le phénomène de

priming immunitaire chez *Biomphalaria glabrata* face à *Schistosoma mansoni* (Knight et al. 2014, Pinaud et al. 2016). Dans le génome de l'huître, la présence de récepteurs extrêmement diversifiés pourrait jouer ce rôle (Zhang et al. 2015) et l'augmentation du nombre de ces récepteurs suite à une primo stimulation pourrait alors ainsi permettre de répondre plus rapidement et plus efficacement lors d'une seconde infection et ainsi participer au phénomène de mémoire immunitaire. Cependant, ces molécules sont caractérisées comme telles à partir d'homologies de séquences par rapport à des organismes modèles et leur rôle fonctionnel reste encore à démontrer.

Par ailleurs, des travaux réalisés chez les vertébrés ont émis l'hypothèse que des molécules de « danger » (DAMPs, pour « damage-associated molecular patterns ») jouent un rôle indirect dans l'activation de réponse immunitaire innée antivirale (pour revue, voir (Collins and Mossman 2014)). Ces DAMPs peuvent aussi induire une protection à long terme (Crisan et al. 2016) et pourrait donc participer à cette protection sur le long terme. Tandis que le poly(I:C) est dégradé rapidement dans les fluides de l'huître et l'eau de mer, nous avons observé une réponse de type maintenue au niveau de l'expression transcriptomique. Bien que la persistance du poly(I:C) dans les tissus n'ait pas été identifiée (Masood et al. 2017), si ce n'est pas une activation continue due au poly(I:C), l'hypothèse d'une réponse maintenue, pendant 10 jours dans notre expérimentation, soulève différentes questions. En effet, quel est le profil d'expression des gènes candidats sur le long terme ? Différentes hypothèses existent sur les profils de réponse immunitaire et peuvent être de type maintenue, rappelée ou de type « shift » immunitaire (Coustau et al. 2016). Dans ce cas, quel est le type de profil engagé dans le cas du priming immunitaire antiviral chez l'huître sur le long terme? Nos résultats provenant de nos analyses phénotypologiques montrent une protection au minimum de 126 jours et nos résultats obtenus par RNA-seq tendent à montrer un profil majoritairement maintenu à 10 jours. Il est possible que les temps étudiés dans notre étude transcriptomique ne soient pas suffisamment longs pour observer un retour à un niveau basal d'expression. Il est donc nécessaire de pouvoir suivre sur une cinétique beaucoup plus longue le niveau d'expression de différents gènes candidats identifiés à partir de nos données transcriptomiques, pour pouvoir clairement identifier le ou les profils de réponses impliqués dans le priming immunitaire antiviral chez *C. gigas*. Les hypothèses de mémoire immunitaire et des mécanismes moléculaires seront testés par le suivi des gènes candidats par PCR quantitative en temps réel. Lors de nos expérimentations pour identifier sur le long terme, nous avons montré une protection efficace pour une durée minimale de 4 mois en laboratoire (cf Chapitre 1, Article 1). Nous disposons donc de l'échantillonnage nécessaire pour répondre à la question du maintien non plus à 10 jours, mais à 126 jours. Par ailleurs, ces analyses moléculaires par des approches transcriptomiques permettent d'identifier des voies de signalisations *a priori* impliquées dans le priming immunitaire ainsi que des gènes candidats. Cependant, le rôle de

ces candidats n'est que putatif. En effet, il serait nécessaire de pouvoir valider de manière fonctionnelle l'implication de ces gènes dans ce phénomène de priming immunitaire et ainsi caractériser leur rôle dans les mécanismes de protection. Chez l'huître, quelques travaux ont utilisé la technique de l'interférence à l'ARN en utilisant des ARN doubles brins relativement longs, entre 525 pb et 877 pb, pour réprimer avec succès l'expression du gène « vasa » (Fabioux et al. 2009). Cette technique a été aussi utilisée avec succès en ciblant TGFβ chez l'huître (Huvet et al. 2012). Cependant, l'utilisation de cette technique peut présenter des limites en termes d'applications lorsque ce sont des gènes immunitaires que l'on cherche à interférer. En effet les ARNs doubles brins plus ou moins longs stimulent l'immunité antivirale *via* la reconnaissance par d'autres mécanismes que les voies de l'interférence à l'ARN. Récemment, des travaux ont montré l'efficacité de l'injection de siRNA à des huîtres pour réprimer *in vivo* l'expression de gènes immunitaires comme Bax (Li et al. 2017b) ou de RIG-1 (Huang et al. 2017). Ces dernières approches peuvent permettre une approche prometteuse pour caractériser de manière fonctionnelle l'implication des gènes candidats.

Concernant les gènes candidats à suivre, ce choix est une étape critique. Différents paramètres issus de l'ensemble de nos résultats et de la littérature vont permettre d'orienter le choix de ces gènes. Premièrement, notre analyse transcriptomique globale a révélé de nombreux gènes régulés par la stimulation avec du poly(I:C) jusqu'à 10 jours, mais nos expérimentations phénoménologiques ont montré que la protection est induite dès 24h. Cette observation tend donc à montrer que les gènes régulés dès 24h font partie des gènes candidats pour expliquer l'efficacité du priming antiviral. Ensuite, dans la littérature, de nombreux travaux se sont intéressés à la réponse transcriptomique lors d'infection virale (Jouaux et al. 2013, Green et al. 2014a, He et al. 2015, Rosani et al. 2015, Green et al. 2016b) et ont donc permis d'identifier des gènes régulés chez l'huître lors de l'infection virale pour tenter de limiter cette infection. Ces différents travaux ont étudié la réponse antivirale chez des huîtres infectées avec un broyat d'huître contenant l'OsHV-1 (Schikorski et al. 2011b). Cependant, dans cette solution infectieuse, peuvent se trouver différents éléments comme des acides nucléiques libres, d'huîtres, de virus ou de bactéries, mais aussi des produits de dégradation viraux comme des protéines d'enveloppes, de nucléocapsides ou des produits de dégradations bactériens comme des LPS par exemple. Il y a donc *a priori* dans ces études, des gènes non nécessaires à la lutte contre l'OsHV-1 sont régulés, empêchant ainsi d'identifier les gènes clés de la réponse immunitaire antivirale. De plus, les études transcriptomiques réalisées dans le cadre du projet DECIPHER sur des familles d'huîtres aux phénotypes extrêmement contrastés en terme de survie à cette maladie poly-microbienne tendent à montrer une réponse très précoce chez les huîtres résistante et une réponse similaire, plus intense mais plus tardive chez les huîtres sensibles (de Lorgeril et al. en préparation). En complément, nos travaux réalisés sur l'étude de l'effet du poly(I:C)

pourraient donc apporter une « clé » permettant de déchiffrer les gènes essentiels et nécessaires à la protection des huîtres. A partir de l'ensemble de ces informations et la confrontation des gènes identifiés comme étant régulés lors d'infections à l'OsHV-1 provenant de la littérature, des données provenant du projet DECIPHER ainsi que nos données de RNA-seq, nous pourrions identifier différents gènes dont l'expression précoce est nécessaires aux huîtres pour survivre aux infections virales et alors être de bons gènes candidats à l'étude des mécanismes du priming immunitaire antiviral.

D'autres hypothèses de mécanismes sous-jacents au priming immunitaire peuvent être envisagées d'après la littérature et nos expérimentations préliminaires. C'est le cas notamment de la reprogrammation épigénétique ou des mécanismes cellulaires. Ces mécanismes pourraient apporter des réponses à deux questions essentielles : où et comment le message de mémoire est-il stocké ? Tout d'abord, de plus en plus de travaux réalisés chez les vertébrés tendent à montrer que la reprogrammation épigénétique est un des éléments centraux dans les mécanismes immunitaires entraînant une expression génique appropriée en réponse à différents facteurs notamment des pathogènes (Fernandez-Morera et al. 2010). Cette reprogrammation épigénétique passe par des modifications de marques ou de processus épigénétiques parmi lesquels on retrouve, la méthylation de l'ADN, la modification de la structure chromatinienne, le changement de marque des histones ou encore l'implication d'ARN non codant jouant un rôle dans les étapes de transcription (Bannister and Kouzarides 2011). La reprogrammation épigénétique a été montrée comme jouant un rôle central dans la mémoire immunitaire innée (« trained immunity ») chez les vertébrés (Saeed et al. 2014). Chez les plantes, la reprogrammation épigénétique est suggérée comme étant un des mécanismes impliqués dans la résistance systémique acquise (ou « systemic acquired resistance », SAR) (Conrath et al. 2015). A l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de clairement révéler le rôle d'une reprogrammation épigénétique dans le priming immunitaire durant la vie de l'individu ou de manière trans-générationnelle. Cependant, différents travaux ne font que suggérer que ce mécanisme pourrait participer au priming immunitaire (Castro-Vargas et al. 2017) et plus généralement à la résistance à certains pathogènes (Galindo-Villegas et al. 2012, Vilcinskas 2016, Mukherjee et al. 2017). De plus, des travaux réalisés dans le laboratoire sur le modèle *Biomphalaria glabrata* dans le cadre de la thèse de Silvain Pinaud (Thèse de Doctorat de Silvain Pinaud, 2014-2017), tentent d'étudier ces mécanismes et suggèrent l'implication d'une reprogrammation épigénétique comme support de l'immunité innée mémoire chez ce mollusque gastéropode (communication personnelle, Silvain Pinaud et Benjamin Gourbal). Ensuite, durant ces travaux de thèse, nous avons identifié des mécanismes moléculaires reliés au phénomène de priming immunitaire. Cependant, l'ensemble des analyses a été réalisé sur des individus entiers et les mécanismes cellulaires n'ont pas encore été

caractérisés. Les travaux réalisés chez l'huître dans le cadre de priming immunitaire antibactériens ont révélé un rôle important des mécanismes de phagocytose joué par les hémocytes (Zhang et al. 2014, Li et al. 2017a). De plus, des travaux récents ont montré que l'OsHV-1 est détectable dans les hémocytes par des techniques de PCR quantitative, immunofluorescence et microscopie électronique à transmission et semble donc être un des tissus cibles de l'OsHV-1 (Martenot et al. 2017). Dans le cadre de ma thèse nous avons entrepris d'étudier les réponses cellulaires au cours du priming immunitaire antiviral et nous avons observé des changements de proportions populationnelles particulièrement chez les granulocytes lors de stimulations avec du poly(I:C) (cf Chapitre 2, IV). En reliant nos résultats avec ceux de la littérature, il est probable que différentes sous-populations hémocytaires soient particulièrement impliquées dans cette immunité antivirale. Une approche possible serait de suivre ces différentes sous populations chez des huîtres stimulées ou non par du poly(I:C) puis infectées par l'OsHV-1. D'une part, des tris cellulaires effectués par FACS (« fluorescence-activated cell sorting ») permettraient de dénombrer et séparer les différentes sous populations hémocytaires. D'autre part, des marquages par immunofluorescence permettraient d'identifier la présence de l'OsHV-1 dans ces sous-populations hémocytaires et ainsi caractériser leur rôle dans les mécanismes de priming immunitaire antiviral.

Enfin, les résultats que nous avons obtenus par nos analyses de RNA-seq ont donc permis de montrer une réponse immunitaire majoritairement de type maintenue. De plus, ces résultats nous ont aussi permis de révéler que l'huître devait répondre très précocement pour pouvoir être protégée des infections à l'OsHV-1. De plus, durant les travaux de cette thèse, nous avons travaillé à partir d'huîtres de fonds génétiques extrêmement différents et qui étaient toutes protégées des infections suite à la stimulation par le poly(I:C). Nos travaux ont permis de suggérer que des huîtres sensibles aux infections virales sont capables de survivre si elles ont été stimulées par le poly(I:C) permettant d'activer précocement l'expression des gènes nécessaires à la survie. Les travaux réalisés dans le cadre du projet DECIPHER ont eux aussi révélé que la réponse immunitaire des huîtres résistantes était plus précoce que celle des huîtres sensibles au syndrome de mortalité massive des juvéniles (de Lorgeril et al. en préparation). L'ensemble de ces observations, pose donc la question des mécanismes déclencheurs de cette réponse. Les hypothèses émises précédemment concernant les mécanismes épigénétiques pourraient participer à expliquer cette précocité d'activation.

