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

En Biologie Des Interactions
Mécanismes des Interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche IHPE UMR5244

Diversité fonctionnelle et mécanisme d'action des Big défensines, peptides antimicrobiens de l'huître *Crassostrea gigas*.

Présentée par Noémie DE SAN NICOLAS
Le 15 septembre 2023

Sous la direction de Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, Caroline MONTAGNANI et Philippe BULET

Devant le jury composé de

Dr. Josette PERRIER, Professeur des Universités, Aix-Marseille Université	Rapportrice
Dr. Yannick FLEURY, Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteur
Dr. Sophie GAUDRIAULT, Directrice de recherche, INRAE, Montpellier	Examinatrice
Dr. Stéphane COCIANCICH, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Président du jury
Dr. Alain DUFOUR, Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud	Examinateur
Dr. Delphine DESTOUMIEUX-GARZON, Directrice de recherche, CNRS, Montpellier	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, je remercie Madame Josette Perrier et Monsieur Yannick Fleury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Monsieur Alain Dufour, Monsieur Stéphane Cociancich et Madame Sophie Gaudriault pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Madame Séverine Zirah, Monsieur Yannick Labreuche, Monsieur Alain Givaudan pour les différents échanges toujours très constructifs, votre disponibilité, votre écoute et votre bienveillance.

Je remercie le CNRS, L'ANR MOSAR DEF et l'Ifremer d'avoir financé cette thèse et les travaux engagés. Je remercie aussi l'Université de Montpellier pour le financement DEPH de la KIM Sea&Coast.

Je remercie également l'école doctorale GAIA ainsi que l'Université de Montpellier où j'ai effectué mes 8 années d'études supérieures.

Je remercie les directeurs successifs du laboratoire IHPE, Guillaume Mitta et Christoph Grunau de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire « Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement » (IHPE, UMR5244).

Je désire exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur et mes directrices de thèse, Delphine Destoumieux-Garzon, Caroline Montagnani et Philippe Bulet. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, votre bienveillance ainsi que vos encouragements durant cette thèse. Je vous remercie de m'avoir fait confiance pour ce beau sujet. Delphine, un grand merci pour ton écoute et ton humanité et de m'avoir guidée durant cette thèse. Tu es une personne exceptionnelle d'un point de vue professionnel comme personnel. Caro, un grand merci pour ton écoute. Tu as toujours été de très bon conseil. Ta disponibilité ainsi que ton optimisme ont été pour moi une réelle source de motivation. Philippe, je ressens beaucoup d'honneur d'avoir travaillé avec toi. Merci pour nos échanges toujours enrichissants et merci de m'avoir si bien accueillie à Archamps lors de mes missions où je me sentais comme chez moi et surtout où j'ai pu découvrir la protéomique. J'ai réellement pris plaisir à travailler avec vous trois ! Cette expérience avec vous aura été très enrichissante et restera gravée à jamais dans ma mémoire !

Je pense pouvoir dire que cette thèse n'aurait pas été la même sans l'incroyable esprit de collaboration entre de nombreuses personnes de consortium Mosar-Def. Merci à Albane Jouault, Lhousseine Touqui de l'institut Pasteur à Paris. Merci à Aromal Asokan, Karine Loth, Vincent Aucagne et Agnès Delmas du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Merci à Philippe Bulet et Sébastien Voisin de la plateforme BioPark à Archamps. Et merci à Rafael Da Rosa du Laboratoire d'immunologie appliquée à l'aquaculture (LIAA) de Florianópolis au Brésil. J'ai éprouvé une réelle satisfaction à collaborer avec vous, à travailler ensemble et à apprendre de chacun. Ce fut un véritable honneur pour moi de pouvoir enrichir mes connaissances grâce à cette collaboration pluridisciplinaire.

Un grand merci à toutes les personnes de l'UMR IHPE de Montpellier mais aussi de Perpignan. Mention spéciale à la team RNAi : Jean-Michel, Vivianne, Caro. Mais aussi à Agnès pour son aide précieuse en phylogénie et à Guillaume pour son encadrement en microscopie. Merci à tous les technicien(nes) pour leurs conseils, leurs disponibilités et leurs aides précieuses. Merci à Diane, Eric et Anne pour tout le côté administratif, les commandes et les missions. Un gros Big-Up à mes collègues doctorants, les déjà docteur : Daniel, Maurine, Janan, Aurélie et les futurs : Laura, Seb, Luc et Leo. Ce fut un réel plaisir de partager ces années avec vous tous ! Merci à Imane El Fannassi, qui a réalisé son stage sur ce sujet avec sérieux et enthousiasme, ce qui a permis de faire avancer notre étude. Je vous remercie tous, les membres du labo, pour votre accueil chaleureux et pour tous les moments agréables passés ensemble !

Je remercie tout particulièrement Rafael Da Rosa, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, ta bonne humeur et pour tous nos échanges. Ce fut un réel plaisir de maniper avec toi lors de tes venues en France, au labo ! J'espère qu'on aura l'occasion de retravailler ensemble prochainement.

Même si le labo est devenu un peu ma deuxième maison, Il y a des personnes extérieures a celui-ci pour qui je tiens à exprimer ma gratitude pour le soutien constant qu'ils m'ont offert !

Merci à mes amis depuis le lycée, Theza le 100 : Pallure, Alexis, Loic, Julian, Mika, Maxime, Galy, Victoria et Sophie, toujours un réel plaisir se retrouver et d'avoir encore 16ans d'âge mental quand on est ensemble. Durant mes études, j'ai loupé pas mal de moment avec vous, mais de grâce, gardez-moi s'en un peu !

Je remercie aussi mes amis pour toujours, mon plan à trois pref' : Nana et Nono, mes plus grands supporters ! Ainsi que Léa ! Depuis la licence, je peux compter sur vous et j'ai énormément de chance de vous avoir en tant que meilleurs amis, j'vous aime tout simplement.

Merci aussi à mes meilleure amies, Hajar et LN, pour votre soutien sans faille et pour faire tout simplement partie de ma vie ! Merci à vous deux et aussi à Boby et Lena de m'avoir écoutée me plaindre de la thèse dans des vocaux interminables et d'avoir fêter avec moi toute mes réussites ! je vous aime tant !

Je remercie Martine Mailhol pour la relecture de ce manuscrit ainsi que toute sa famille pour leur soutient.

Le plus grand des MERCI à ma famille,

Mamounette, merci infiniment pour ton soutien sans faille, pour ta simple présence qui m'apaise instinctivement, pour tes mots réconfortants et motivants quand je t'appelais tard le soir lorsque les émotions se faisaient trop fortes. Tu as toujours cru en moi et en mon rêve. Merci aussi pour tous les paniers de chocolats, gâteaux, et charcuteries que tu me livrais pendant l'écriture pour que je ne meurs pas de faim, sache que ce fut à chaque fois une vraie bouffée d'amour ! Pardon pour toute les fois où je ne suis pas venue vous voir à cause du boulot. J'ai de la chance d'être ta fille. Maman je t'aime ! Merci aussi à Hervé, pour ton soutient, pour ta bonne humeur et tous nos fous rires !

Papounet, merci pour ton soutien et tes encouragements et cela même 18 000km de moi. Tu me manques tant ! J'ai si hâte de pouvoir venir de voir sur ton île et de te faire un gros câlin. Je suis si fière d'être ta fille ! Papa, Je t'aime !

Coco, j'espère qu'aujourd'hui, tu es fier de ta petite sœur. Moi je suis très fière de toi, je t'aime grand frère !

Mamie, ma Reine, pardon pour toutes les fois où je ne suis pas descendue te voir, toute ces fois où je ne t'ai pas répondu au téléphone car trop occupée avec la thèse. Merci pour ton amour, tu es la femme la plus forte que je connaisse. Merci pour tous les moments partagés avec toi que j'apprécie tellement. Mamita, je t'aime !

Je finirais par remercier la personne la plus importante dans ma vie, Charles. Mon amour, merci d'être toi, d'être tout simplement là. Tu es le seul qui pourra tout endurer ! Je suis si chanceuse de partager ma vie avec toi et notre bébé chien, Ridley. Vous êtes ce que j'ai de plus précieux. Merci de croire en moi et de prendre soin de moi. Tu es le seul à trouver la bonne manière de faire quand je me referme sur moi-même, comme l'huitre^^. Merci de m'avoir encouragée et surtout supportée au quotidien mais surtout d'avoir compris et de me suivre dans mon rêve. Je t'aime pour l'éternité !

Je dédie cette thèse à toutes mes étoiles chanceuses qui veillent sur moi !

Table des matières

Liste des abréviations **7**

Liste des Figures **9**

Listes des Tableaux **10**

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION **11**

I. Interaction hôte-microbiote **13**

I.1. Le concept d'holobionte et la théorie de l'hologénome 13

I.2. Microbiote, Microbiome et méthodes d'analyse 14

I.3. Impact du microbiote sur les fonctions physiologiques et l'homéostasie de l'hôte 17

I.3.1 Microbiote et santé (cas des mammifères) 18

I.3.2. Microbiote et immunité 18

I.3.3. Dysbiose 19

I.4. Conséquences sur les capacités d'adaptation 22

I.5. Rôle du système immunitaire dans la régulation du microbiote 22

II. Les peptides antimicrobiens des métazoires **24**

II. 1. Les défensines 26

II.1. 1. Les *cis*-défensines 27

II.1. 2. Les *trans*-défensines 28

II.1.2. a. Les α-défensines 28

II.1.2. b. Les β-défensines 29

II.1.2. c. Les Big-défensines 29

II.1. 2. Les θ-défensines 31

II.2. La plurifonctionnalité des défensines 32

II.2. 1 Propriétés antimicrobiennes et mécanismes d'actions 32

II.2. 2. Autres propriétés des défensines 39

III. Modèle biologique : l'huître *Crassostrea gigas* **41**

III. 1. Ostréiculture et importance économique 41

III. 2. Biologie de l'huître *Crassostrea gigas* 44

III. 3. Caractéristiques génomiques de *C. gigas* 47

III. 4. Principales maladies touchant *C. gigas* 47

III.4. 1. Maladies affectant les stades larvaires 48

III.4. 2. Maladies affectant les stades juvéniles (naissains) 49

III.4. 3. Maladies affectant les stades adultes 50

III. 5. Le système immunitaire de l'huître 51

III.5. 1. Les cellules immunitaires : les hémocytes 51
III.5. 2. Reconnaissance du non soi 53
III.5. 3. Signalisation 55
III.5. 4. Molécules et mécanismes effecteurs 57
III.5. 5. Les effecteurs de l'immunité : cas de PAMs 59
III.5. 6. La mémoire immunitaire innée 62
III.6. Le microbiote de l'huître 62
III.6. 1. Caractérisation du microbiote de l'huître 62
III.6. 2. Impact du microbiote sur la santé de l'huître : influence de l'environnement, des pathogènes. ... 64
III.6. 3. Interactions entre le microbiote et le système immunitaire 66

IV.Objectifs du projet de thèse 67

CHAPITRE 2 : RESULTATS 71
SECTION I : Etude de la diversité fonctionnelle des Big-défensines de l'huître *Crassostrea gigas.* 73
I.1 Contexte et objectifs de l'étude 73
I.2 Article N°1. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. 77
I.3 Résultats complémentaires 1. Etude de la variabilité présence-absence (PAV) des gènes codant pour les Big défensines de l'huître *Crassostrea gigas* 105
I.4. Résultats complémentaires 2. Essai d'invalidation des gènes codant *Cg*-BigDef1-2 par la méthode d'interférence par l'ARN (ARNi) 115

SECTION II : Etude du mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1. 130
II.1 Contexte et objectifs de l'étude 130
II.2 Article N°2. Teichoic acids play a key role in the antibacterial activity of big defensins against Staphylococcus aureus. 137

CHAPITRE 3: Discussion générale et perspectives 178

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 195

ANNEXES 219
Destoumieux-Garzón .D, Montagnani C, Escoubas JM, Dantan L, De San Nicolas N, Travers MA, Toulza E, Mitta G, Céline Cosseau C. Cross-talk and mutual shaping between the immune system and the microbiota during an oyster's life, Philosophical transactions B. *En preparation.* 221
Bilan des valorisations, activités de recherche et d'enseignement 241

Liste des abréviations

AGO	Protéines argonautes
IFN	Interferon
ADNc	ADN complementaire
APD	Antimicrobial Peptide Database
ARNm	ARN messager
ASW	Eau de mer artificiel stérile
BAC	Bactérie
BD1	*Cg*-BigDef1
BPI	Bactericidal-permeability-increasing protein
CFU	Colony foming Units
CSαβ	Cysteine-stabilized αβ motif
Ct	Cycle de quantification
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
Ets	Extracellular Traps
FISH	Hybridation fluorescence in situ
FREPS	Fibrinogen-related proteins
FSW	Eau de mer stérile
HDP	Host Defense Peptides
IBD	Inflammatory bowel disease
IDR	Innate defense regulator
Ig	Immunoglobuline
KB	Killing buffer
LB	Luria-Bertani
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LPS	Lipopolysaccharides
LTA	Acide lipoteichoique
MALDI TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight
MAMPs	Microorganism-associated molecular patterns
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NGS	Next Generation Sequencing
NO	Oxyde nitrique.
ns	Non significatif
NT	Non Traité
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus type 1
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAMs	Peptides antimicrobiens
PAV	Variation Presence/Abscence des gènes
PB	Poor broth
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PGRP	PeptidoGlycan Recognition Protein
POMS	Pacific Oyster Mortality Syndrome
PoP	Patterns of Pathogenesis

PRPs	Pathogen-associated pattern Recognition Proteins
PRR	Pathogen recognition receptors
PRRs	Pathogen-associated pattern Recognition Receptors
RIG-I-like	Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi ou ARNi	Interference de l'ARN
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT-qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
SNT	Super Non Traité
SRs	Scavenger receptors
STING	Stimulator of interferon genes
TA	Acide teichoique
TGGE	Electrophorèse sur gel à gradient de température
TLRs	Toll-like Receptors
WTA	Wall teichoic acids

Liste des Figures

Figure 1 : Representation de l'holobionte d'apres Theis et al. (2016). 14
Figure 2 : Schema mettant en evidence la composition du "microbiome". 15
Figure 3 : Methodes pour etudier du fonctionnement du microbiome, extrait de Berg et al. (2020). 17
Figure 4 : Causes de dysbiose intestinale et developpement de maladies. 21
Figure 5 : Facteurs et mecanismes influant sur la structuration du microbiote,. 23
Figure 6 : Connectivite des ponts disulfures des cis et trans-defensines.. 27
Figure 7. Alignement des sequences d'acides amines de certaines Big defensines. 30
Figure 8 : Phylogenie simplifiee des big-defensines de mollusques bivalves.. 31
Figure 9 : Representations des structures tridimensionnelles des Defensines. 32
Figure 10. Observation des nanonets formes par Cg-BigDef1 en contact de S. aureus SG551. 35
Figure 11 : Vue d'ensemble des activites biologiques des HDP et des peptides immunomodulateurs (innate defense regulator, IDR). 39
Figure 12 : Production global d'huitres dans le monde. 42
Figure 13 : Cycle de production de Crassostrea gigas en ecloserie pour les naissains et en mer pour les juveniles jusqu'a obtention d'adultes. (FAO, s. d.). 43
Figure 14 : Cycle de vie de l'huitre creuse Crassostrea gigas. 45
Figure 15. Anatomie de l'huitre creuse Crassostrea gigas d'apres Howard & Smith (1983). 46
Figure 16 : Historique de la production (en milliers de tonnes) de l'ostreiculture en France. 48
Figure 17 : Les agents pathogenes des huitres qui infectent les differents stades du cycle de vie de l'huitre. 51
Figure 18 : Morphologie des populations d'hemocytes de l'huitre creuse Crassostrea gigas. 53
Figure 19 : Representation schematique des mecanismes de defenses medies par les hemocytes dans la reponse immunitaire innee chez les mollusques.. 53
Figure 20 : Representation de voies de signalisations du systeme immunitaire inne de l'huitre Crassostrea gigas. 57
Figure 21. (A) Phylogenie de la famille des big defensines de l'huitre. 106
Figure 22. Positions geographiques des populations naturelles d'huitres echantillonnees dans la baie de Brest. 108
Figure 23 . Genotypage pour les genes Cg-bigdefs de maniere individuelle des 82 huitres testees provenant soit de populations naturelles soit de la famille F14-V.. 112
Figure 24 : Representation schematique regroupant les etapes principales du mecanisme de l'interference ARN. 116
Figure 25. Plan experimental du test de l'invalidation des genes Cg-bigdef1-2. 118
Figure 26. Suivi de l'induction des genes Cg-bigdef1-2 par V. tasmaniensis LGP32. 123
Figure 27 : Test de l'invalidation du gene *Cg-bidgdef-1 et 2* par ARN interference. 124
Figure 28 : Test de l'invalidation de *Cg-mav* et *Cg-bpi* par ARN interference. 125
Figure 29: Suivie des mortalites au cours des tests d'ARNi. 126
Figure 30: Taux expression de *Cg-viperine* dans les premier temps de la cinetique.. 127
Figure 31. Reaction de chimie click par la cycloaddition catalysee par le cuivre (CuAAc) et Diels-Alder (IEDDA). 132
Figure 32. Voies de biosynthese des acides teichoïques de S. aureus. 134
Figure 33. Acide teichoïque de paroi (WTA) et acide lipoteichoïque (LTA) de S. aureus.. 135

Listes des Tableaux

Tableau 1. Synthese de l'expression, des mecanismes d'action, activites et fonctions des defensines selectionnees dans la litterature. 36
Tableau 2. Listes des PAMs identifies chez C. gigas..... 61
Tableau 3. Coordonnees geographiques et phenotypes des populations d'huitres naturelles françaises. Adaptes de (Gawra, 2022)..... 108
Tableau 4. Listes de plasmides contenants les genes Cg-bigdefs. 110
Tableau 5. Liste des amorces fonctionnelles pour l'analyse du PAV des Cg-bigdefs en PCR et qPCR. 111
Tableau 6. Presence des genes de Cg-bigdefs sur l'ensemble des d'huitres analysees. 113
Tableau 7. Liste des sequences des « siRNA » utilisees pour l'invalidation. 119
Tableau 8. Liste des amorces de qPCR. 120
Tableau 9. Presence des genes Cg-bigdefs, du facteur elongation Cg-ef1a, de Cg-mav et de Cg-bpi dans 7 differentes famille d'huitres (H2-D, F11-N, F11-O, F14-V, F14-R, F15 et F32). 122

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I. Interaction hôte-microbiote

I.1. Le concept d'holobionte et la théorie de l'hologénome

Le concept d'holobionte est un cadre théorique et expérimental essentiel pour étudier les interactions entre l'hôte et l'ensemble des communautés de micro-organismes internes ou de surface qui lui sont associés ainsi que la valeur sélective de ces assemblages d'espèces. D'après Baedke et al. 2020, ce sont dès les années 1940, que le biologiste allemand Adolf Meyer-Abich introduit une théorie de changement évolutif *via* un processus dit d'« holobiose » (Baedke et al., 2020). Il explique que les organismes complexes se sont développés au travers de phénomènes d'associations entre des organismes initialement indépendants (Baedke et al., 2020). Ce concept peut être considéré comme étant dans la continuité de la théorie endosymbiotique de Margulis qui a également introduit le concept que l'existence de tout organisme est la conséquence de l'intégration d'organismes pré-existants et le génome de chaque organisme serait le résultat de la combinaison d'ADN bactériens, viraux et eucaryotes (Margulis & Fester, 1991). Les macro-organismes ne sont plus alors considérés comme des individus isolés mais comme faisant partie d'une communauté d'espèces, un « méta-organisme ou holobionte » (Goulet et al., 2020; Schröder & Bosch, 2016) qui serait le résultat de l'interaction de leur propre génome avec celui des micro-organismes qu'il héberge (l'hologénome) (Figure 1). La théorie de l'hologénome, définie pour la première fois chez le corail (cnidaire), considère que l'holobionte et son hologénome associé (toutes les entités génomiques en interaction) forment la véritable unité soumise à l'évolution (Rosenberg et al., 2007a; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