2. Le rôle de l'OsHV-1 dans la maladie poly-microbienne

Dans ces travaux de thèse, nous avons montré que la primo-stimulation des huîtres par du poly(I:C) avait pour conséquence une charge virale beaucoup plus faible lors d'infection à l'OsHV-1 par rapport à des animaux non stimulés. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans d'autres études chez l'huître (Green and Montagnani 2013), mais aussi chez les vertébrés (Alexopoulou et al. 2001). Notre approche par RNA-seq nous a permis de suivre les transcrits viraux lors d'infections chez les huîtres stimulées ou non stimulées. La réplication de l'OsHV-1 est beaucoup plus réduite voire inexistante lorsque les huîtres avaient été stimulées avec le poly(I:C) (cf Article 2, chapitre 2), ce qui explique des charges virales en ADN détectées très faibles. Cependant, nous pouvons émettre 2 hypothèses par rapport à ces résultats. Soit la stimulation des huîtres par le poly(I:C) a pour effet d'empêcher ou de limiter l'entrée du virus, soit elle n'empêche pas l'entrée du virus mais limite sa réplication dans des étapes critiques du cycle de réplication. Concernant la première hypothèse, chez les vertébrés, des travaux ont montré que la stimulation de macrophages murins avec du poly(I:C) entraîne une augmentation de l'enzyme cholestérol 25-hydroxylase *via* la production d'interferons (Park and Scott 2010). Cette enzyme convertit le cholestérol en 25-hydroxycholesterol (25HC), capable d'empêcher l'entrée de nombreux virus enveloppés à ADN et ARN comme le virus Ebola, le VSV (Virus de la stomatite vésiculaire), le HIV (virus de l'immunodéficience humaine) ou encore l'herpès virus murin 68 (MHV68) (Liu et al. 2013b). Le 25HC bloque la fusion de la membrane entre le virus et la cellule l'empêchant ainsi de rentrer dans la cellule et donc de s'y répliquer. Cette molécule est présente dans le génome de l'huître (CGI_10015440), mais n'est pas régulée dans notre modèle lors d'une stimulation par le poly(I:C) ni l'OsHV-1. Il est donc possible qu'un mécanisme similaire soit mis en jeu dans notre modèle, mais n'ait pas encore été identifié. Concernant la deuxième hypothèse, des travaux réalisés chez les vertébrés ont montré que la grande diversité d'ISGs (Interferon stimulated genes) peut empêcher la réplication virale en intervenant dans toutes les étapes du cycle (fusion à la membrane, transcription, traduction, assemblage, excrétion). C'est le cas de la vipérine, un ISG présent chez l'huître (Green et al. 2015b), dont la cible chez les vertébrés sont les radeaux lipidiques ; son interaction avec ces radeaux lipidiques va empêcher la libération des virus néo-synthétisés (Wang et al. 2007). Dans ce cas, l'ADN viral est quantifiable par les techniques de qPCR, mais il n'y a pas de nouveaux virus libérés. Dans nos analyses, nous observons une augmentation très faible de la charge virale en ADN chez les animaux stimulés avec du poly(I:C) et infectés avec l'OsHV-1 ainsi qu'une très faible réplication virale. Il est donc probable que ce soit une combinaison de nos deux hypothèses qui soit mise en place, le poly(I:C) empêche l'entrée du virus OsHV-1, mais quelques virus échappent à ce premier contrôle et entrent dans la cellule puis initient une réplication qui serait ensuite bloquée

avant la libération des nouveaux virus. A l'heure actuelle, le cycle viral de l'OshV-1 n'est pas caractérisé et l'absence de lignées cellulaires ne permet pas encore de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Cependant, ces hypothèses pourraient être vérifiées *via* le suivi des transcrits d'OshV-1 par RNA-seq sur une cinétique plus longue ainsi que l'identification des fonctions des transcrits régulés. Par ailleurs, des observations en microscopie électronique à transmission pourraient permettre de savoir si le virus rentre ou non dans des cellules. Des travaux récents ont permis de montrer que l'OshV-1 est capable de se répliquer dans des primo-cultures d'hémocytes et ces travaux pourraient permettre de lever ce verrou (Morga et al. 2017).

Nos résultats en milieu contrôlé ont montré que le poly(I:C) protège des mortalités lors d'infections à l'OshV-1 mais ne protège pas des infections avec une bactérie pathogène chez l'huître. Dans nos expérimentations en milieu naturel, nous avons montré que le traitement des huîtres avec du poly(I:C) permettait de protéger du syndrome de surmortalité massive affectant les juvéniles alors que le site ostréicole où se trouvaient les huîtres était positif aux détections de *Vibrios* du clade *Splendidus* (RESCO, Juin 2016). De plus, nous avons montré que le poly(I:C) permet de limiter drastiquement la réplication du virus, montrant ainsi clairement un rôle primordial du virus dans cette maladie poly-microbienne affectant les juvéniles. Le virus OshV-1 apparaît donc comme essentiel et nécessaire au déclenchement de la maladie. Ainsi, différentes questions restent en suspens. Comment l'OshV-1 participe-t-il au phénomène de surmortalité massive chez les juvéniles ? Le virus OshV-1 est-il suffisant pour induire les mortalités ? Ces questions sont au cœur du projet DECIPHER. Pour répondre à cette première question, les travaux réalisés ont permis de révéler que l'infection virale déstabilise le microbiote des huîtres puis des bactéries opportunistes vont coloniser l'huître, parmi lesquelles on peut retrouver des pathogènes, participant au phénomène de mortalité (de Lorgeril et al. en préparation). Ces résultats semblent orienter les hypothèses vers un rôle essentiel et nécessaire de l'OshV-1 mais *a priori* pas suffisant (Petton et al. 2015). Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait infecter des huîtres axéniques uniquement avec l'OshV-1, ce qui est à l'heure actuelle impossible dans ce modèle. Par ailleurs, dans le cadre d'infections naturelles, différents travaux ont révélé des charges virales pouvant être importantes chez des individus ne déclenchant pas de mortalité, soulevant ainsi des questions de tolérance lors de ces infections en milieu naturel (Petton et al. 2015, Evans et al. 2017a).

3. Perspectives appliquées

A l'heure actuelle, les sélections d'huîtres reposent sur des programmes de sélections massales, longs et très coûteux (Degremont et al. 2010b, Degremont et al. 2015b). Comme nous venons de le voir au cours de cette thèse, nos travaux ont permis de mettre en évidence que la stimulation des huîtres par le poly(I:C) permettait de réduire considérablement les mortalités lors d'infections virales à l'OsHV-1. De plus, le traitement des huîtres par cet ARN double brin permet de protéger les huîtres du phénomène de surmortalité massive en milieu naturel, améliorant le taux de survie entre 80% et 93% suite à deux déploiements deux années consécutives. Ces résultats sont extrêmement encourageants pour permettre d'apporter des solutions de sortie de crise ostréicole. Cependant, il est à l'heure actuelle difficilement envisageable de pouvoir traiter l'ensemble d'une production en injectant du poly(I:C) aux huîtres. Bien que la stimulation des huîtres par le poly(I:C) soit réalisable par balnéation, la question de l'effet du poly(I:C) sur la consommation humaine reste en suspens pour des raisons sanitaires. En revanche, les travaux développés par Green et collaborateurs ainsi que les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse (cf Chapitre 1, IV, B) ont montré que cette protection antivirale induite par le poly(I:C) pourrait être transmise à la descendance (Green et al. 2016a). Ces résultats sont extrêmement intéressants et présenteraient une avancée majeure en termes d'application car ils permettent d'éviter le traitement direct des huîtres à visée commerciale en traitant seulement les géniteurs. Il est maintenant important de tester l'effet de cette stimulation parentale sur plusieurs générations d'huîtres pour en déterminer les bénéfices apportés en termes de survie et ainsi éviter tout risque sanitaire lié à la consommation de poly(I:C).

D'autres travaux par QTL ont permis d'identifier des loci impliqués dans la résistance chez *C. gigas* aux infections à l'OsHV-1 (Sauvage et al. 2010). Les gènes candidats impliqués dans la survie des huîtres lors de stimulations par le poly(I:C), identifiés à partir de notre approche globale, pourraient être comparés avec ces analyses QTL et ainsi participer aux approches de sélection de familles d'huîtres par rapport à des traits de survie.

Conclusion générale



Conclusion générale

Cette thèse a porté sur l'identification et la caractérisation du priming immunitaire antiviral chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ces travaux ont été réalisés dans un contexte d'épisodes de surmortalité massive d'origine poly-microbienne, affectant l'ostréiculture à l'échelle mondiale depuis 2008. Grâce à l'utilisation d'un ARN double brin synthétique, un agent mimétique viral, le poly(I:C), nous avons pu identifier un priming immunitaire antiviral efficace chez l'huître face à l'Ostreid herpes virus (OsHV-1).

Dans un premier temps, notre approche phénoménologique (*cf* Chapitre I, Article 1) a permis de montrer que la stimulation des huîtres avec différents acides ribonucléiques de taille et de séquence variables, notamment le poly(I:C) permettait d'améliorer le taux de survie de près de 100% lors d'infections virales à l'OsHV-1. Cependant, cette protection semble spécifiquement antivirale puisque le poly(I:C) ne protège pas d'infections bactériennes à *Vibrio tasmaniensis* LGP32. De plus, nous avons montré que cette protection antivirale était efficace sur le long terme pour protéger des infections à l'OsHV-1, avec une durée minimale de 5 mois. Cette protection est par ailleurs efficace en milieu naturel sur l'étang de Thau permettant de protéger les huîtres d'épisodes de surmortalité massive.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de ce priming immunitaire par une approche transcriptomique globale par RNA-seq (*cf* Chapitre 2, Article 2). Cette approche nous a permis d'identifier d'une part que la stimulation des huîtres par le poly(I:C) entraînait la régulation de différentes fonctions immunitaires et notamment l'implication d'un système de type interféron. D'autre part, la stimulation des huîtres par le poly(I:C) entraîne une réponse immunitaire majoritairement maintenue (« sustained response ») pouvant expliquer la protection acquise observée suite à une infection par l'OsHV-1. Chez ces huîtres stimulées par le poly(I:C), l'entrée du virus OsHV-1 dans les cellules et/ou sa réplication semble réprimée voire empêchée.

L'ensemble de ces expérimentations en milieu naturel et en milieu contrôlé suggère ainsi un rôle essentiel de l'OsHV-1 dans cette maladie poly-microbienne affectant les huîtres. De plus, toutes les expérimentations ont été réalisées avec des huîtres de fonds génétiques différents et étaient toutes protégées des infections à l'OsHV-1 suite à une stimulation par le poly(I:C). Nous suggérons donc que toutes les huîtres ont une potentialité de protection face au virus OsHV-1 mais que cette protection nécessite une activation précoce des mécanismes immunitaires, que le poly(I:C) a permis d'activer.

Ces travaux de thèse ont donc permis, d'un point de vue fondamental, d'apporter de nouvelles connaissances sur le phénomène de priming immunitaire antiviral encore très peu décrit dans la littérature pour la majorité des modèles vertébrés et invertébrés. Ainsi, nos travaux ont donc permis d'en étudier les mécanismes montrant qu'il y a bien une composante immunitaire à ce phénomène, au cœur des débats en immunologie. En répondant en partie à la requête de Rowley et Powell (Rowley and Powell 2007) qui jugeaient nécessaire de pouvoir travailler sur des modèles dans lesquels il est possible d'étudier les bases moléculaires du priming immunitaire, cette thèse a permis d'apporter une pierre à l'édifice de l'immunité innée et du priming immunitaire. Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, il y a bien une composante immunitaire à cette protection et cette espèce non-modèle peut être un bon candidat permettant d'étudier les mécanismes du priming immunitaire.

D'un point de vue appliqué, ces travaux ouvrent à présent une voie de recherche visant à proposer et à mettre en place de nouveaux moyens de lutte contre les maladies des huîtres, afin de soutenir les filières ostréicoles. Ceci constituera à présent les grands enjeux sociétaux et économiques auxquels il nous faudra répondre dans les prochaines années.