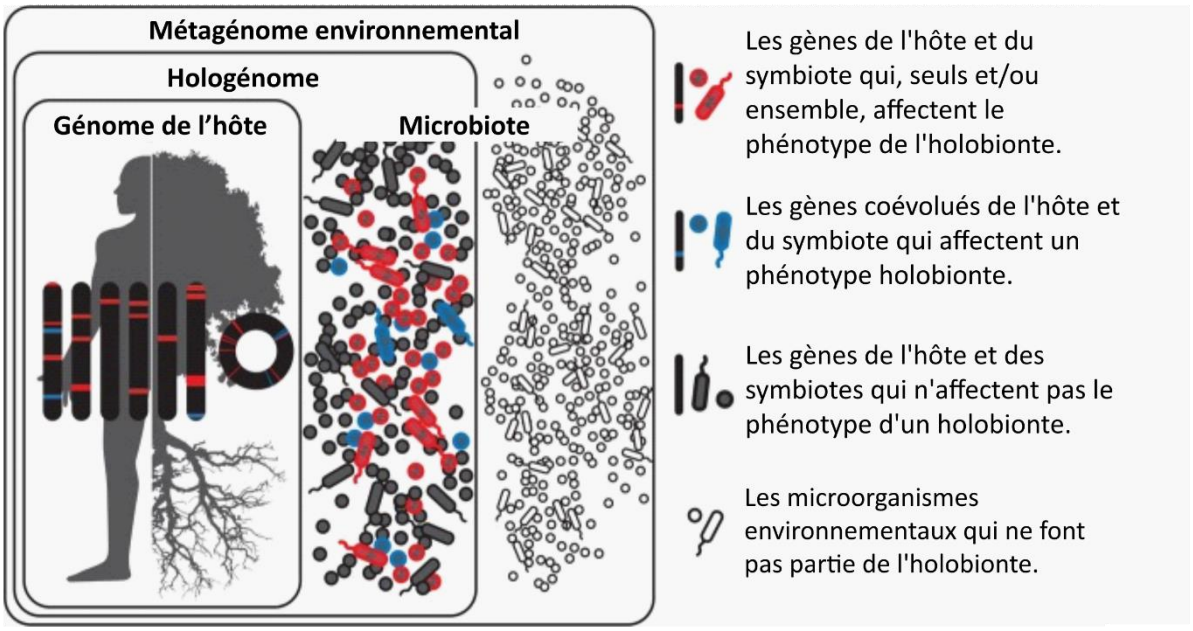


Figure 1. Représentation de l'holobionte d'après Theis et al. (2016). L'holobionte intègre l'ensemble des microorganismes en association avec un macrorganisme et l'hologénome intègre l'ensemble des génomes de l'hôte et celui de son microbiote associé.

La connaissance croissante du large éventail d'interactions entre les animaux et les bactéries a modifié fondamentalement la compréhension de la biologie animale. Les bactéries participent au développement des animaux. L'homéostasie est maintenue entre les animaux et leurs symbiotes par un échange constant de métabolites. Les animaux et les bactéries affectent leurs génomes respectifs en tirant profit des gènes de l'autre pour étendre leur potentiel métabolique. Les approches écologiques permettent d'approfondir notre compréhension des multiples niveaux d'interactions animal-bactérie en les étudiant dans les contextes physiologiques et écologiques dans lesquels ils ont évolué, et sur la manière dont ces interactions affectent l'ensemble de l'écosystème (McFall-Ngai et al., 2013).

I.2. Microbiote, Microbiome et méthodes d'analyse

La définition des termes microbiote et microbiome reste encore controversée. Les définitions que nous adopterons dans le cadre de cette thèse sont assez largement adoptées par la communauté scientifique. Le terme microbiote fera ainsi référence à tous les micro-organismes associés à l'hôte, exosymbiontes et endosymbiontes confondus (Margulis & Fester, 1991). Il inclura l'ensemble des micro-organismes procaryotes tels que les Archées et les bactéries, les eucaryotes comme les champignons et levures, mais aussi les virus. Le terme microbiome fera référence à la communauté microbienne ainsi que son environnement particulier (Figueiredo & Kramer, 2020). Ceci inclut non seulement les micro-organismes composant le microbiote, mais aussi l'ensemble des molécules produites par les micro-organismes, y compris leurs éléments structurels (acides nucléiques,

protéines, lipides, polysaccharides), leurs métabolites (molécules de signalisation, toxines, molécules organiques et inorganiques) et les molécules produites par les hôtes coexistants et structurés par les conditions environnementales (Whipps et al. 1988 ; Berg et al., 2020) (Figure 2).

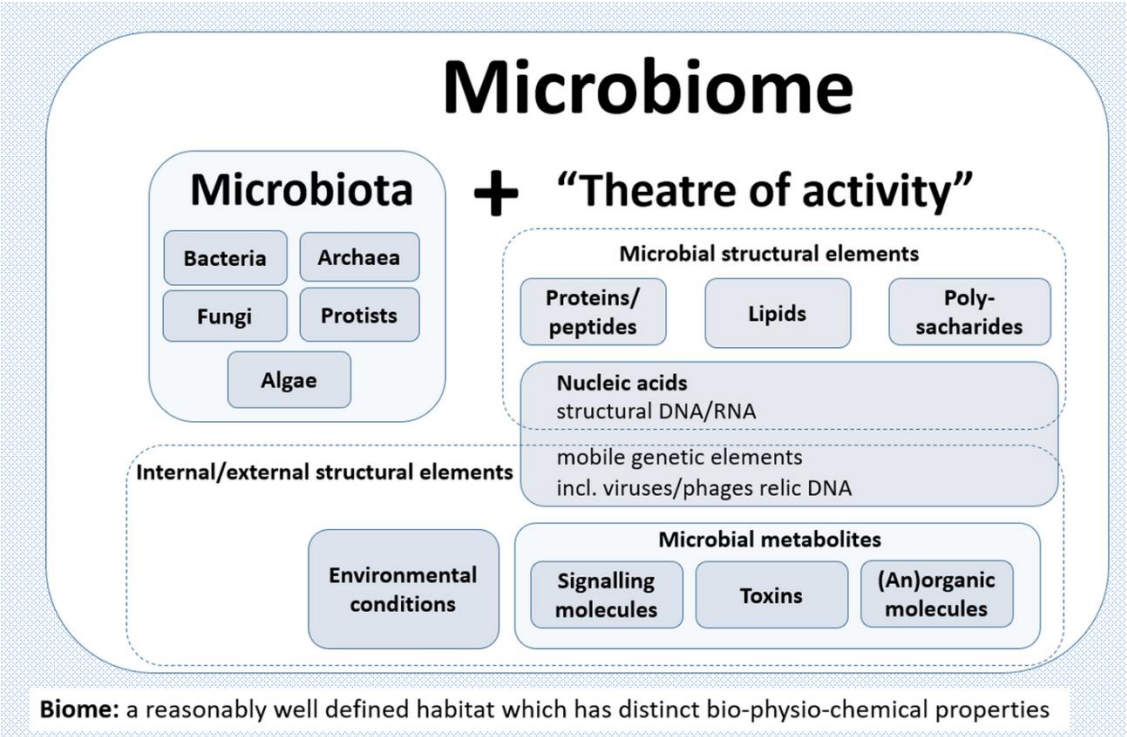


Figure 2. Schéma mettant en évidence la composition du "microbiome". Le microbiome contient à la fois le microbiote (communauté de micro-organismes) et son "théâtre d'activité" (éléments structurels, métabolites/molécules de signalisation et sous l'influence des conditions environnementales environnantes), extrait de Berg et al. (2020).

Étant donné que de nombreux micro-organismes associés à l'hôte ne sont pas cultivables en dehors de leur hôte, les approches de la génomique environnementale ont permis de révéler le poids respectif de l'hôte et de son microbiote dans les processus biologiques et évolutifs de l'holobionte (Figure 3) (Simon et al., 2019). Ceci a été rendu possible grâce au développement des techniques moléculaires et des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing), qui ont ouvert la porte à l'étude des hologénomes (Figure 1, Figure 3).

Les techniques moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR, Polymerase Chain Reaction) et l'hybridation fluorescence *in situ* (FISH, Fluorescent In Situ Hybirdisation) ou les technologies de séquençage traditionnelles ont été utilisées pour identifier, localiser et quantifier différents types de bactéries présentes dans des échantillons biologiques. Les technologies NGS ont permis de séquencer massivement et rapidement l'ADN ou l'ARN réduisant considérablement le temps et le coût requis pour le séquençage. Les techniques NGS ont largement contribué aux progrès récents de la recherche en « omique » et a facilité l'analyse de génomes, d'épigénomes ou de

transcriptomes de nombreux organismes. Ces approches globales appelées « omiques » ont permis d'inventorier massivement la biodiversité microbienne associée à un hôte et de détecter les variations que présentent différents individus ou différentes populations d'hôtes (Fricker et al., 2019; Shokralla et al., 2014).

Le métabarcoding (code barre de l'ADN) permet d'étudier la diversité du microbiote car il peut fournir une vue détaillée de la composition taxonomique des micro-organismes présents dans un échantillon. Le métabarcoding utilise des marqueurs génétiques pour identifier les différentes espèces de micro-organismes dans un échantillon. Ces marqueurs peuvent inclure des régions conservées du génome au sein d'une espèce ou polymorphes entre espèces, telles que le gène 16S rRNA pour les bactéries et les archées et le gène 18S rRNA ou la région ITS pour les eucaryotes (Fricker et al., 2019).