Références bibliographiques



Références bibliographiques

-A-

- Abi-Khalil, C., C. Lopez-Joven, E. Abadie, V. Savar, Z. Amzil, M. Laabir, and J. L. Rolland. 2016. Exposure to the Paralytic Shellfish Toxin Producer *Alexandrium catenella* Increases the Susceptibility of the Oyster *Crassostrea gigas* to Pathogenic *Vibrios*. *Toxins* **8**.
- Adema, C. M., L. A. Hertel, R. D. Miller, and E. S. Loker. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:8691-8696.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
- Anderson, P. and N. Kedersha. 2009. Stress granules. *Curr Biol* **19**:R397-398.
- Arzul, I., S. Corbeil, B. Morga, and T. Renault. 2017. Viruses infecting marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology* **147**:118-135.
- Arzul, I., T. Renault, and C. Lipart. 2001a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* **46**:1-6.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart, and A. J. Davison. 2001b. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* **82**:865-870.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thebault, and A. Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* **84**:151-160.
- Ashkenazi, A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer* **2**:420-430.
- Azéma, P., J.-B. Lamy, P. Boudry, T. Renault, M.-A. Travers, and L. Dégremont. 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**.

-B-

- Bachere, E., A. Barranger, R. Bruno, J. Rouxel, D. Menard, D. Piquemal, and F. Akcha. 2017. Parental diuron-exposure alters offspring transcriptome and fitness in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **142**:51-58.
- Bachere, E., D. Chagot, and H. Grizel. 1988. Separation of *Crassostrea-Gigas* Hemocytes by Density Gradient Centrifugation and Counterflow Centrifugal Elutriation. *Developmental and Comparative Immunology* **12**:549-559.
- Bachere, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, and B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev* **198**:149-168.
- Bachere, E., R. D. Rosa, P. Schmitt, A. C. Poirier, N. Merou, G. M. Charriere, and D. Destoumieux-Garzon. 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:50-64.
- Badariotti, F., C. Lelong, M. P. Dubos, and P. Favrel. 2007. Characterization of chitinase-like proteins (Cg-Clp1 and Cg-Clp2) involved in immune defence of the mollusc *Crassostrea gigas*. *Febs Journal* **274**:3646-3654.
- Bai, C. M., C. M. Wang, J. Y. Xia, H. L. Sun, S. Zhang, and J. Huang. 2015. Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology* **124**:98-106.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* **21**:381-395.

- Barbosa-Solomieu, V., L. Degremont, R. Vazquez-Juarez, F. Ascencio-Valle, P. Boudry, and T. Renault. 2005. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research* **107**:47-56.
- Barbosa-Solomieu, V., L. Miossec, R. Vazquez-Juarez, F. Ascencio-Valle, and T. Renault. 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *Journal of Virological Methods* **119**:65-72.
- Barbosa Solomieu, V., T. Renault, and M. A. Travers. 2015. Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:2-10.
- Barribeau, S. M., P. Schmid-Hempel, and B. M. Sadd. 2016. Royal Decree: Gene Expression in Trans-Generationally Immune Primed Bumblebee Workers Mimics a Primary Immune Response. *Plos One* **11**.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov. 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**:1524-1525.
- Batista, F. M., I. Arzul, J. F. Pepin, F. Ruano, C. S. Friedman, P. Boudry, and T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. *Journal of Virological Methods* **139**:1-11.
- Bernard, I. 2008-2011. Écologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises, vers une explication de la variabilité du captage. Thèse de Doctorat d'océanologie biologique et environnement marin. Université de La Rochelle.
- Bouilly, K., R. Chaves, A. Leitao, A. Benabdelmouna, and H. Guedes-Pinto. 2008. Chromosomal organization of simple sequence repeats in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): (GGAT)(4), (GT)(7) and (TA)(10) chromosome patterns. *Journal of Genetics* **87**:119-125.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**:238-250.
- Bruto, M., A. James, B. Petton, Y. Labreuche, S. Chenivresse, M. Alunno-Bruscia, M. F. Polz, and F. Le Roux. 2017. *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *Isme Journal* **11**:1043-1052.
- Buchan, J. R. and R. Parker. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* **36**:932-941.
- Bueno, R., M. Perrott, M. Dunowska, C. Brosnahan, and C. Johnston. 2016. In situ hybridization and histopathological observations during ostreid herpesvirus-1-associated mortalities in Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **122**:43-55.
- Bulet, P., R. Stocklin, and L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews* **198**:169-184.
- Burge, C. A., F. J. Griffin, and C. S. Friedman. 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Dis Aquat Organ* **72**:31-43.
- Burioli, E. A. V., M. Prearo, and M. Houssin. 2017. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 μ Var isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology* **509**:239-251.

-C-

- Canesi, L., G. Gallo, M. Gavioli, and C. Pruzzo. 2002. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* **57**:469-476.
- Cassis, D., C. M. Pearce, and M. T. Maldonado. 2011. Effects of the environment and culture depth on growth and mortality in juvenile Pacific oysters in the Strait of Georgia, British Columbia. *Aquaculture Environment Interactions* **1**:259-274.
- Castro-Vargas, C., C. Linares-Lopez, A. Lopez-Torres, K. Wrobel, J. C. Torres-Guzman, G. A. Hernandez, H. Lanz-Mendoza, and J. Contreras-Garduno. 2017. Methylation on RNA: A Potential Mechanism Related to Immune Priming within But Not across Generations. *Front Microbiol* **8**:473.

- Catanese, M. T., H. Ansuini, R. Graziani, T. Huby, M. Moreau, J. K. Ball, G. Paonessa, C. M. Rice, R. Cortese, A. Vitelli, and A. Nicosia. 2010. Role of Scavenger Receptor Class B Type I in Hepatitis C Virus Entry: Kinetics and Molecular Determinants. *Journal of Virology* **84**:34-43.
- Chang, P. H., S. T. Kuo, S. H. Lai, H. S. Yang, Y. Y. Ting, C. L. Hsu, and H. C. Chen. 2005. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* **65**:23-27.
- Chen, G. F., C. Y. Zhang, F. J. Jiang, Y. Y. Wang, Z. Xu, and C. M. Wang. 2014. Bioinformatics analysis of hemocyte miRNAs of scallop *Chlamys farreri* against acute viral necrobiotic virus (AVNV). *Fish & Shellfish Immunology* **37**:75-86.
- Chen, H., L. S. Xin, X. R. Song, L. Wang, W. L. Wang, Z. Q. Liu, H. Zhang, L. L. Wang, Z. Zhou, L. M. Qiu, and L. S. Song. 2017. A norepinephrine-responsive miRNA directly promotes CgHSP90AA1 expression in oyster haemocytes during desiccation. *Fish & Shellfish Immunology* **64**:297-307.
- Cheng, T. C. I. R. N., Rowley AF, eds. 1981. *Invertebrate Blood Cells*. New York: Academic Press, 233–301.
- Clark, M. S., M. A. S. Thorne, A. Amaral, F. Vieira, F. M. Batista, J. Reis, and D. M. Power. 2013. Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and Evolution* **3**:3283-3297.
- CNC <http://www.cnc-france.com/>
- Coelho, J. D., C. Barreto, A. D. Silveira, G. C. Vieira, R. D. Rosa, and L. M. Perazzolo. 2016. A hemocyte-expressed fibrinogen-related protein gene (LvFrep) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression analysis after microbial infection and during larval development. *Fish & Shellfish Immunology* **56**:123-126.
- Collins, S. E. and K. L. Mossman. 2014. Danger, diversity and priming in innate antiviral immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **25**:525-531.
- Comps, M., J. R. Bonami, C. Vago, and A. Campillo. 1976. Virus-Disease of Portuguese Oyster (*Crassostrea-Angulata* Lmk). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **282**:1991-&.
- Comps, M., G. Tige, and H. Grizel. 1980. Ultrastructural-Study of a Protistan Parasite of the Flat Oyster *Ostrea-Edulis* L. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D* **290**:383-&.
- Conradt, B. 2009. Genetic Control of Programmed Cell Death During Animal Development. *Annual Review of Genetics* **43**:493-523.
- Conrath, U., G. J. M. Beckers, C. J. G. Langenbach, and M. R. Jaskiewicz. 2015. Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, Vol 53 **53**:97-119.
- Corbeil, S., N. Faury, A. Segarra, and T. Renault. 2015. Development of an in situ hybridization assay for the detection of ostreid herpesvirus type 1 mRNAs in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods* **211**:43-50.
- Coustau, C., J. Kurtz, and Y. Moret. 2016. A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate-Parasite Interface. *Trends in Parasitology* **32**:353-355.
- Cremer, S. and M. Sixt. 2009. Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**:129-142.
- Crisan, T. O., M. G. Netea, and L. A. B. Joosten. 2016. Innate immune memory: Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *European Journal of Immunology* **46**:817-828.
- Crouse, J., U. Kalinke, and A. Oxenius. 2015. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol* **15**:231-242.
- Cullen, B. R. 2013. How Do Viruses Avoid Inhibition by Endogenous Cellular MicroRNAs? *PLoS Pathogens* **9**.
- Cutler, R. G. 1991. Human Longevity and Aging - Possible Role of Reactive Oxygen Species. *Annals of the New York Academy of Sciences* **621**:1-28.

-D-

- da Silva, P. M., T. Renault, J. Fuentes, and A. Villalba. 2008. Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* **78**:181-188.
- Dambuzza, I. M. and G. D. Brown. 2015. C-type lectins in immunity: recent developments. *Current Opinion in Immunology* **32**:21-27.
- Dangl, J. L. and J. D. G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**:826-833.
- Darnell, J. E., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* **264**:1415-1421.
- Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* **154**:171-177.
- Davison, A. J., B. L. Trus, N. Q. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff, and T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* **86**:41-53.
- de Faria, I. J., R. P. Olmo, E. G. Silva, and J. T. Marques. 2013. dsRNA sensing during viral infection: lessons from plants, worms, insects, and mammals. *J Interferon Cytokine Res* **33**:239-253.
- de Kantzow, M., P. Hick, J. A. Becker, and R. J. Whittington. 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**:419-428.
- de Lorgeril, J., et al. Cracking the code of oyster polymicrobial disease: herpesvirus fosters bacterial septicemia by compromising oyster antibacterial defenses. En préparation.
- de Lorgeril, J., R. Zenagui, R. D. Rosa, D. Piquemal, and E. Bachere. 2011. Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression Analysis. *PLoS One* **6**:e23142.
- Declercq, E. 1979. Degradation of Poly(Inosinic Acid) - Poly(Cytidylic Acid) [(I)N.(C)N] by Human-Plasma. *European Journal of Biochemistry* **93**:165-172.
- Deddouche, S., N. Matt, A. Budd, S. Mueller, C. Kemp, D. Galiana-Arnoux, C. Dostert, C. Antoniewski, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler. 2008. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nature Immunology* **9**:1425-1432.
- Degremont, L. 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* **317**:94-98.
- Degremont, L., E. Bedier, and P. Boudry. 2010a. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* **299**:21-29.
- Degremont, L., B. Ernande, E. Bedier, and P. Boudry. 2007. Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). I. Estimation of genetic parameters for survival and growth. *Aquaculture* **262**:41-53.
- Degremont, L., C. Garcia, and S. K. Allen. 2015a. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:226-241.
- Degremont, L., M. Nourry, and E. Maurouard. 2015b. 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.
- Degremont, L., P. Soletchnik, and P. Boudry. 2010b. Summer Mortality of Selected Juvenile Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* under Laboratory Conditions and in Comparison with Field Performance. *Journal of Shellfish Research* **29**:847-856.
- Dempsey, P. W., S. A. Vaidya, and G. Cheng. 2003. The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**:2604-2621.