Les technologies de NGS donnent également accès aux métagénomes et aux métatranscriptomes d'échantillons complexes, correspondant respectivement à la caractérisation de l'ensemble des gènes d'une communauté microbienne et au profil d'expression de ces gènes, en utilisant à la fois une approche taxonomique et une approche analytique fonctionnelle (abondance relative des espèces, voies exprimées). Ces informations permettent d'accéder à la fonction des microbiotes et peuvent aider à comprendre comment le microbiote peut influencer l'homésostasie d'un organisme, ainsi que les facteurs qui peuvent déstabiliser ce microbiote et leur impact potentiel sur la santé.

Ces approches peuvent également être complétées par la caractérisation de l'ensemble (i) des protéines exprimées par tous les micro-organismes d'un microbiote, le métaprotéome ou (ii) des métabolites présents dans le microbiote, le métabolome. Ces informations permettent de mettre en évidence l'activité fonctionnelle des communautés microbiennes tout en fournissant des informations sur leur métabolisme, leur rôle écologique, leurs interactions et sur l'état physiologique et biochimique d'un organisme. Ensemble, ces techniques permettent de mener des études de « méta-omiques »(Fricker et al., 2019)(Figure 3).

L'utilisation des méta-omiques faisant appel au NGS et notamment au métabarcoding ont permis de décrire l'existence d'un « core-microbiote » ou microbiote de base chez de nombreux organismes, des mammifères aux plantes. Le core-microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes systématiquement associés à un hôte dans un environnement particulier. C'est le cas par exemple chez l'Homme au niveau de l'intestin où une communauté de bactéries est constamment présente, indépendamment du régime alimentaire ou du mode de vie de l'individu (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Des core-microbiotes ont également été décrits chez les plantes (Lundberg et al., 2012), ou encore des invertébrés marins comme les coraux (D Ainsworth et al., 2015) ou les crevettes

(crustacés) (Cornejo-Granados et al., 2018). Le « core-microbiote » peut jouer un rôle essentiel dans le maintien de la santé de l'hôte dans lequel il réside. Mais il n'est pas évident qu'il existe un core-microbiote chez toutes les espèces. En effet, le microbiote peut varier très fortement en fonction de l'environnement. On peut citer également la coquille Saint-Jacques (mollusque) dont le microbiote provient principalement de l'environnement (Chaillou et al., 2015; Sandaa et al., 2003) mais aussi la drosophile (insecte) dont le microbiote est constamment renouvelé (Blum et al., 2013).

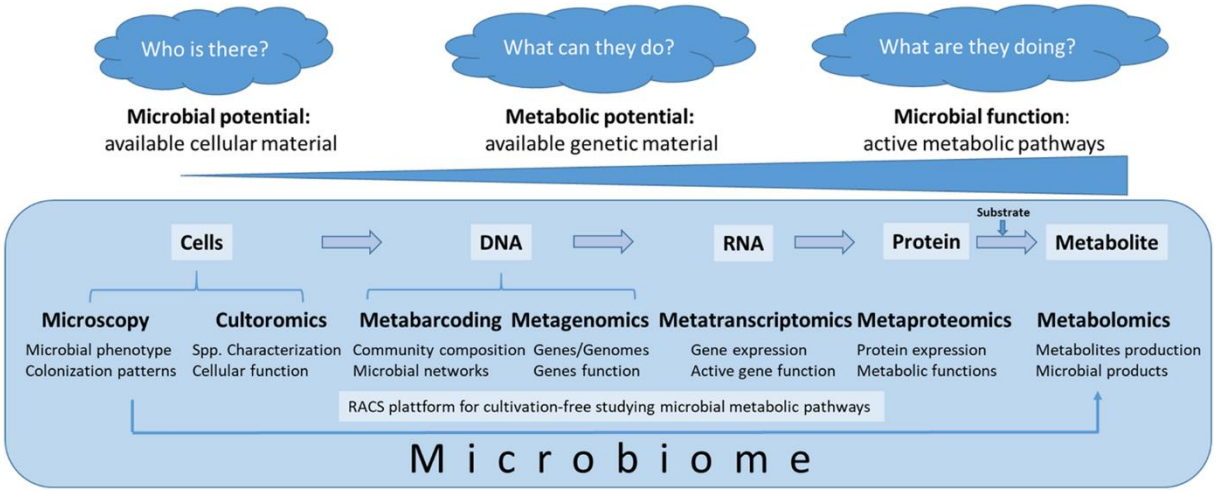


Figure 3. Méthodes pour étudier du fonctionnement du microbiome, extrait de Berg et al. (2020). L'ensemble de ces méthodes offre une vision sur la composition, le potentiel et le fonctionnement du microbiome.

I.3. Impact du microbiote sur les fonctions physiologiques et l'homéostasie de l'hôte

L'importance du concept d'holobionte est devenue de plus en plus évidente à mesure que les études se sont accumulées révélant l'impact du compartiment microbien sur la valeur sélective des hôtes. La nature omniprésente des micro-organismes associés aux hôtes ainsi que leur rôle central dans la biologie, l'écologie et l'évolution de l'holobionte a été étudiée par Simon et al. (2019). Beaucoup d'études ont été menées sur la composition des microbiotes, mais la révolution de la méta-omique a permis de révéler l'importance du microbiote dans de nombreuses fonctions physiologiques et l'homéostasie des organismes (Blaser, 2014; Kostic et al., 2013). Quel est l'impact du microbiote sur l'hôte ? Quels sont les effets phénotypiques qui en résultent ? Ces questions ont fait l'objet de nombreuses études sur le microbiote humain mais aussi chez des modèles expérimentaux, comme la souris, les poissons, ainsi que chez les insectes, les cnidaires et les mollusques. Ceci a permis de fournir des informations essentielles sur la façon dont l'homéostasie est maintenue entre l'hôte et son microbiote (Kostic et al., 2013).

Le microbiote est connu pour influer sur plusieurs traits d'histoire de vie de son hôte qui peuvent être au bénéfice ou au détriment de ce dernier. En général, les effets délétaires se traduisent en

symbioses parasitaires, lorsque les micro-organismes surexploitent les ressources de l'hôte (Figueiredo & Kramer, 2020). En revanche, les effets bénéfiques se traduisent en symbioses mutualistes, lorsque les micro-organismes complètent les capacités de l'hôte à survivre (Figueiredo & Kramer, 2020).

I.3.1 Microbiote et santé (cas des mammifères)

Bon nombre de travaux se sont penchés sur les fonctions jouées par les communautés microbiennes commensales (microbiote) des mammifères. La caractérisation du microbiote humain a permis de mettre en évidence l'extraordinaire diversité spécifique et fonctionnelle de ce compartiment (Qin et al., 2010). Les travaux sur le microbiote du système digestif ont largement vérifié l'hypothèse que le microbiote contribuait à la santé de leurs hôtes (Bevins & Salzman, 2011; Salzman et al., 2010; Sommer & Bäckhed, 2013; Tremaroli & Bäckhed, 2012). Des études menées chez la souris et chez l'homme ont montré le rôle du microbiote intestinal sur le métabolisme de l'hôte en améliorant le rendement énergétique et en modulant les composés alimentaires qui modifient les voies métaboliques de l'hôte (Tremaroli & Bäckhed, 2012). Par exemple, le microbiote intestinal produit des métabolites comme le butyrate qui prévient le développement du diabète auto-immun (Miani et al., 2018). Au-delà des effets métaboliques, il a été démontré que le microbiote commensal peut induire des changements épigénétiques influant le comportement de l'hôte ouvrant un concept d'axe microbiote-intestin-cerveau (Ansari et al., 2020; Krautkramer et al., 2016; Stilling et al., 2014). Le microbiote cutané peut également jouer un rôle de protection. En effet chez l'Homme on retrouve des bactéries commensales de la peau et du nez appartenant au genre *Corynebacterium* qui protègent d'une infection par *Staphylococcus aureus* (Ramsey et al., 2016).

I.3.2. Microbiote et immunité

Cas de mammifères. Les bactéries commensales ont un impact sur l'immunité innée et adaptative de l'hôte par divers mécanismes, notamment la production de molécules immunomodulatrices (Hooper et al. 2012). De nombreuses études ont été menées sur le modèle de la souris, pour mieux comprendre les interconnexions entre le système immunitaire et le microbiote chez les mammifères et notamment l'Homme. Il a été démontré chez l'humain que le développement de cellules T régulatrices est induit par le microbiote intestinal (Harusato & Chassaing, 2018; Honda & Littman, 2016; Smith et al., 2013). La bactérie commensale de l'intestin, *Bacteroides fragilis* libère des vésicules contenant une molécule de signalisation, un polysaccharide capsulaire (PSA), qui induit des cellules T régulatrices, et supprime activement une réponse inflammatoire de son hôte humain (Shen et al., 2012). Les signaux émis par le microbiote intestinal créent des interactions complexes avec les cellules lymphoïdes innées ILC3 qui contribuent à la différenciation des lymphocytes T et B (Honda &

Littman, 2016). Le microbiote influence également la différenciation des cellules immunitaires adaptatives, tant au niveau de l'intestin que de la peau. Par exemple, *Staphylococcus epidermidis* est une bactérie commensale de la peau qui active les cellules immunitaires TH17 (Naik et al., 2012).

Cas des arthropodes. Les fonctions du microbiote ont été assez largement étudiées chez les arthropodes, dont il influence le statut métabolique et immunitaire. Chez la drosophile, la réparation active des tissus joue un rôle central dans la survie suite à une infection (Buchon et al., 2014). Ce processus est activé par le microbiote intestinal qui induit la production de la cytokine Upd3 capable de réguler positivement le renouvellement de l'épithélium de l'intestin par la prolifération et la différenciation de cellules souches (Buchon et al., 2014). D'autres études suggèrent que les bactéries intestinales peuvent avoir une incidence sur les taux d'insuline chez la drosophile et par conséquent affecter la réponse inflammatoire (Keith et al., 2021; Meng et al., 2022; Shin et al., 2011). De plus, l'insuline joue un rôle dans l'homéostasie métabolique, la résistance au stress, la fécondité, et la durée de vie mais aussi sur la réponse inflammatoire (Buchon et al., 2014). Il a été montré chez quatre espèces différentes de crevette que certains métabolites microbiens sont responsables du maintien de l'homéostasie immunitaire après une infection virale (Zhang & Sun, 2022).

Les microbiotes résidents ne se contentent pas seulement de façonner ou activer le système immunitaire de l'hôte, notion nommée « Indirect, Host-Mediated Protection », ils peuvent également contribuer à une protection directe de l'hôte contre les agents pathogènes et les maladies infectieuses (Chiu et al., 2017). Cette protection par le microbiote résident agit sur la colonisation, l'établissement, la croissance et sur les effets néfastes de l'agent pathogène (Chiu et al., 2017). Le microbiote est protecteur et capable d'inhiber les pathogènes par (i) la libération de molécule antimicrobiennes telles que des bactériocines (Schamberger & Diez-Gonzalez, 2002), (ii) la sécrétion d'effecteurs dépendant du contact (Chatzidaki-Livanis et al., 2016), (iii) la mise en compétition pour des ressources (nutriments, métaux, sites d'adhésions) (Deriu et al., 2013) ou encore (iv) en construisant un environnement hostile aux pathogènes, par exemple en abaissant le pH (Shu et al., 2013). On parle ici de co-immunité où l'hôte est protégé à la fois par son système immunitaire mais aussi par les composants de son microbiote (Chiu et al., 2017).

I.3.3. Dysbiose

Les effets bénéfiques des microbiotes sur la biologie de leurs hôtes indiquent qu'ils ont évolué en intégrant la présence microbienne ainsi que leurs métabolites dans leur propre fonctionnement. Par conséquent, un dérèglement de l'équilibre du microbiote peut accroître leur susceptibilité aux maladies. Fait intéressant, c'est l'étude de certaines maladies qui a permis de révéler et d'identifier l'implication et la fonction du microbiote en situation d'homéostasie.

Le terme dysbiose désigne ainsi le déséquilibre de l'écosystème bactérien présent chez l'hôte. La dysbiose peut être causée par de très nombreux facteurs : la génétique de l'hôte (Levy et al., 2017), l'alimentation (Maes et al., 2016), un statut immunité affaibli, les médicaments ingérés, et le microbiote lui-même (Maes et al., 2016; Petersen & Round, 2014; Round & Mazmanian, 2009). La caractérisation des changements qui conduisent à la dysbiose et l'identification des taxons microbiens contribuant aux effets pathologiques sont des conditions essentielles pour mieux comprendre l'impact du microbiote en contexte sain et pathologique.

Cas des mammifères. La dysbiose intestinale est le déséquilibre microbien qui a été le plus étudié. Les conséquences de la dysbiose sont multiples (Figure 4) :

- Des troubles digestifs tels qu'entre autre la constipation, la diarrhée, les douleurs abdominales, les ballonnements (Chong et al., 2019) ;
- Des troubles immunitaires qui se caractérisent par un développement microbien anormal pendant la maturation du système immunitaire inné. Ceci induit des troubles auto-immuns et auto-inflammatoires comme les maladies pulmonaires et l'atopie, la polyarthrite rhumatoïde Spondylarthrite ankylosante, le diabète de type 2 et des maladies intestinales chroniques (Levy et al., 2017; Maes et al., 2016; Petersen & Round, 2014; Thaiss et al., 2016) ;
- Des troubles métaboliques qui peuvent entraîner du diabète, de l'obésité, la stéatose hépatique non alcoolique, l'athérosclérose mais aussi des cancers (Pascale et al., 2018; Thaiss et al., 2016) ;
- Des troubles psychologiques liés à la modulation de la production de neurotransmetteurs comme la sérotonine, qui joue un rôle important dans la régulation de l'humeur et d'autres fonctions cérébrales (Capuco et al., 2020).

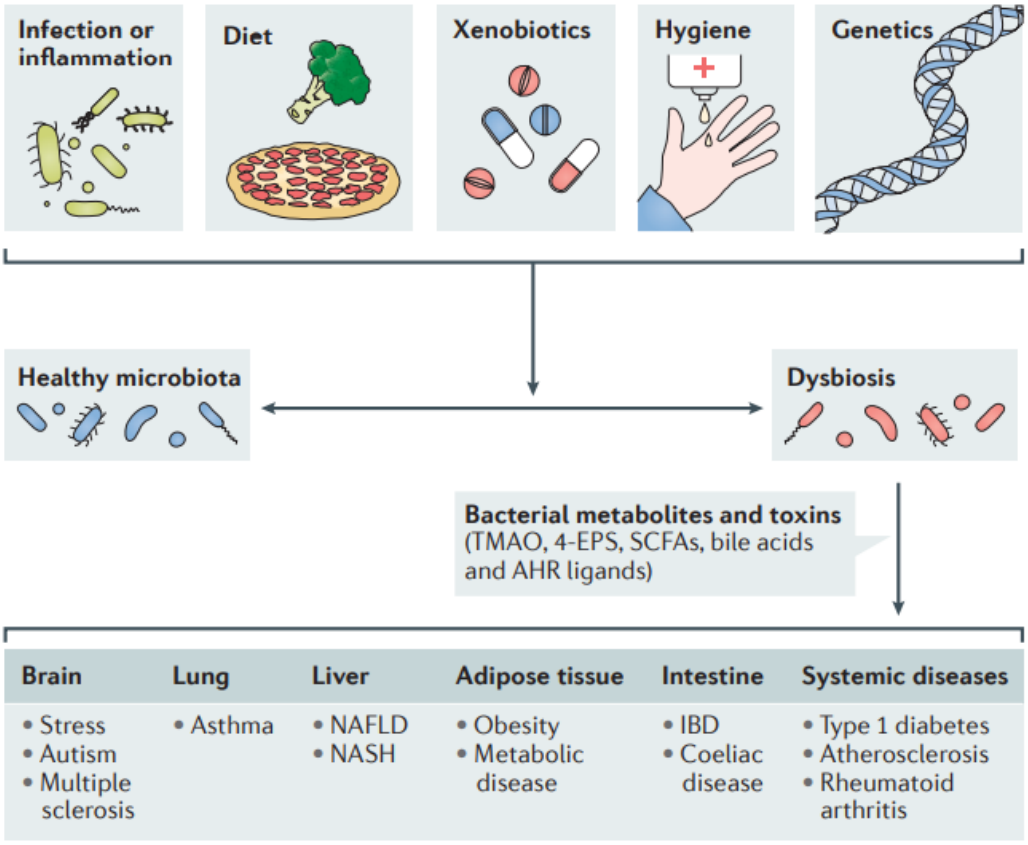


Figure 4. Causes de dysbiose intestinale et développement de maladies. La dysbiose peut être causée par la génétique, l'alimentation, la prise de médicaments, l'hygiène ou encore suite à une infection ou inflammation. Lors de la dysbiose, il peut avoir production de métabolites ou toxines bactériennes qui peuvent engendrer des maladies systémiques comme le diabète de type 1, l'athérosclérose ou encore la polyarthrite rhumatoïde mais aussi des maladies pouvant toucher le cerveau (stress, autisme et scléroses), les poumons (l'asthme), le foie (NAFLD et NASH ou La stéatose hépatique non alcoolique), les tissus adipeux (l'obésité, maladie métabolique) ou encore l'intestin (IBD maladie inflammatoire chronique, maladie cœliaque). Extrait de Levy et al. (2017)

Cas des arthropodes. Le microbiote des arthropodes peut être perturbé par plusieurs facteurs environnementaux. Il a ainsi été observé chez *Drosophila suzukii* que le régime alimentaire modifie son microbiote, et que ces changements persistent pendant plus d'une génération (Jiménez-Padilla et al., 2020). Chez les crustacés, la salinité de l'eau de mer altère le microbiote intestinal de la crevette blanche, *Litopenaeus vannamei* (Cao et al., 2020).

Cas des mollusques. Le microbiote des mollusques peut être déstabilisé par la localisation géographique, les saisons et par la génétique. Cela a été observé chez l'huître de roche de Sydney *Saccostrea glomerata* (Nguyen et al., 2020). En outre, chez l'huître creuse *Crassostrea gigas,* le microbiote peut être déstabilisé suite à l'infection par un pathogène, comme c'est le cas avec le virus OsHV-1 (de Lorgeril et al., 2018; Lucasson et al., 2020), ou encore par une variation de température (Lokmer & Mathias Wegner, 2015).

D'une manière plus globale, quel que soit l'organisme étudié (invertébré ou vertébré), les recherches actuelles se concentrent sur l'identification et la compréhension des facteurs qui influencent la composition des microbiotes, afin d'évaluer l'impact que ces facteurs peuvent avoir sur la santé et le bien-être de l'individu.

I.4. Conséquences sur les capacités d'adaptation

Les perturbations des associations entre un hôte et son microbiote pourraient affecter la capacité d'acclimatation et en conséquence la valeur sélective de l'assemblage d'espèces. Les études actuelles font émerger des exemples d'observation de processus continus d'intégration, de transferts horizontaux de gènes. Les génomes bactériens et viraux présentent en effet une importante plasticité, et de nombreux transferts de gènes ont été détectés au niveau du microbiote intestinal (Liu et al., 2012). Des perturbations de la communauté microbienne intestinale (dysbiose) pourraient accélérer son évolution en facilitant les flux de gènes entre les espèces de l'écosystème (Stecher et al., 2013). Ces transferts génétiques horizontaux sont plus structurés par l'habitat et la niche écologique que par la taxonomie microbienne (Polz et al., 2013; Smillie et al., 2011).

Un autre concept nouveau apporté par la théorie de la dysbiose est celui de l'interaction entre des communautés aux capacités d'adaptation rapide (cas du microbiote) et lente (cas des macroorganismes) dont pourraient émerger de nouveaux traits sélectifs et ainsi influer sur l'adaptabilité des espèces, voire leur spéciation (Rosenberg et al., 2007b; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Dans des conditions environnementales stressantes, la communauté symbiotique peut changer rapidement et cette plasticité pourrait jouer un rôle important à la fois dans l'acclimatation et l'évolution des macroorganismes (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

I.5. Rôle du système immunitaire dans la régulation du microbiote

Il est admis que l'interaction microbiote-hôte est une voie à double sens.