- Der, S. D., A. M. Zhou, B. R. G. Williams, and R. H. Silverman. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:15623-15628.
- Deretic, V. 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology* **18**:375-382.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodriguez, and E. Bachere. 1997. Peanaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J. Biol. Chem.* **272**:28398-28406.
- Dong, Y. M., C. M. Cirimotich, A. Pike, R. Chandra, and G. Dimopoulos. 2012. Anopheles NF-kappa B-Regulated Splicing Factors Direct Pathogen-Specific Repertoires of the Hypervariable Pattern Recognition Receptor AgDscam. *Cell Host & Microbe* **12**:521-530.
- Dong, Y. M., H. E. Taylor, and G. Dimopoulos. 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *Plos Biology* **4**:1137-1146.
- Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature Immunology* **6**:946-953.
- Dubuffet, A., C. Zanchi, G. Boutet, J. Moreau, M. Teixeira, and Y. Moret. 2015. Trans-generational Immune Priming Protects the Eggs Only against Gram-Positive Bacteria in the Mealworm Beetle. *PLoS Pathogens* **11**.
- Duperthuy, M., P. Schmitt, E. Garzon, A. Caro, R. D. Rosa, F. Le Roux, N. Lautredou-Audouy, P. Got, B. Romestand, J. de Lorgieril, S. Kieffer-Jaquinod, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**:2993-2998.
- Durrant, W. E. and X. Dong. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**:185-209.

-E-

- Escobedo-Bonilla, C. M., S. Vega-Pena, C. H. Mejia-Ruiz. 2015. Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (*orf89*, *wsv191*) and structural (*vp28*, *vp26*) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of King Saud University* **27**:182-188.
- Escoubas, J. M., L. Briant, C. Montagnani, S. Hez, C. Devaux, and P. Roch. 1999. Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *Febs Letters* **453**:293-298.
- Evans, O., P. Hick, and R. J. Whittington. 2017a. Detection of Ostreid herpesvirus -1 microvariants in healthy *Crassostrea gigas* following disease events and their possible role as reservoirs of infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **148**:20-33.
- Evans, O., I. Paul-Pont, and R. J. Whittington. 2017b. Detection of ostreid herpesvirus 1 microvariant DNA in aquatic invertebrate species, sediment and other samples collected from the Georges River estuary, New South Wales, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* **122**:247-255.

-F-

- Fabioux, C., C. Corporeau, V. Quillien, P. Favrel, and A. Huvet. 2009. In vivo RNA interference in oyster -vasa silencing inhibits germ cell development. *Febs Journal* **276**:2566-2573.
- Fabioux, C., A. Huvet, P. Le Souchu, M. Le Pennec, and S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* **250**:458-470.

FAO www.fao.org

- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *Am Fish Soc Spec Publ* **18** : 153–168.
- Fernandez-Morera, J. L., V. Calvanese, S. Rodriguez-Rodero, E. Menendez-Torre, and M. F. Fraga. 2010. Epigenetic regulation of the immune system in health and disease. *Tissue Antigens* **76**:431-439.
- Fire, A., S. Q. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Flannagan, R. S., G. Cosio, and S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**:355-366.
- Fleury, P. G., E. Goyard, J. Mazurié, S. Claude, J. F. Bouget, A. Langlade, MJ. Le Coguic. 1999. Le réseau REMORA de suivi de la croissance des huîtres creuses *Crassostrea gigas* ; analyse des premières tendances (1993-98) en Bretagne. Rapport Ifremer.
- Fleury, E., A. Huvet, C. Lelong, J. de Lorgeril, V. Boulo, Y. Gueguen, E. Bachere, A. Tanguy, D. Moraga, C. Fabioux, P. Lindeque, J. Shaw, R. Reinhardt, P. Prunet, G. Davey, S. Lapegue, C. Sauvage, C. Corporeau, J. Moal, F. Gavory, P. Wincker, F. Moreews, C. Klopp, M. Mathieu, P. Boudry, and P. Favrel. 2009. Generation and analysis of a 29,745 unique Expressed Sequence Tags from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) assembled into a publicly accessible database: the GigasDatabase. *BMC Genomics* **10**:341.
- Fleury, E., J. Moal, V. Boulo, J. Y. Daniel, D. Mazurais, A. Henaut, C. Corporeau, P. Boudry, P. Favrel, and A. Huvet. 2010. Microarray-Based Identification of Gonad Transcripts Differentially Expressed Between Lines of Pacific Oyster Selected to Be Resistant or Susceptible to Summer Mortality. *Marine Biotechnology* **12**:326-339.
- Fortier, M. E., S. Kent, H. Ashdown, S. Poole, P. Boksa, and G. N. Luheshi. 2004. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**:R759-766.
- Fraser, D. A., S. S. Bohlson, N. Jasinskiene, N. Rawal, G. Palmarini, S. Ruiz, R. Rochford, and A. J. Tenner. 2006. C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *Journal of Leukocyte Biology* **80**:107-116.
- Friedman, C. S., R. M. Estes, N. A. Stokes, C. A. Burge, J. S. Hargove, B. J. Barber, R. A. Elston, E. M. Burrenson, and K. S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* **63**:33-41.
- Fu, L. L., J. B. Shuai, Z. R. Xu, J. R. Li, and W. F. Li. 2010. Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis* as vehicles. *Fish Shellfish Immunol* **28**:49-55.
- Fuhrmann, M., B. Petton, V. Quillien, N. Faury, B. Morga, and F. Pernet. 2016. Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture Environment Interactions* **8**:543-552.
- Futo, M., S. A. Armitage, and J. Kurtz. 2015. Microbiota Plays a Role in Oral Immune Priming in *Tribolium castaneum*. *Front Microbiol* **6**:1383.

-G-

- Gagnaire, B., H. Frouin, K. Moreau, H. Thomas-Guyon, and T. Renault. 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* **20**:536-547.
- Galindo-Villegas, J., D. Garcia-Moreno, S. de Oliveira, J. Meseguer, and V. Mulero. 2012. Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:E2605-2614.

- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinshtein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation* **19**:107-120.
- Galstoff, P.S. 1964. The american oyster *Crassostrea virginica*. Gmelin., Washington, D.C: US Department of Interior.
- Gantier, M. P. and B. R. G. Williams. 2007. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **18**:363-371.
- Garcia, C., I. Arzul, B. Chollet, M. Robert, E. Omnes, S. Ferrand, N. Faury, D. Tourbiez, P. Haffner, L. Miossec, J. P. Joly, and C. Francois. 2011. Summer Mortality Outbreaks of French Pacific Oysters, *Crassostrea Gigas* since 2008: Results of the Repamo Network Surveillance. *Journal of Shellfish Research* **30**:508-508.
- Gareau, C., E. Houssin, D. Martel, L. Coudert, S. Mellaoui, M. E. Huot, P. Laprise, and R. Mazroui. 2013. Characterization of fragile X mental retardation protein recruitment and dynamics in *Drosophila* stress granules. *Plos One* **8**:e55342.
- Garnier, M., Y. Labreuche, and J. L. Nicolas. 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp *francensis* subsp nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**:358-365.
- Gay, M., T. Renault, A. M. Pons, and F. Le Roux. 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**:65-74.
- Genard, B., P. Miner, J. L. Nicolas, D. Moraga, P. Boudry, F. Pernet, and R. Tremblay. 2013. Integrative Study of Physiological Changes Associated with Bacterial Infection in Pacific Oyster Larvae. *Plos One* **8**.
- Gerdol, M., P. Venier, and A. Pallavicini. 2015. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1 q gene family in Bivalvia. *Developmental and Comparative Immunology* **49**:59-71.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, G. Desserre, J. de Lorgeril, B. Romestand, and E. Bachere. 2006. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*.
- Gonzalez, M., Y. Gueguen, D. Destoumieux-Garzon, B. Romestand, J. Fievet, M. Pugniere, F. Roquet, J. M. Escoubas, F. Vandenbulcke, O. Levy, L. Saune, P. Bulet, and E. Bachere. 2007. 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.
- Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M. C. Lebart, Y. Gueguen, and E. Bachere. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**:1089-1097.
- Goyard, E. 1996. REMORA Bilan national de la croissance de l'huître creuse de 1993 à 1995. Rapport Ifremer.
- Green, T. J. and A. C. Barnes. 2009. Inhibitor of REL/NF-KappaB is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. *Fish Shellfish Immunol* **27**:260-265.
- Green, T. J., K. Helbig, P. Speck, and D. A. Raftos. 2016a. Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology* **78**:113-120.
- Green, T. J. and C. Montagnani. 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish & Shellfish Immunology* **35**:382-388.

- Green, T. J., C. Montagnani, K. Benkendorff, N. Robinson, and P. Speck. 2014a. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **36**:151-157.
- Green, T. J., D. Raftos, P. Speck, and C. Montagnani. 2015a. Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* **96**:2471-2482.
- Green, T. J., N. Robinson, T. Chataway, K. Benkendorff, W. O'Connor, and P. Speck. 2014b. Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Research* **110**:168-174.
- Green, T. J., P. Speck, L. Geng, D. Raftos, M. R. Beard, and K. J. Helbig. 2015b. Oyster viperin retains direct antiviral activity and its transcription occurs via a signalling pathway involving a heat-stable haemolymph protein. *Journal of General Virology* **96**:3587-3597.
- Green, T. J., A. Vergnes, C. Montagnani, and J. de Lorgeril. 2016b. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Veterinary Research* **47**.
- Grundhoff, A. and C. S. Sullivan. 2011. Virus-encoded microRNAs. *Virology* **411**:325-343.
- Gueguen, Y., R. Bernard, F. Julie, S. Paulina, D. G. Delphine, V. Franck, B. Philippe, and B. Evelyne. 2009. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Mol Immunol* **46**:516-522.
- Gueguen, Y., J. P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Roumiguere, A. L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere, and J. M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**:139-145.
- Gueguen, Y., A. Herpin, A. Aumelas, J. Garnier, J. Fievet, J. M. Escoubas, P. Bulet, M. Gonzalez, C. Lelong, P. Favrel, and E. Bachere. 2006. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas* - Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **281**:313-323.
- Guo, X. M., Y. He, L. L. Zhang, C. Lelong, and A. Jouaux. 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:107-119.

-H-

- Hada, H. S., P. A. West, J. V. Lee, J. Stemmler, and R. R. Colwell. 1984. *Vibrio-Tubiasii* Sp-Nov, a Pathogen of Bivalve Mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**:1-4.
- Haine, E. R., Y. Moret, M. T. Siva-Jothy, and J. Rolff. 2008. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science* **322**:1257-1259.
- Hamilton, C., B. T. Lejeune, and R. B. Rosengaus. 2011. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biology Letters* **7**:89-92.
- Hanington, P. C. and S. M. Zhang. 2011. The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. *Journal of Innate Immunity* **3**:17-27.
- Hauton, C. and V. J. Smith. 2007. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *Bioessays* **29**:1138-1146.
- He, Y., A. Jouaux, S. E. Ford, C. Lelong, P. Sourdaie, M. Mathieu, and X. M. Guo. 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:131-144.
- Hernandez-Martinez, P., B. Naseri, G. Navarro-Cerrillo, B. Escriche, J. Ferre, and S. Herrero. 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environ Microbiol* **12**:2730-2737.
- Hildemann, W. H., R. L. Raison, G. Cheung, C. J. Hull, L. Akaka, and J. Okamoto. 1977. Immunological Specificity and Memory in a Scleractinian Coral. *Nature* **270**:219-223.
- Hine, P.M., Wesney, B., Hay, B.E. 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* **12**, 135–142.

- Holmskov, U., S. Thiel, and J. C. Jensenius. 2003. Collectins and ficolins: Humoral lectins of the innate immune defense. *Annual Review of Immunology* **21**:547-578.
- Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2006. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**:349-360.
- Huang, B., L. Zhang, L. Li, X. Tang, and G. Zhang. 2015. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* **43**:485-490.
- Huang, B. Y., L. L. Zhang, Y. S. Du, F. Xu, L. Li, and G. F. Zhang. 2017. Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates. *Scientific Reports* **7**.
- Huang, C. C. and Y. L. Song. 1999. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Developmental and Comparative Immunology* **23**:545-552.
- Huot, B., J. Yao, B. L. Montgomery, and S. Y. He. 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol Plant* **7**:1267-1287.
- Huvet, A., E. Fleury, C. Corporeau, V. Quillien, J. Y. Daniel, G. Riviere, P. Boudry, and C. Fabioux. 2012. In Vivo RNA Interference of a Gonad-Specific Transforming Growth Factor-beta in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology* **14**:402-410.
- Huvet, A., A. Herpin, L. Degremont, Y. Labreuche, J. F. Samain, and C. Cunningham. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene* **343**:211-220.

-I-

- ICTV <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Iizuka, M., T. Nagasaki, K. G. Takahashi, M. Osada, and N. Itoh. 2014. Involvement of Pacific oyster CgPGRP-S1S in bacterial recognition, agglutination and granulocyte degranulation. *Dev Comp Immunol* **43**:30-34.
- Itoh, N. and K. G. Takahashi. 2008. Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **150**:409-417.

-J-

- Jeang, K. T. 2012. RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *Bmc Biology* **10**.
- Jeffries, V. E. 1982. 3 *Vibrio* Strains Pathogenic to Larvae of *Crassostrea-Gigas* and *Ostrea-Edulis*. *Aquaculture* **29**:201-226.
- Jemaa, M., N. Morin, P. Cavelier, J. Cau, J. M. Strub, and C. Delsert. 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *Journal of Experimental Biology* **217**:3067-3077.
- Jenkins, C., P. Hick, M. Gabor, Z. Spiers, S. A. Fell, X. Gu, A. Read, J. Go, M. Dove, W. O'Connor, P. D. Kirkland, and J. Frances. 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OshV-1 micro-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Dis Aquat Organ* **105**:109-126.
- Jevtov, I., M. Zacharogianni, M. M. van Oorschot, G. van Zadelhoff, A. Aguilera-Gomez, I. Vuillez, I. Braakman, E. Hafen, H. Stocker, and C. Rabouille. 2015. TORC2 mediates the heat stress response in *Drosophila* by promoting the formation of stress granules. *J Cell Sci* **128**:2497-2508.
- Jia, Z. H., H. Zhang, S. Jiang, M. Q. Wang, L. L. Wang, and L. S. Song. 2016. Comparative study of two single CRD C-type lectins, CgCLec-4 and CgCLec-5, from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **59**:220-232.
- Jinek, M. and J. A. Doudna. 2009. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**:405-412.

Jouaux, A., M. Lafont, J. L. Blin, M. Houssin, M. Mathieu, and C. Lelong. 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* **14**.

-K-

- Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. R. E. Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**:101-105.
- Kawai, T. and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappa B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine* **13**:460-469.
- Keeling, S. E., C. L. Brosnahan, R. Williams, E. Gias, M. Hannah, R. Bueno, W. L. McDonald, and C. Johnston. 2014. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1- an opportunistic longitudinal study. *Dis Aquat Organ* **109**:231-239.
- Kemp, C., S. Mueller, A. Goto, V. Barbier, S. Paro, F. Bonnay, C. Dostert, L. Troxler, C. Hetru, C. Meignin, S. Pfeffer, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler. 2013. Broad RNA Interference-Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *Journal of Immunology* **190**:650-658.
- Kilpatrick, D. C. 2002. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfusion Medicine* **12**:335-351.
- Kim, C. S., Z. Kosuke, Y. K. Nam, S. K. Kim, and K. H. Kim. 2007. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology* **23**:242-246.
- Kincaid, R. P. and C. S. Sullivan. 2012. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the Future. *PLoS Pathogens* **8**.
- Kingsolver, M. B., Z. J. Huang, and R. W. Hardy. 2013. Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. *Journal of Molecular Biology* **425**:4921-4936.
- Kiss, T. 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* **15**:313-321.
- Knight, M., H. D. Arican-Goktas, W. Ittiprasert, E. C. Odoemelam, A. N. Miller, and J. M. Bridger. 2014. Schistosomes and snails: a molecular encounter. *Front Genet* **5**:230.
- Knowles, G., J. Handlinger, B. Jones, and N. Moltschaniwskyj. 2014. Hemolymph chemistry and histopathological changes in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in response to low salinity stress. *Journal of Invertebrate Pathology* **121**:78-84.
- Konrad, M., M. L. Vyleta, F. J. Theis, M. Stock, S. Tragust, M. Klatt, V. Drescher, C. Marr, L. V. Ugelvig, and S. Cremer. 2012. Social Transfer of Pathogenic Fungus Promotes Active Immunisation in Ant Colonies. *Plos Biology* **10**.
- Kurtz, J. 2004. Memory in the innate and adaptive immune systems. *Microbes and Infection* **6**:1410-1417.
- Kurtz, J. 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol* **26**:186-192.
- Kurtz, J. and S. A. Armitage. 2006. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol* **27**:493-496.
- Kurtz, J. and K. Franz. 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature* **425**:37-38.

-L-

Labreuche, Y., P. Soudant, M. Goncalves, C. Lambert, and J. L. Nicolas. 2006. Effects of extracellular products from the pathogenic *Vibrio aestuarianus* strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **30**:367-379.

- Labreuche, Y., A. Veloso, E. de la Vega, P. S. Gross, R. W. Chapman, C. L. Browdy, and G. W. Warr. 2010. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**:1209-1218.
- Labreuche, Y. and G. W. Warr. 2013. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* **34**:1002-1010.
- Lacoste, A., A. Cueff, and S. A. Poulet. 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *Journal of Cell Science* **115**:761-768.
- Le Deuff, R. M. and T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology* **80**:1317-1322.
- LeDeuff, R. M., T. Renault, and A. Gerard. 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* **24**:149-157.
- Lee, M. S. and Y. J. Min. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual Review of Biochemistry* **76**:447-480.
- Lafont, M., B. Petton, A. Vergnes, M. Pauletto, A. Segarra, B. Gourbal, and C. Montagnani. 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Scientific Reports* **under review**.
- Leibovitz, L., R. Elston, V. P. Lipovsky and J. Donaldson. 1978. A new disease of larval Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of the World Aquaculture Society* **9**: 603-615.
- Lemire, A., D. Goudenege, T. Versigny, B. Petton, A. Calteau, Y. Labreuche, and F. Le Roux. 2015. Populations, not clones, are the unit of vibrio pathogenesis in naturally infected oysters. *Isme Journal* **9**:1523-1531.
- LeRoux, F., K. M. Wegner, C. Baker-Austin, L. Vezzulli, C. R. Osorio, C. Amaro, J. M. Ritchie, T. Defoirdt, D. Destoumieux-Garzon, M. Blokesch, D. Mazel, A. Jacq, F. Cava, L. Gram, C. C. Wendling, E. Strauch, A. Kirschner, and S. Huehn. 2015. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Li, H., H. Zhang, S. Jiang, W. L. Wang, L. S. Xin, H. Wang, L. L. Wang, and L. S. Song. 2015. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system. *Fish & Shellfish Immunology* **44**:566-575.
- Li, X. A., Q. H. Liu, L. Hou, and J. Huang. 2010. Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International* **18**:1035-1044.
- Li, Y. Q., X. R. Song, W. L. Wang, L. L. Wang, Q. L. Yi, S. Jiang, Z. H. Jia, X. Y. Du, L. M. Qiu, and L. S. Song. 2017a. 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**:59-69.
- Li, Y. X., L. L. Zhang, T. Qu, X. Y. Tang, L. Li, and G. F. Zhang. 2017b. Conservation and divergence of mitochondrial apoptosis pathway in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Cell Death & Disease* **8**.
- Lim, H. J., B. M. Kim, I. J. Hwang, J. S. Lee, I. Y. Choi, Y. J. Kim, and J. S. Rhee. 2016. Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics* **19**:62-70.
- Lin, T. T., J. Xing, X. Z. Sheng, X. Q. Tang, and W. B. Zhan. 2011. Development of a monoclonal antibody specific to granulocytes and its application for variation of granulocytes in scallop *Chlamys farreri* after acute viral necrobiosis virus (AVNV) infection. *Fish & Shellfish Immunology* **30**:1348-1353.
- Lipart, C. and T. Renault. 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods* **101**:1-10.

- Litman, G. W., J. P. Rast, and S. D. Fugmann. 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* **10**:543-553.
- Little, T. J., N. Colegrave, B. M. Sadd, and P. Schmid-Hempel. 2008. Studying immunity at the whole organism level. *Bioessays* **30**:404-405; author reply 406.
- Little, T. J. and A. R. Kraaijeveld. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* **19**:58-60.
- Little, T. J., B. O'Connor, N. Colegrave, K. Watt, and A. F. Read. 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Current Biology* **13**:489-492.
- Liu, C. H., T. Zhang, L. L. Wang, M. Q. Wang, W. L. Wang, Z. H. Jia, S. Jiang, and L. S. Song. 2016. The modulation of extracellular superoxide dismutase in the specifically enhanced cellular immune response against secondary challenge of *Vibrio splendidus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Developmental and Comparative Immunology* **63**:163-170.
- Liu, R., L. Qiu, Z. Yu, J. Zi, F. Yue, L. Wang, H. Zhang, W. Teng, X. Liu, and L. Song. 2013a. Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**:144-150.
- Liu, S. Y., R. Aliyari, K. Chikere, G. Li, M. D. Marsden, J. K. Smith, O. Pernet, H. Guo, R. Nusbaum, J. A. Zack, A. N. Freiberg, L. Su, B. Lee, and G. Cheng. 2013b. Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol. *Immunity* **38**:92-105.
- Loker, E. S., C. M. Adema, S. M. Zhang, and T. B. Kepler. 2004. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews* **198**:10-24.
- Longdon, B., C. Cao, J. Martinez, and F. M. Jiggins. 2013. Previous Exposure to an RNA Virus Does Not Protect against Subsequent Infection in *Drosophila melanogaster*. *Plos One* **8**.
- Lu, S. H. and B. R. Cullen. 2004. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *Journal of Virology* **78**:12868-12876.
- Lynch, S. A., J. Carlsson, A. O. Reilly, E. Cotter, and S. C. Culloty. 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OshV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* **139**:1526-1532.

-M-

- Martenot, C., L. Denechere, P. Hubert, L. Metayer, E. Oden, S. Trancart, E. Travaillee, and M. Houssin. 2015. Virulence of Ostreid herpesvirus 1 mu Var in sea water at 16 degrees C and 25 degrees C. *Aquaculture* **439**:1-6.
- Martenot, C., O. Gervais, B. Chollet, M. Houssin, and T. Renault. 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**.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillee, J. P. Malas, and M. Houssin. 2010. Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods* **170**:86-89.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillee, J. P. Malas, and M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* **160**:25-31.
- Masood, M., M. E. Herberstein, D. A. Raftos, and S. V. Nair. 2017. Double stranded RNA is processed differently in two oyster species. *Developmental & Comparative Immunology* **76**:285-291.
- Masood, M., D. A. Raftos, and S. V. Nair. 2016. Two Oyster Species That Show Differential Susceptibility to Virus Infection Also Show Differential Proteomic Responses to Generic dsRNA. *Journal of Proteome Research* **15**:1735-1746.
- Matozzo, V. and M. G. Marin. 2011. Bivalve immune responses and climate changes: is there a relationship? *Isj-Invertebrate Survival Journal* **8**:70-77.