Cas des mammifères. Une greffe réciproque de microbiote intestinal a été réalisée entre le poisson zèbre et la souris ce qui a permis de mettre en évidence que l'intestin de l'hôte sculte la communauté transférée pour qu'elle ressemble à la structure initiale de leurs communautés bactériennes (Rawls et al., 2006). L'étude de l'interaction entre l'hôte et le microbiote intestinal a permis de mettre en évidence que, au sein de l'hôte, le microbiote est régulé par divers mécanismes (Figure 5) (Bevins & Salzman, 2011):

- La variation de pH. En effet plusieurs zones du corps ont un pH qui favorise la croissance de certaines bactéries et empêche la croissance d'autres.

- Les enzymes digestives qui décomposent les nutriments pour nourrir le microbiote.
- La muqueuse intestinale qui est la première barrière physique qui sépare le microbiote de l'hôte. Elle est recouverte d'une couche de mucus qui piège les bactéries et les empêche d'adhérer aux cellules épithéliales et en assurent l'étanchéité.
- Le système immunitaire qui joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie en assurant la relation hôte-microbiote de nature mutualiste (Hooper et al., 2012). La notion de façonnage du microbiote par l'immunité des hôtes animaux a été introduite par Nita Salzman et Charles Bevins (Bevins & Salzman, 2011). La réponse innée détecte et élimine les bactéries pathogènes par plusieurs mécanismes et notamment par le biais de la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) à la surface de la muqueuse intestinale et au sein du mucus (Bevins & Salzman, 2011; Hooper et al., 2012; Salzman et al., 2003). La réponse adaptive surveille les interactions entre les bactéries et l'hôte par les lymphocytes T et la production d'anticorps comme les IgA sur la muqueuse intestinale (Bevins & Salzman, 2011). Autrement dit, alors que les bactéries jouent un rôle dans l'activation et de maturation immunitaire, le système immunitaire de l'hôte aide à réguler l'abondance et la composition du microbiote.

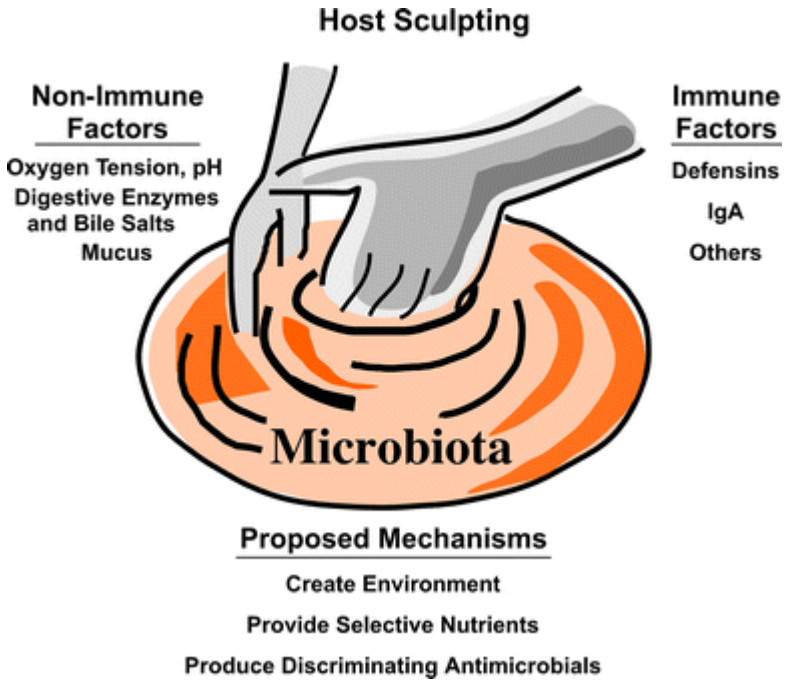


Figure 5. Facteurs et mécanismes influant sur la structuration du microbiote, extrait de (Bevins & Salzman, 2011).

À cet égard/Concernant les fateurs immunitaires, les peptides antimicrobiens (PAMs) de l'hôte peuvent influencer la composition du microbiote. Les PAMs présentent une activité antimicrobienne directe à faibles concentrations contre divers micro-organismes (Harder et al., 2007). Par ailleurs, de nombreux PAMs peuvent également agir comme immunomodulateurs et exercer des activités anti et

pro-inflammatoires (van der Does et al., 2019). Cela suggère que les PAMs ont évolué en tant que régulateurs et façonneurs clés du microbiote, de nombreuses études soutiennent cette hypothèse (Bevins & Salzman, 2011).

Comme décrit précédemment dans l'intestin, l'étude de l'interaction PAMs-microbiote cutané chez les mammifères suggère que les PAMs peuvent influencer le microbiote cutané. Outre la protection de la peau contre les agents pathogènes, ils possèdent comme rôle majeur et ancien dans l'évolution, de contrôler et de façonner le microbiote cutané (Rademacher et al., 2021).

Cas des arthropodes. Chez la crevette *Marsupenaeus japonicus*, Wang et al. (2014) ont montré par interférence de l'ARN (RNAi), l'importance d'une lectine de type C (MjHeCL) dans la limitation du microbiote de l'hémolymphe. Chez *Litopenaeus vannamei,* Lv et al. (2020) montre par invalidation par RNAi d'un gène codant pour un nouveau PAMs appartenant à la famille des Crustines (LvCrustin I-1) que cette Crustine possède une fonction modulatrice de l'homéostasie du microbiote intestinal plutôt qu'une fonction immunitaire d'inhibition directe de la croissance bactérienne des pathogènes (Lv et al., 2020). Pareillement, chez la drosophile, il a été observé que les PAMs ainsi que les lysozymes jouent un rôle direct dans le contrôle de la composition et de l'abondance du microbiome intestinal bénéfique (Marra et al. 2021). Chez le cnidaire *Hydra vulgaris*, les cellules nerveuses sont largement impliquées dans la production de PAMs qui façonnent et contribuent à l'organisation spatiale du microbiote (Augustin et al., 2017; Fraune et al., 2010; Jung et al., 2009). Qui sont ces PAMs dont les propriétés fonctionnelles multiples semblent jouer un rôle important dans la régulation du microbiote.

II. Les peptides antimicrobiens des métazoires

Les organismes multicellulaires (métazoaires), qu'ils appartiennent au règne animal ou végétal possèdent des mécanismes cellulaires et moléculaires de défense contre les agents pathogènes. Ceux-ci reposent sur des barrières physiques, chimiques et microbiologiques ainsi que sur des éléments du système immunitaire innée ou/et adaptatif (Parkin & Cohen, 2001).

Chez les vertébrés, le système immunitaire est traditionnellement divisé en deux composantes: une première ligne de défense qui repose sur le système immunitaire inné et une seconde sur le système immunitaire adaptatif (Parkin & Cohen, 2001). L'immunité innée, non spécifique et immédiate, contribue au contrôle des infections mais aussi du microbiote. La réponse immunitaire innée est basée sur la reconnaissance de composants partagés par les micro-organismes (ou MAMPs pour

« microorganism-associated molecular patterns ») par des récepteurs de reconnaissance spécialisés (ou PRR pour « pathogen recognition receptors »), présents sur les cellules de l'immunité innée (ex. : macrophages, neutrophiles, monocytes, cellules dendritiques), qui activent des cascades de signalisation (par exemple la voie Toll/NF-κB, qui est conservée chez les métazoaires) ou des cascades protéolytiques conduisant à la production d'effecteurs antimicrobiens (Hoffmann et al., 1999). L'immunité innée est l'unique composante sur laquelle reposent les mécanismes de défense des invertébrés, chez qui ces mécanismes sont fortement conservés.

Les vertébrés possèdent en plus de l'immunité innée, une immunité adaptative, plus tardive mais spécifique et durable, qui est médiée par des cellules immunitaires hautement spécialisées comme les lymphocytes B et T responsables de la production d'anticorps par un mécanisme de recombinaison somatique des gènes codant les immunoglobulines et servant de support à la mémoire immunitaire. Les cellules mémoires générées lors de la réponse primaire permettent une réponse immunitaire secondaire beaucoup plus rapide et plus forte lors d'expositions ultérieures au même antigène (mémoire immunologique). Au cours des dernières décennies, des preuves se sont accumulées à partir d'études sur les invertébrés et les vertébrés révélant que le système immunitaire inné pouvait également posséder des propriétés adaptatives (indépendantes de la production d'anticorps), brouillant la distinction stricte entre ces deux bras du système immunitaire. La démonstration expérimentale de l'existence d'une mémoire immunitaire innée (également appelée immunité entraînée ou priming immunitaire) capable de s'adapter à partir d'une expérience passée face à un micro-organisme a maintenant été documentée dans un large éventail d'embranchements d'invertébrés incluant des cnidaires, des mollusques, mais surtout des arthropodes (Criscitiello & de Figueiredo, 2013; Gourbal et al., 2018; Kim et al., 2023; Melillo et al., 2018; Netea et al., 2015). Si les travaux menés ces dernières années chez les vertébrés ont montré que l'immunité entraînée était orchestrée par une reprogrammation métabolique et épigénétique, chez les invertébrés, les bases cellulaires et moléculaires de cette mémoire restent largement moins connues (Lanz-Mendoza & Contreras-Garduño, 2022; Netea et al., 2016). Parmi les effecteurs de l'immunité innée particulièrement conservés au travers du règne vivant on trouve les PAMs qui sont étudiés depuis 40 ans (Bosch & Zasloff, 2021).