- Maurer, D., Comps, M. 1986. Mortalities Estivales De l'huitre *Crassostrea Gigas* Dans Le Bassin d'Arcachon: Facteurs Du Milieu, Aspects Biochimiques Et Histologiques. Pathology in Marine Aquaculture. C.P. Vivarès, J.-R. Bonami and E. Jaspers (Eds). European Aquaculture Society, special Publication N° 9
- McFall-Ngai, M., M. G. Hadfield, T. C. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Loso, A. E. Douglas, N. Dubilier, G. Eberl, T. Fukami, S. F. Gilbert, U. Hentschel, N. King, S. Kjelleberg, A. H. Knoll, N. Kremer, S. K. Mazmanian, J. L. Metcalf, K. Nealson, N. E. Pierce, J. F. Rawls, A. Reid, E. G. Ruby, M. Rumpho, J. G. Sanders, D. Tautz, and J. J. Wernegreen. 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:3229-3236.
- McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O'Garra. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* **15**:87-103.
- Medzhitov, R. 2010. Innate immunity: quo vadis? *Nature Immunology* **11**:551-553.
- Meister, G. and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**:343-349.
- Mian, M. F., A. N. Ahmed, M. Rad, A. Babaian, D. Bowdish, and A. A. Ashkar. 2013. Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. *Journal of Leukocyte Biology* **94**:1025-1036.
- Milutinović, B. and J. Kurtz. 2016. Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology* **28**:328-342.
- Milutinovic, B., R. Peuss, K. Ferro, and J. Kurtz. 2016. Immune priming in arthropods: an update focusing on the red flour beetle. *Zoology* **119**:254-261.
- Mogensen, T. H. 2009. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews* **22**:240-+.
- Mone, Y., B. Gourbal, D. Duval, L. Du Pasquier, S. Kieffer-Jaquinod, and G. Mitta. 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**.
- Montagnani, C., C. Kappler, J. M. Reichhart, and J. M. Escoubas. 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappa B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Febs Letters* **561**:75-82.
- Montagnani, C., Y. Labreuche, and J. M. Escoubas. 2008. Cg-IkappaB, a new member of the IkappaB protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* **32**:182-190.
- Montagnani, C., F. Le Roux, F. Berthe, and J. M. Escoubas. 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett* **500**:64-70.
- Montes, J. F., M. Durfort, and J. Garcivalero. 1995. Cellular Defense-Mechanism of the Clam Tapes Semidecussatus against Infection by the Protozoan Perkinsus Sp. *Cell and Tissue Research* **279**:529-538.
- Moreau, P., N. Faury, T. Burgeot, and T. Renault. 2015a. Pesticides and Ostreid Herpesvirus 1 Infection in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Plos One* **10**.
- Moreau, P., K. Moreau, A. Segarra, D. Tourbiez, M. A. Travers, D. C. Rubinsztein, and T. Renault. 2015b. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* **11**:516-526.
- Moret, Y. 2006. 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **273**:1399-1405.
- Moret, Y. and P. Schmid-Hempel. 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. *Science* **290**:1166-1168.
- Moret, Y. and M. T. Siva-Jothy. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **270**:2475-2480.

- Morga, B., N. Faury, S. Guesdon, B. Chollet, and T. Renault. 2017. Haemocytes from *Crassostrea gigas* and OsHV-1: A promising in vitro system to study host/virus interactions. *Journal of Invertebrate Pathology*. Sous presse
- Mori, K. and J. E. Stewart. 2006. Immunogen-dependent quantitative and qualitative differences in phagocytic responses of the circulating hemocytes of the lobster *Homarus americanus*. *Dis Aquat Organ* **69**:197-203.
- Mori, K. 1979. Effects of Artificial Eutrophication on the Metabolism of the Japanese Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* **53**: 361-369.
- Mukherjee, K., E. Grizanov, E. Chertkova, R. Lehmann, I. Dubovskiy, and A. Vilcinskas. 2017. Experimental evolution of resistance against *Bacillus thuringiensis* in the insect model host *Galleria mellonella* results in epigenetic modifications. *Virulence*:1-13.
- Myllymaki, H. and M. Ramet. 2014. JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology* **79**:377-385.

-N-

- Nakanishi, Y. 2006. Humoral and cellular responses in innate immunity. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **126**:1207-1212.
- Namikoshi, A., J. L. Wu, T. Yamashita, T. Nishizawa, T. Nishioka, M. Arimoto, and K. Muroga. 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture* **229**:25-35.
- Nayak, A., M. Tassetto, M. Kunitomi, and R. Andino. 2013. RNA Interference-Mediated Intrinsic Antiviral Immunity in Invertebrates. *Intrinsic Immunity* **371**:183-200.
- Netea, M. G. 2013. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *European Journal of Clinical Investigation* **43**:881-884.
- Netea, M. G., J. Quintin, and J. W. van der Meer. 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe* **9**:355-361.
- Netea, M. G. and J. W. van der Meer. 2017. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host & Microbe* **21**:297-300.
- Nguyen, M. L. and J. A. Blaho. 2009. Cellular Players in the Herpes Simplex Virus Dependent Apoptosis Balancing Act. *Viruses-Basel* **1**:965-978.
- Nicolas, J.L., Comps, M., Cochenec, N. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **12**.
- Nilsen, P., M. Karlsen, K. Sritunyalucksana, and S. Thitamadee. 2017. White spot syndrome virus VP28 specific double-stranded RNA provides protection through a highly focused siRNA population. *Scientific Reports* **7**.
- Nonaka, M. 2001. Evolution of the complement system. *Current Opinion in Immunology* **13**:69-73.
- Nonaka, M. and S. Miyazawa. 2002. Evolution of the initiating enzymes of the complement system. *Genome Biol* **3**:REVIEWS1001.
- Normand, J., J. L. Blin, and A. Jouaux. 2014a. Rearing practices identified as risk factors for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection in Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Diseases of Aquatic Organisms* **110**:201-211.
- Normand, J., R. H. Li, V. Quillien, J. L. Nicolas, P. Boudry, F. Pernet, and A. Huet. 2014b. Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics* **15**:95-102.
- Norouzitalab, P., K. Baruah, P. Biswas, D. Vanrompay, and P. Bossier. 2016. Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Sci Rep* **6**:21166.

Novoa, B., A. Romero, A. L. Alvarez, R. Moreira, P. Pereiro, M. M. Costa, S. Dios, A. Estepa, F. Parra, and A. Figueras. 2016. Antiviral Activity of Myticin C Peptide from Mussel: an Ancient Defense against Herpesviruses. *Journal of Virology* **90**:7692-7702.

-O-

Ottaviani, E., A. Accorsi, G. Rigillo, D. Malagoli, J. M. Blom, and F. Tascetta. 2013. Epigenetic modification in neurons of the mollusc *Pomacea canaliculata* after immune challenge. *Brain Res* **1537**:18-26.

Owens, L., S. Malham. 2015. Review of the RNA interference pathway in molluscs including some possibilities for use in bivalves in aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering* **3**: 87-89.

-P-

Pan, Z. K., C. Fisher, J. D. Li, Y. Jiang, S. Huang, and L. Y. Chen. 2011. Bacterial LPS up-regulated TLR3 expression is critical for antiviral response in human monocytes: evidence for negative regulation by CYLD. *International Immunology* **23**:357-364.

Paradkar, P. N., L. Trinidad, R. Voysey, J. B. Duchemin, and P. J. Walker. 2012. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**:18915-18920.

Park, K. and A. L. Scott. 2010. Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons. *Journal of Leukocyte Biology* **88**:1081-1087.

Paul-Pont, I., N. K. Dhand, and R. J. Whittington. 2013. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* **105**:127-138.

Pauletto, M., A. Segarra, C. Montagnani, V. Quillien, N. Faury, J. Le Grand, P. Miner, B. Petton, Y. Labreuche, E. Fleury, C. Fabioux, L. Bargelloni, T. Renault, and A. Huet. 2017. Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *J Exp Biol*.

Payton, L., M. Perrigault, C. Hoede, J. C. Massabuau, M. Sow, A. Huet, F. Bouillot, C. Fabioux, H. Hegaret, and D. Tran. 2017. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Scientific Reports* **7**.

Pepin, J. F., A. Riou, and T. Renault. 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* **149**:269-276.

Perdue, J. A., Beattie J. H., Chew K. K. 1981. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State.

Pernet, F., J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Degremont, F. Lagarde, J. F. Pepin, and N. Keck. 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**:215-237.

Pernet, F., C. Lupo, C. Bacher, and R. J. Whittington. 2016. Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **371**.

Petton, B., M. Bruto, A. James, Y. Labreuche, M. Alunno-Bruscia, and F. Le Roux. 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**.

Petton, B., F. Pernet, R. Robert, and P. Boudry. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **3**:257-273.

- Pham, L. N., M. S. Dionne, M. Shirasu-Hiza, and D. S. Schneider. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens* **3**:e26.
- Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber, and C. R. E. Sousa. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**:997-1001.
- Piedade, D. and J. M. Azevedo-Pereira. 2016. The Role of microRNAs in the Pathogenesis of Herpesvirus Infection. *Viruses-Basel* **8**.
- Pinaud, S. 2014-2017. Aspects fonctionnel et évolutif de l'immunité mémoire chez les invertébrés : l'escargot vecteur de la Bilharziose intestinale *Biomphalaria glabrata* comme nouvel organisme modèle ?. Thèse de Doctorat en Biologie. Université de Perpignan Via Domitia.
- Pinaud, S., J. Portela, D. Duval, F. C. Nowacki, M. A. Olive, J. F. Allienne, R. Galinier, N. M. Dheilly, S. Kieffer-Jaquinod, G. Mitta, A. Theron, and B. Gourbal. 2016. A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens* **12**.
- Plant, K. P., H. Harbottle, and R. L. Thune. 2005. Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* **29**:627-635.
- Pope, E. C., A. Powell, E. C. Roberts, R. J. Shields, R. Wardle, and A. F. Rowley. 2011. Enhanced Cellular Immunity in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'Vaccination'. *Plos One* **6**.
- Portela, J., D. Duval, A. Rognon, R. Galinier, J. Boissier, C. Coustau, G. Mitta, A. Theron, and B. Gourbal. 2013. Evidence for Specific Genotype-Dependent Immune Priming in the Lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* Snail. *Journal of Innate Immunity* **5**:261-276.
- Poynter, S. J. and S. J. DeWitte-Orr. 2015. Length-dependent innate antiviral effects of double-stranded RNA in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTG-2. *Fish & Shellfish Immunology* **46**:557-565.
- Prado-Alvarez, M., G. Darmody, S. Hutton, A. O'Reilly, S. A. Lynch, and S. C. Culloty. 2016. Occurrence of OsHV-1 in *Crassostrea gigas* Cultured in Ireland during an Exceptionally Warm Summer. Selection of Less Susceptible Oysters. *Frontiers in Physiology* **7**.

-Q-

- Qu, T., L. L. Zhang, W. Wang, B. Y. Huang, Y. X. Li, Q. H. Zhu, L. Li, and G. F. Zhang. 2015. Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in *Crassostrea gigas* clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Developmental and Comparative Immunology* **51**:74-78.
- Quintin, J., S. Saeed, J. H. A. Martens, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. C. Ifrim, C. Logie, L. Jacobs, T. Jansen, B. J. Kullberg, C. Wijmenga, L. A. B. Joosten, R. J. Xavier, J. W. M. van der Meer, H. G. Stunnenberg, and M. G. Netea. 2012a. *Candida albicans* Infection Affords Protection against Reinfection via Functional Reprogramming of Monocytes. *Cell Host & Microbe* **12**:223-232.
- Quintin, J., S. Saeed, J. H. A. Martens, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. C. Ifrim, C. Logie, B. J. Kullberg, L. A. B. Joosten, R. J. Xavier, H. G. Stunnenberg, J. W. M. van der Meer, and M. G. Netea. 2012b. *Candida albicans* induces monocyte training via epigenetic reprogramming through a dectin-1-dependent pathway. *Mycoses* **55**:58-58.

-R-

- Rances, E., Y. X. H. Ye, M. Woolfit, E. A. McGraw, and S. L. O'Neill. 2012. The Relative Importance of Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. *PLoS Pathogens* **8**.
- Randall, R. E. and S. Goodbourn. 2008. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **89**:1-47.