Les premiers PAMs de métazoaires ont été découverts dans les années 1980 avec l'isolement de la Cécropine de la chenille du papillon *Hyalophora cecropia* par l'équipe de Hans Boman (Steiner et al., 1981), des Défensines de neutrophiles de mammifères par Michael Selsted (Selsted et al., 1984) et Tomas Ganz (Ganz et al., 1985) dans l'équipe de Robert Lehrer, et des Magainines de la peau de l'amphibien *Xenopus levi* par Michael Zasloff (Zasloff, 1987). Depuis, de nombreux PAMs ont été identifiés chez les plantes, les invertébrés et les vertébrés y compris chez les humains. Il existe

plusieurs bases de données qui regroupe les PAMs, notamment la base de données « Antimicrobial Peptide Database » (APD), crée par Gus Wang il y a tout juste 20 ans et mise à jour en janvier 2023 (Wang et al., 2016). APD référence plus de 3569 PAMs provenant de bactéries, d'archées, de protistes, de champignons, de plantes et d'animaux. La classification des PAMs repose sur divers critères comme leur origine biologique, la machinerie de biosynthèse, l'activité biologique, la séquence en acides aminés, les mécanismes d'actions et leur structure tridimensionnelle (Wang, 2022). Ce rappel bibliographique se focalise sur les défensines, qui ont fait l'objet de très nombreuses études et dont le nom trouve son origine dans leur fonction de défense. Ce nom a été donné à diverses familles de molécules antimicrobiennes aux propriétés physicochimiques proches, notamment les big-défensines d'huître qui font l'objet de mes travaux de thèse.

II. 1. Les défensines

Les défensines constituent la famille de PAMs la plus représentée (Gerdol et al., 2020a). Les défensines sont des peptides cationiques riches en résidus cystéines que l'on retrouve chez les vertébrés et invertébrés, les plantes et les champignons (Hughes, 1999; Schneider et al., 2005). Selon les espèces, les défensines sont produites par différents tissus, notamment des tissus immunitaires mais également les épithéliums de surface, et leur expression peut-être soit constitutive, soit induite par différents stimuli comme des infections, une blessure, des facteurs inflammatoires (Gerdol et al., 2020a).

Les Défensines sont des peptides composés d'environ 20 à 100 acides aminés. Elles ont généralement une charge nette positive dans des conditions physiologiques, conférée par une composition enrichie en acides aminés chargés positivement, tels que l'arginine, la lysine et l'histidine (Kovaleva et al., 2020; Schmidt et al., 2011). Les défensines possèdent également des régions hydrophobes. Cette propriété est conférée par des acides aminés à chaine latérale aliphatique tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, ou aromatique tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine (Schmidt et al., 2011).Les Défensines possèdent des cystéines (minimum 6 et maximum 12), qui sont impliquées dans la formation des ponts disulfures intramoléculaires. La richesse en cystéines des Défensines leur confère un repliement compact qui contribue à leur resistance à la protéolyse (Wiedemann et al., 2020). En résumé, les défensines sont des peptides cationiques de petite taille ayant une certaine hydrophobicité et une stabilité importante conférée par des ponts disulfures intramoléculaires.

Une classification des défensines a été introduite par Thomas Shafee dans l'équipe de Marylin Anderson sur la base de considérations phylogénétiques et structurales (Shafee et al., 2016). Les défensines ont ainsi été classées en deux superfamilles analogues, les cis-défensines et les trans-

défensines. Ces deux superfamilles auraient une origine évolutive indépendante et chacune aurait subi une importante diversification de leur séquence, de leur structure et de leur fonction (Shafee et al., 2017). Néanmoins, les deux superfamilles de défensines semblent avoir subi une évolution structurale convergente vers un repliement en feuillet β à double ou triple brin et fréquemment une hélice α, formant en un noyau compact maintenu par des ponts disulfure (Shafee et al., 2016; Zhou et al., 2019). Les cis-défensines présentent un motifs CSαβ (CSαβ pour cysteine-stabilized αβ motif) et possèdent de six à dix cystéines, tandis que les trans-défensines contiennent six cystéines et ne présentent pas de motif CSαβ (Gerdol et al., 2020a; Tarr, 2016). Les propriétés des cis- et trans-défensines sont différentes, car les deux ponts disulfures analogues pointent dans des directions opposées, se liant à des éléments de structure secondaire différents (Shafee et al., 2017) (Figure 6). Chez les cis-défensines, une caractéristique structurelle essentielle est l'appariement des deux cystéines dans le dernier brin β (côté C-terminal) avec les cystéines de l'hélice α (Figure 6). Chez les trans-défensines, la paire de cystéines dans le dernier brin de feuillet forment des ponts disulfures orientés dans des sens opposés (Figure 6).



Figure 6. Connectivité des ponts disulfures des cis et trans-défensines. (A) Chez les cis-défensines, les ponts disulfures les mieux conservés sont orientés en cis : ils stabilisent le brin β C-terminal sur la même hélice α, formant le motif CSαβ. (B) Chez les trans-défensines les ponts disulfures les mieux conservés sont orientés en trans : ils relient le brin β C-terminal à des éléments de structure secondaire différents. Les α-hélices sont indiquées en rouge, les brins β en bleu et les ponts disulfures en jaune. Les numéros se réfèrent à l'ordre des cystéines dans la séquence. Adapté de (Shafee et al., 2016).

II.1. 1. Les *cis*-défensines

Les cis-défensines sont largement distribuées dans les règnes fongique, végétal et animal à l'exception des vertébrés (Shafee & Anderson, 2019). Elles présentent une structure 3D organisée en un motif CSαβ (Figure 9). Les cis-défensines contiennent deux liaisons disulfure parallèles qui stabilisent le brin β final en une hélice α (Shafee et al., 2016). Ce motif structural est extrêmement répandu dans le règne animal. Au-delà des cis-défensines, le motif CSαβ est retrouvé également dans de nombreuses toxines issues des venins d'invertébrés (Shafee et al., 2017).

Chez les invertébrés, les cis-défensines les mieux caractérisées sont celles d'arthropodes. Le motif CSαβ est ainsi retrouvé chez les défensines d'insectes à trois ponts disulfure (Shafee et al., 2017) et chez d'autres peptides antimicrobiens d'insectes à quatre ponts disulfure avec comme prototype la Drosomycine (Figure 9), peptide antifongique de drosophile (Fehlbaum et al., 1994). Au-delà des arthropodes, cette superfamille de PAMs est également produite par des mollusques avec par exemple la mytiline (4 ponts disulfures) ou les défensines MGD1 et MGD2 (4 ponts disulfure) chez la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (Mitta, 2000; Mitta et al., 1999; Yang et al., 2000).

Les cis-défensines de plantes ont été découvertes en 1990, elles sont produites par un grand nombre de plantes comme par exemple les peptides *Na*D1 (Figure 9) (4 ponts disulfures) produites par le tabac *Nicotania alata* (Parisi et al., 2019) ou *Rs*AFP1 et 2 (4 ponts disulfures) isolées du radis *Raphanus sativus* (Terras et al., 1992), qui présentent de fortes similarités structurales avec la Drosomycine (Landon et al., 2000).

Certains champignons produisent également des cis-défensines, c'est le cas par exemple de la Plectasine (Figure 9) (3 ponts disulfures) produite par l'ascomycète saprophyte *Pseudoplectania nigrella*, qui est structurellement très similaire à la défensine de moule MGD-1 (Mygind et al., 2005) et à celle de l'odonate *Aeschna cyanea* (Bulet et al., 1992).

II.1. 2. Les *trans*-défensines

Contrairement à l'origine diversifiée des cis-défensines, les trans-défensines n'ont été retrouvées à ce jour que dans le règne animal (Gerdol et al., 2020a). Les trans-défensines partagent une structure conformationnelle composée de trois brins β anti-parallèles stabilisés par trois ponts disulfure intramoléculaires qui n'incluent pas systématiquement d'hélice (Figure 9) (Gerdol et al., 2020a).

Sur la base de la disposition des six résidus cystéine conservés (aussi appelée le motif cystéine), de la connexion des ponts disulfures, et de leurs structures 3D, les trans-défensines sont subdivisées en différentes familles : les α-défensines, β-défensines et les big-défensines (Figure 9).

II.1.2. a. Les α-défensines

C'est en 1984 que les premières α-défensines ont été décrites. Elles ont d'abord été isolées à partir de granulocytes de lapin (NP-1 et 2, pour neutrophil peptides 1 et 2) (Selsted et al., 1984). Depuis elles ont été identifiées dans les polynucléaires neutrophiles de différents vertébrés comme l'homme (HNPs, pour human neutrophil peptides) (Lehrer et al., 1993), le macaque ROAD-1 (Vasudevan et al., 2008), ou encore le cobaye (GPNP1, pour Guinea Pig Neutrophil Defensin-1) (Selsted et al., 1984). Ultérieurement, des α-défensines ont été identifiées au sein des granules des cellules de Paneth, à la

base des cryptes de l'intestin grêle. On peut citer pour exemple chez l'homme les défensines HD-5 (Figure 9) et HD-6 (pour human defensin-5 et -6) (Lehrer & Lu, 2012) et les cryptines de rongeurs comme par exemple la cryptdine 4 (Crp4) du rat (Jing et al., 2004).

Les α-défensines sont composées de 29 à 36 acides aminés; elles possèdent six cystéines et s'organisent en un corps central composé de feuillets β à triples brins anti-parallèles stabilisés par 3 ponts disulfure d'après le réseau de ponts disulfure dont la connectivité est la suivante : Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 et Cys3-Cys5 (Figure 6 et Figure 9) (Chairatana & Nolan, 2017; Gerdol et al., 2020a; Xu & Lu, 2020). En général, les α-défensines sont dotées d'activités bactéricides à large spectre (Hwang & Vogel, 1998; Ouellette, 2015).