- Reber, A. and M. Chapuisat. 2012. No Evidence for Immune Priming in Ants Exposed to a Fungal Pathogen. *Plos One* **7**.
- Reikine, S., J. B. Nguyen, and Y. Modis. 2014. Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology* **5**.
- Ren, W. C., H. X. Chen, T. Renault, Y. Y. Cai, C. M. Bai, C. M. Wang, and J. Huang. 2013. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal* **10**.
- Renault, T., R. M. Le Deuff, C. Lipart, and C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods* **88**:41-50.
- Renault, T., R. M. Ledueff, N. Cochenne, B. Chollet, and P. Maffart. 1995. Herpes-Like Viruses Associated with High Mortality Levels in Larvae and Spat of Pacific Oysters, *Crassostrea-Gigas* - a Comparative-Study, the Thermal Effects on Virus Detection in Hatchery-Reared Larvae, Reproduction of the Disease in Axenic Larvae. *Veterinary Research* **26**:539-543.
- Renault, T., R. M. Ledueff, N. Cochenne, and P. Maffart. 1994. Herpesviruses Associated with Mortalities among Pacific Oyster, *Crassostrea-Gigas*, in France - Comparative-Study. *Revue De Medecine Veterinaire* **145**:735-742.
- Renault, T., P. Moreau, N. Faury, J. F. Pepin, A. Segarra, and S. Webb. 2012. Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *Journal of Virology* **86**:5942-5947.
- Renault, T. and B. Novoa. 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* **17**:397-409.
- RESCO http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole/
- Richetta, C. and M. Faure. 2013. Autophagy in antiviral innate immunity. *Cellular Microbiology* **15**:368-376.
- Robalino, J., T. C. Bartlett, R. W. Chapman, P. S. Gross, C. L. Browdy, and G. W. Warr. 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: Inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Developmental and Comparative Immunology* **31**:539-547.
- Robalino, J., C. L. Browdy, S. Prior, A. Metz, P. Parnell, P. Gross, and G. Warr. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *Journal of Virology* **78**:10442-10448.
- Roberts, S., G. Goetz, S. White, and F. Goetz. 2009. Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* **11**:24-44.
- Rodrigues, J., F. A. Brayner, L. C. Alves, R. Dixit, and C. Barillas-Mury. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* **329**:1353-1355.
- Rohfritsch, A., N. Bierne, P. Boudry, S. Heurtebise, F. Cornette, and S. Lapegue. 2013. Population genomics shed light on the demographic and adaptive histories of European invasion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Evolutionary Applications* **6**:1064-1078.
- Roizman B., Sears A. An Inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987;41:543-571
- Roque, A., N. Carrasco, K. B. Andree, B. Lacuesta, L. Elandaloussi, I. Gairin, C. J. Rodgers, and M. D. Furones. 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* **324-325**:303-306.
- Rosa, R. D., J. de Lorgetil, P. Tailliez, R. Bruno, D. Piquemal, and E. Bachere. 2012. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics* **13**:252.
- Rosa, R. D., A. Santini, J. Fievet, P. Bulet, D. Destoumieux-Garzon, and E. Bachere. 2011. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Plos One* **6**:e25594.
- Rosani, U., A. Pallavicini, and P. Venice. 2016. The miRNA biogenesis in marine bivalves. *Peerj* **4**.

- Rosani, U., L. Varotto, S. Domeneghetti, G. Arcangeli, A. Pallavicini, and P. Venier. 2015. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* **17**:4200-4212.
- Rosani, U. and P. Venier. 2017. Oyster RNA-seq Data Support the Development of Malacoherpesviridae Genomics. *Frontiers in Microbiology* **8**.
- Roth, O., G. Joop, H. Eggert, J. Hilbert, J. Daniel, P. Schmid-Hempel, and J. Kurtz. 2010. Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology* **79**:403-413.
- Roth, O. and J. Kurtz. 2009. Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental and Comparative Immunology* **33**:1151-1155.
- Roth, O., B. M. Sadd, P. Schmid-Hempel, and J. Kurtz. 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc Biol Sci* **276**:145-151.
- Rout, N., S. Kumar, S. Jaganmohan, and V. Murugan. 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* **25**:2778-2786.
- Rowley, A. F. and A. Powell. 2007. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific? *J Immunol* **179**:7209-7214.
- Royet, J., D. Gupta, and R. Dziarski. 2011. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nature Reviews Immunology* **11**:837-851.
- Rozelle, D. K., C. M. Filone, N. Kedersha, and J. H. Connor. 2014. Activation of stress response pathways promotes formation of antiviral granules and restricts virus replication. *Mol Cell Biol* **34**:2003-2016.
- Rubio, T. 2014-2017. Diversité des mécanismes d'interactions des vibrios du clade *Splendidus* et de leur hôte, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse de Doctorat en Biologie de interactions. Université de Montpellier.

-S-

- Sadd, B. M., Y. Kleinlogel, R. Schmid-Hempel, and P. Schmid-Hempel. 2005. Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters* **1**:386-388.
- Sadd, B. M. and P. Schmid-Hempel. 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology* **16**:1206-1210.
- Sadd, B. M. and P. Schmid-Hempel. 2007. Facultative but persistent transgenerational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Current Biology* **17**:R1046-R1047.
- Sadd, B. M. and P. Schmid-Hempel. 2009. A distinct infection cost associated with trans-generational priming of antibacterial immunity in bumble-bees. *Biol Lett* **5**:798-801.
- Saeed, S., J. Quintin, H. H. Kerstens, N. A. Rao, A. Aghajani-Refah, F. Matarese, S. C. Cheng, J. Ratter, K. Berentsen, M. A. van der Ent, N. Sharifi, E. M. Janssen-Megens, M. Ter Huurne, A. Mandoli, T. van Schaik, A. Ng, F. Burden, K. Downes, M. Frontini, V. Kumar, E. J. Giamarellos-Bourboulis, W. H. Ouwehand, J. W. van der Meer, L. A. Joosten, C. Wijmenga, J. H. Martens, R. J. Xavier, C. Logie, M. G. Netea, and H. G. Stunnenberg. 2014. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* **345**:1251086.
- Salmela, H., G. V. Amdam, and D. Freitak. 2015. Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathogens* **11**:e1005015.
- Salvi, D. and P. Mariottini. 2016. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Samain, J.-F., McCombie, H., 2008. Summer Mortality of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas*: The Morest Project. Editions Quae.

- Sansone, C. L., J. Cohen, A. Yasunaga, J. Xu, G. Osborn, H. Subramanian, B. Gold, N. Buchon, and S. Cherry. 2015. Microbiota-Dependent Priming of Antiviral Intestinal Immunity in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe* **18**:571-581.
- Sauvage, C., P. Boudry, D. J. de Koning, C. S. Haley, S. Heurtebise, and S. Lapegue. 2010. QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Animal Genetics* **41**:390-399.
- Sauvage, C., J. F. Pepin, S. Lapegue, P. Boudry, and T. Renault. 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Research* **142**:181-187.
- Savin, K. W., B. G. Cocks, F. Wong, T. Sawbridge, N. Cogan, D. Savage, and S. Warner. 2010. A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology Journal* **7**.
- Schikorski, D., N. Faury, J. F. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez, and T. Renault. 2011a. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* **155**:28-34.
- Schikorski, D., T. Renault, D. Saulnier, N. Faury, P. Moreau, and J.-F. Pépin. 2011b. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* **42**:27.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. *Bioessays* **27**:1026-1034.
- Schmitt, P., M. Duperthuy, C. Montagnani, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2011. Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. An overview with focus on summer mortalities. . Pages 227-273 in J. Qin, editor. *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality*. Nova publishers.
- Schmitt, P., Y. Gueguen, E. Desmarais, E. Bachere, and J. de Lorgeril. 2010. Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evol Biol* **10**:23.
- Schmitt, P., R. D. Rosa, M. Duperthuy, J. de Lorgeril, E. Bachere, and D. Destoumieux-Garzon. 2012. The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front Microbiol* **3**:160.
- Schulenburg, H., C. Boehnisch, and N. K. Michiels. 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol Immunol* **44**:3338-3344.
- Schwenke, R. A., B. P. Lazzaro, and M. F. Wolfner. 2016. Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annu Rev Entomol* **61**:239-256.
- Scotti, P. D., S. C. Dearing, and D. R. Greenwood. 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **41**:91-101.
- Segarra, A., L. Baillon, D. Tourbiez, A. Benabdelmouna, N. Faury, N. Bourgougnon, and T. Renault. 2014a. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* **45**.
- Segarra, A., N. Faury, J. F. Pepin, and T. Renault. 2014b. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **119**:5-11.
- Segarra, A., F. Mauduit, N. Faury, S. Trancart, L. Degremont, D. Tourbiez, P. Haffner, V. Barbosa-Solomieu, J. F. Pepin, M. A. Travers, and T. Renault. 2014c. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* **15**.
- Segarra, A., J. F. Pepin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury, and T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* **153**:92-99.

- Sen, G. C. and G. A. Peters. 2007. Viral stress-inducible genes. *Advances in Virus Research*, Vol 70 **70**:233-263.
- Shimahara, Y., J. Kurita, I. Kiryu, T. Nishioka, K. Yuasa, M. Kawana, T. Kamaishi, and N. Oseko. 2012. Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Variants in Japan. *Fish Pathology* **47**:129-136.
- Simpson-Holley, M., N. Kedersha, K. Dower, K. H. Rubins, P. Anderson, L. E. Hensley, and J. H. Connor. 2011. Formation of antiviral cytoplasmic granules during orthopoxvirus infection. *J Virol* **85**:1581-1593.
- Singh, I. S. B., M. Manjusha, S. S. Pai, and R. Philip. 2005. Fenneropenaeus indicus is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms* **66**:265-270.
- Sire, C., A. Rognon, and A. Theron. 1998. Failure of Schistosoma mansoni to reinfect Biomphalaria glabrata snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology* **117**:117-122.
- Sminia, T. and W. P. W. Vanderknaap. 1987. Cells and Molecules in Molluscan Immunology. *Developmental and Comparative Immunology* **11**:17-28.
- Snieszko, S.F., 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish Biol.* 6, 197–208.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, and K. Muroga. 1998. Vibrio splendidus biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster Crassostrea gigas larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **33**:111-118.
- Sun, J. C., J. N. Beilke, and L. L. Lanier. 2009. Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells. *Journal of Immunology* **182**.

-T-

- Taris, N., R. P. Lang, P. W. Reno, and M. D. Camara. 2009. Transcriptome response of the Pacific oyster (Crassostrea gigas) to infection with Vibrio tubiashii using cDNA AFLP differential display. *Anim Genet* **40**:663-677.
- Tate, A. T., P. Andolfatto, J. P. Demuth, and A. L. Graham. 2017. The within-host dynamics of infection in trans-generationally primed flour beetles. *Molecular Ecology* **26**:3794-3807.
- Terahara, K., K. G. Takahashi, A. Nakamura, M. Osada, M. Yoda, T. Hiroi, M. Hirasawa, and K. Mori. 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "Crassostrea gigas". *Developmental and Comparative Immunology* **30**:667-683.
- Tidbury, H. J., A. B. Pedersen, and M. Boots. 2011. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**:871-876.
- Traniello, J. F. A., R. B. Rosengaus, and K. Savoie. 2002. The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:6838-6842.
- Travers, M. A., K. B. Miller, A. Roque, and C. S. Friedman. 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:11-31.

-V-

- van der Laan, A. M., A. M. van Gemert, R. W. Dirks, J. N. Noordermeer, L. G. Fradkin, H. J. Tanke, and C. R. Jost. 2012. mRNA cycles through hypoxia-induced stress granules in live Drosophila embryonic muscles. *Int J Dev Biol* **56**:701-709.
- van der Meer, J. W. M., L. A. B. Joosten, N. Riksen, and M. G. Netea. 2015. Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Molecular Immunology* **68**:40-44.

- Vanhove, A. S., T. P. Rubio, A. N. Nguyen, A. Lemire, D. Roche, J. Nicod, A. Vergnes, A. C. Poirier, E. Disconzi, E. Bachere, F. Le Roux, A. Jacq, G. M. Charriere, and D. Destoumieux-Garzon. 2016. Copper homeostasis at the host vibrio interface: lessons from intracellular vibrio transcriptomics. *Environmental Microbiology* **18**:875-888.
- Vasquez-Yeomans, R., J. Caceres-Martinez, and A. F. Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research* **23**:417-419.
- Vezzulli, L., E. Pezzati, M. Stauder, L. Stagnaro, P. Venier, and C. Pruzzo. 2015. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology* **17**:1065-1080.
- Vilcinskaskas, A. 2016. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology (Jena)* **119**:273-280.

-W-

- Wang, J. J., L. L. Wang, C. Y. Yang, Q. F. Jiang, H. Zhang, F. Yue, M. M. Huang, Z. B. Sun, and L. S. Song. 2013a. The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. *Developmental and Comparative Immunology* **40**:142-147.
- Wang, L., X. Song, and L. Song. 2017. The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*.
- Wang, P. H., S. P. Weng, and J. G. He. 2015. Nucleic acid-induced antiviral immunity in invertebrates: An evolutionary perspective. *Developmental and Comparative Immunology* **48**:291-296.
- Wang, P. H., L. S. Yang, Z. H. Gu, S. P. Weng, X. Q. Yu, and J. G. He. 2013b. Nucleic acid-induced antiviral immunity in shrimp. *Antiviral Research* **99**:270-280.
- Wang, W. L., T. Zhang, L. L. Wang, J. C. Xu, M. J. Li, A. G. Zhang, L. M. Qiu, and L. S. Song. 2016. A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **65**:182-190.
- Wang, X. B., Q. F. Wu, T. Ito, F. Cillo, W. X. Li, X. M. Chen, J. L. Yu, and S. W. Ding. 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:484-489.
- Wang, X. Y., E. R. Hinson, and P. Cresswell. 2007. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host & Microbe* **2**:96-105.
- Watson, F. L., R. Puttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo, V. I. Rebel, and D. Schmucker. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* **309**:1874-1878.
- Webb, S. C., A. Fidler, and T. Renault. 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* **272**:126-139.
- Weber, A. N. R., S. Tauszig-Delamasure, J. A. Hoffmann, E. Lelievre, H. Gascan, K. P. Ray, M. A. Morse, J. L. Imler, and N. J. Gay. 2003. Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature Immunology* **4**:794-800.
- Whittington, R., I. Paul-Pont and N. Dhand. 2013. 2011/053 Aquatic Animal Health Subprogram: Pacific oyster mortality syndrome (POMS) – understanding biotic and abiotic environmental and husbandry effects to reduce economic losses ISBN: 97 8-1-74210- 309- 9.
- Witteveldt, J., C. C. Cifuentes, J. M. Vlak, and M. C. W. van Hulten. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination. *Journal of Virology* **78**:2057-2061.

-X-

- Xia, J. Y., C. M. Bai, C. M. Wang, X. L. Song, and J. Huang. 2015. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal* **12**.
- Xu, F., X. T. Wang, Y. Feng, W. Huang, W. Wang, L. Li, X. D. Fang, H. Y. Que, and G. F. Zhang. 2014. Identification of Conserved and Novel MicroRNAs in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* by Deep Sequencing. *Plos One* **9**.

-Y-

- Yamaura, K., K. G. Takahashi, and T. Suzuki. 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **149**:168-175.

-Z-

- Zanchi, C., J. P. Troussard, G. Martinaud, J. Moreau, and Y. Moret. 2011. Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect. *Journal of Animal Ecology* **80**:1174-1183.
- Zanchi, C., J. P. Troussard, J. Moreau, and Y. Moret. 2012. Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. *Proc Biol Sci* **279**:3223-3230.
- Zhang, G., X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P. W. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Lozo, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jiang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, Q. Wang, C. E. Steinberg, H. Wang, L. Qian, X. Liu, and Y. Yin. 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*.
- Zhang, L. L., L. Li, X. M. Guo, G. W. Litman, L. J. Dishaw, and G. F. Zhang. 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports* **5**.
- Zhang, L. L., L. Li, and G. F. Zhang. 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* **30**:653-660.
- Zhang, L. L., L. Li, and G. F. Zhang. 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and Comparative Immunology* **35**:603-610.
- Zhang, R., R. Liu, L. S. Xin, H. Chen, C. H. Li, L. L. Wang, and L. S. Song. 2016. A CgIFNLP receptor from *Crassostrea gigas* and its activation of the related genes in human JAK/STAT signaling pathway. *Developmental and Comparative Immunology* **65**:98-106.
- Zhang, S., Z. Wang, and H. Wang. 2013a. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology* **39**:72-78.
- Zhang, S. M. and E. S. Loker. 2003. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. *Developmental and Comparative Immunology* **27**:175-187.
- Zhang, T., L. M. Qiu, Z. B. Sun, L. L. Wang, Z. Zhou, R. Liu, F. Yue, R. Sun, and L. S. Song. 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology* **45**:141-150.
- Zhang, Y., X. C. He, F. Yu, Z. M. Xiang, J. Li, K. L. Thorpe, and Z. N. Yu. 2013b. 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**.

- Zhao, X. L., H. Yu, L. F. Kong, and Q. Li. 2012. Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Plos One* **7**.
- Zhao, X. L., H. Yu, L. F. Kong, S. K. Liu, and Q. Li. 2014. Comparative Transcriptome Analysis of Two Oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea hongkongensis* Provides Insights into Adaptation to Hypo-Osmotic Conditions. *Plos One* **9**.
- Zhou, Z., L. L. Wang, L. S. Song, R. Liu, H. Zhang, M. M. Huang, and H. Chen. 2014. The Identification and Characteristics of Immune-Related MicroRNAs in Haemocytes of Oyster *Crassostrea gigas*. *Plos One* **9**.

Annexe : Bilan des valorisations, activités de recherche et d'enseignement

Valorisations :

- Publications scientifiques:

- (1) Jouaux A., **Lafont M.**, Blin J.-L., Houssin M., Mathieu M. and Lelong C. 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC genomics* 14.
- (2) **Lafont M.**, Petton B., Vergnes A., Pauletto M., Segarra A., Gourbal B. and Montagnani C. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *En révision à Scientific reports*.
- (3) **Lafont M.** et al., Molecular mechanisms underlying antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *En préparation*.
- (4) **Lafont M. et al.**, Transgenerational antiviral immune priming in the Pacific oyster *C. gigas*. *En préparation*.
- (5) de Lorgeril et al., Cracking the code of oyster polymicrobial disease: herpesvirus fosters bacterial septicemia by compromising oyster antibacterial defenses. *En préparation*.

- Communications:

- (1) **Lafont M.**, Charrière G.M., Gourbal B. and Montagnani C. Molecular mechanisms and specificity of immune priming in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Réunion annuelle du réseau écologie des interactions durables (REID), du 23 au 26 Mars 2015, Lyon. (*poster*)
- (2) **Lafont M. et Montagnani C.** Bilan de l'avancée des travaux sur le priming antiviral auprès du Comité Régional de la conchyliculture en Méditerranée, en 2014 et en 2015. (*présentation orale*)
- (3) **Lafont M. et Montagnani C.** Réunion annuelle du projet PROVIGAS (Protection antivirale chez l'huître *C. gigas*), en 2014-2016.
- (4) Lafont M., Gourbal B. and **Montagnani C.** Workshop "Innate Immune Memory In Invertebrates". 30 Mars 2016, Perpignan. (*présentation orale*)
- (5) **Lafont M.**, Gourbal B. and Montagnani C. Evidence for antiviral immune priming and immune memory in a Lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Innate Immune Memory conference, 14-16 Mars 2017, Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK. (*poster*)
- (6) **Lafont M.**, Gourbal B., Montagnani C. Evidence for antiviral immune priming and immune memory in a Lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Immuninv 2017, 7-9 juin 2017, Lyon, France. (*présentation orale*)

Formations suivies dans le cadre de la thèse:

- Formation « atelier de qualification au CNU »
- Formation à l'anglais scientifique
- Formation en communication orale et valorisation scientifique

Enseignement : Enseignements réalisés en tant que vacataire

- Travaux pratiques de microbiologie en 2^{ème} année de Biologie, Université Montpellier x 12 heures (Marie-Hélène Boyer).
- Travaux pratiques de physiologie animale et de biologie moléculaire en 1^{ère} année du département de Génie Biologie de l'IUT de Perpignan x 25 heures (David Duval).

Encadrement :

- Stagiaire de 2^{ème} année de l'IUT génie biologique de Montpellier (Abigaïl Delort).

Responsabilités au sein du laboratoire :

- Représentant élu des personnels non-permanents au sein du conseil d'unité (2015-2017).
- Membre du comité de valorisation et de communication de l'unité.

Bourse de financement annexe à la thèse :

- Obtention du financement d'une bourse de mobilité Internationale subventionnée par l'Ifremer. Trois mois de recherche ont été réalisés au Sydney Institute of Marine Science (SIMS) et à l'Université Macquarie en collaboration avec le Dr Timothy Green et le Pr David Raftos.

Résumé

Depuis 2008, des épisodes de surmortalité massive d'origine multifactorielle, affectent les élevages de juvéniles d'huître creuse *Crassostrea gigas* à l'échelle mondiale dont le virus ostreïd herpesvirus type 1 (OsHV-1) peut être considéré comme un des agents pathogènes majeurs. L'immunité des huîtres, comme pour l'ensemble des invertébrés, repose sur un système immunitaire inné et a longtemps été considéré comme très peu spécifique et dépourvu de capacité mémorielle. Cependant, ces dernières années, cette vision simpliste de l'immunité des invertébrés a pu être remise en question par l'intermédiaire d'études ayant démontré l'existence d'une réponse immunitaire spécifique et mémoire. Cependant les connaissances sur les mécanismes sous-jacents à ces phénomènes restent encore aujourd'hui extrêmement fragmentaires. Dans le cadre de cette thèse, l'objectif était de caractériser le priming immunitaire antiviral ainsi que ses mécanismes chez l'huître creuse face au virus OsHV-1. En stimulant les huîtres avec un agent mimétique viral, le poly(I:C), les résultats de ces travaux ont montré que cette molécule protégeait spécifiquement contre l'OsHV-1 en améliorant le taux de survie des huîtres de près de 100%, mais ne protégeait pas d'infections bactériennes à *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Cette protection est efficace en milieu contrôlé comme en milieu naturel sur le long terme, pour une durée minimale de 5 mois, permettant de protéger les huîtres d'un épisode de mortalité. Une approche transcriptomique globale (RNA-seq) a permis d'identifier différentes voies de signalisations immunitaires antivirales différenciellement régulées suite à la stimulation par le poly(I:C). Les profils de régulation de ces transcrits présentent une expression majoritairement maintenue dans le temps, pendant au moins 10 jours, ce qui pourrait expliquer la protection observée. L'ensemble de ces résultats montre l'existence d'un phénomène de priming immunitaire antiviral efficace chez un mollusque Lophotrochozoaire et apporte une contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène. Ces travaux ont permis d'apporter des pistes de sortie de crise pour la filière ostréicole jusqu'alors inexplorées.

Mots-clés : Mollusque, huître creuse, *Crassostrea gigas*, OsHV-1, poly(I:C), immunité innée, priming immunitaire, mécanismes antiviraux

Abstract

Since 2008, mass mortality events of multifactorial origin have affected the Pacific oyster *Crassostrea gigas* farms worldwide, in which ostreïd herpesvirus type 1 (OsHV-1) can be considered as one of the major pathogens. The immunity of oysters, as for all invertebrates, is based on an innate immune system that has long been considered to be scarcely specific and to lack memory. However, in recent years this simplistic view of invertebrate immunity has been questioned through studies that have demonstrated the existence of a specific immune response and memory. However, knowledge about the mechanisms underlying these phenomena still remains extremely fragmentary. The aim of this thesis was to characterize the antiviral immune priming and its mechanisms in the Pacific oyster against OsHV-1. By stimulating oysters with a viral mimic, poly(I:C), the results of this work have shown that this molecule specifically protects against OsHV-1 by improving oyster survival by almost 100% but does not protect against bacterial infections at *Vibrio tasmaniensis* LGP32. This protection is effective in a controlled environment as well as in the natural environment on the long term, for a minimum duration of 5 months, allowing protecting oysters from mass mortality events. A global transcriptomic approach (RNA-seq) carried out during this thesis allowed us to identify different antiviral immune pathways differentially regulated following the stimulation by poly(I:C). The regulation profiles of these transcripts exhibit expression mostly maintained over time, for at least 10 days, which could explain the observed protection. All these results show the existence of an effective antiviral immune priming phenomenon in a Lophotrochozoan mollusc and contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying this phenomenon. This work opens new perspectives hitherto unexplored to support oyster farming against this crisis.

Key words: Mollusc, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, OsHV-1, poly(I:C), innate immunity, immune priming, antiviral mechanisms