II.1.2. b. Les β-défensines

Les β-défensines globalement plus longues que les α-défensines sont composées d'environ 35-50 acides aminés et contiennent trois liaisons disulfure intramoléculaires appariées en Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 et Cys3-Cys6 (Figure 6 et Figure ***9***) (Gerdol et al., 2020a; Klüver et al., 2005; Lehrer & Lu, 2012; Y. Q. Tang & Selsted, 1993). Elles sont considérées comme le plus ancien type de défensine de vertébré (Gerdol et al., 2020a). Les β-défensines ont été identifiées chez l'homme, la souris, le rat, les porcs, les bovins, le cheval, les chiens, les chats, et de nombreux oiseaux comme les poulets, le manchot, les dindes, les canards, les oies (Brogden, 2005; Cobo & Chadee, 2013). Les β-défensines humaines sont sans doute les plus étudiées ; elles sont connues sous le nom de « human β-defensins » (hBDs) (Figure Figure ***9***) (Pazgier et al., 2006). Outre les mammifères et les oiseaux, elles ont également été trouvées chez les amphibiens tels que les grenouilles et les salamandres (Cobo & Chadee, 2013). Les β-défensines ont également été identifiées chez des espèces de poissons téléostéens telles que le poisson zèbre et le poisson rouge mais aussi chez des invertébrés tels que les abeilles et les vers à soie (Cobo & Chadee, 2013). En revanche, des peptides référencés comme des β-défensines-like ont été répertoriés car ils possèdent le réseau de ponts disulfures des β-défensines, mais un nombre d'acide aminé entre les cystéines différent des β-défensines, c'est le cas chez la tortue (Lakshminarayanan et al., 2008), l'ornithorynque (Torres et al., 1999), ainsi que chez les serpents vipéridés et colubridés (Oguiura et al., 2021). La dernière famille de trans-défensines est celle des Big-défensines.

II.1.2. c. Les Big-défensines

Les caractéristiques des Big-défensines sont leur grande taille, comme leurs noms le laisse à penser, avec environ 80 à 100 acides aminés. La famille des Big-défensines présente une distribution taxonomique large mais discontinue. La première Big-défensine, *Tt*-BigDef, a été isolée à partir

d'hémocytes d'un arthropode : la limule *Tachypleus tridentatus* (Figure 7) (Saito et al., 1995). Elles ont depuis été découvertes chez de nombreux mollusques chez qui cette famille s'est énormément diversifiée. On retrouve ainsi les Big-defensines dans une variété d'organismes, notamment les limules, les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques, mais aussi les amphioxus (Gerdol et al., 2020a). La distribution phylogénétique des big-défensines suggère que ces séquences dérivent d'un gène ancestral déjà présent chez le dernier ancêtre commun de tous les métazoaires bilatériens avant le processus de spéciation qui a donné naissance aux protostomes et aux deutérostomes (Gerdol et al., 2020a).

La grande taille des Big-défensines résulte de la présence d'un domaine N-terminal hydrophobe qui adopte un repliement en β1-α1-α2-β2 et qui est important pour la stabilité et la fonction de ces PAMs (Gerdol et al., 2020a). Les Big-défensines sont composées de deux domaines structuraux différents, un domaine N-terminal hydrophobe et un domaine C-terminal cationique β-défensine-like contenant 6 résidus cystéine appariés comme dans les β-défensines Cys1-Cys5, Cys2-Cys4 et Cys3-Cys6 ; les deux domaines sont liés par une région flexible ou « linker » (Figure 7 et Figure 8) (Gerdol et al., 2020a; Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019; Rosa et al., 2011). Les Big-défensines sont considérées comme les ancêtres des β-défensines (Shafee et al., 2017; Zhu & Gao, 2013). Leur domaine N-terminal aurait ainsi été perdu au cours de l'évolution (Gerdol et al., 2020a).

Les Big-défensines présentent des schémas d'expression très différents selon le tissus ainsi qu'un éventail de gènes intrinsèques dans une même espèce (Figure 8) (Gerdol et al., 2020a; Rosa et al., 2015). Par exemple, chez les Big-défensines de l'huître *Crassostrea gigas* qui se sont diversifiées (Figure 8) par duplication des gènes et remaniement des domaines, les gènes codant *Cg*-BigDef1 (Figure 9) et *Cg*-BigDef2 sont exprimés en réponse à un stimulus bactérien alors que le gène codant *Cg*-BigDef3 s'exprime de manière constitutive, par contre tous sont exprimés au sein des hémocytes (Gerdol et al., 2020a; Rosa et al., 2011, 2015). Il a été démontré que l'unique big-défensine de la coquille Saint-Jacques *Argopecten purpuratus* ApBD1 est produite par les hémocytes, mais également par les branchies, la glande digestive et le manteau (Gerdol et al., 2020a; Muñoz et al., 2019).

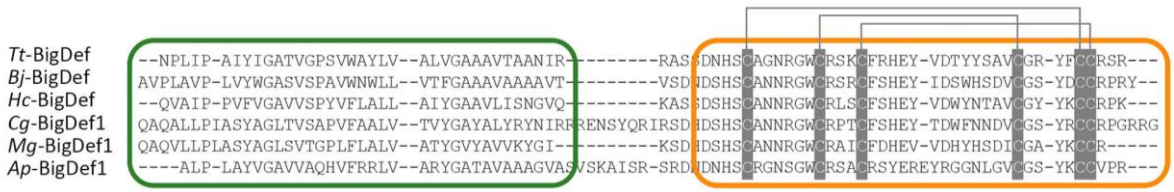


Figure 7. Alignement des séquences d'acides aminés de certaines Big défensines. Les domaines hydrophobes (cadre vert) et de type β-défensine (cadre orange) sont indiqués relié par la region flexible appelé linker. L'appariement des cystéines est indiqué par des lignes grises. *Tt*-BigDef de la limule *Tachypleus tridentatus*

(GenBank : P80957) ; *Bj*-BigDef du poisson *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (GenBank : AAO18674), *Hc*-BigDef de l'huître perlière *Hyriopsis cumingii* (GenBank : AEP26934), *Cg*-BigDef1 de l'huître *Crassostrea gigas* (GenBank : JF703138), *Mg*-BigDef1 de la moule *Mytilus galloprovincialis* (GenBank : CCC15007) et *Ap*-BigDef1 de la coquille Saint-jacques *Argopecten purpuratus* (GenBank : ANK58567). Adapté de Gerdol et al., 2020.

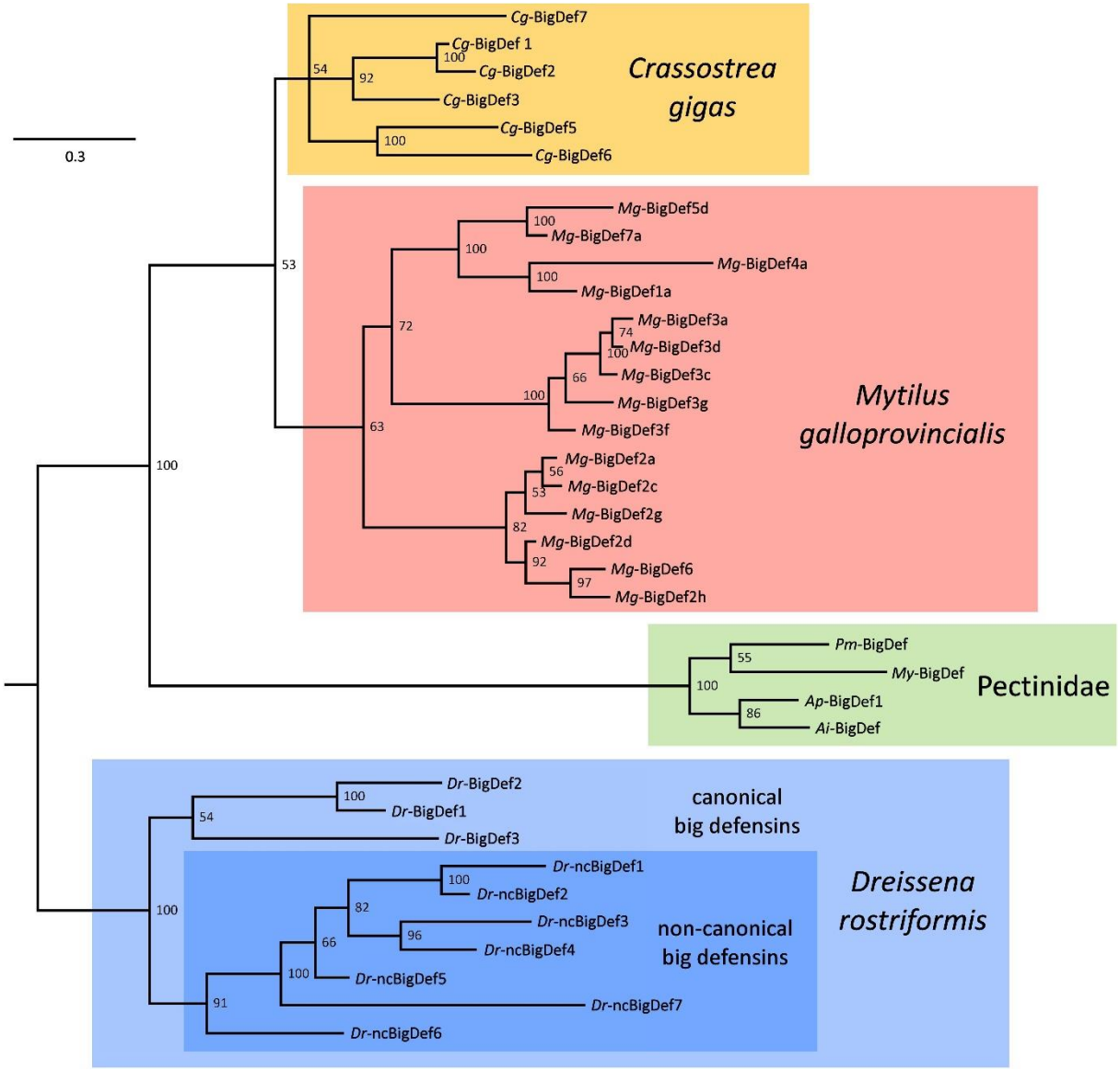


Figure 8. Phylogénie simplifiée des big-défensines de mollusques bivalves. Extrait de (Gerdol et al., 2020).

II.1. 2. Les θ-défensines

Une autre classe de défensines découverte plus tardivement est celle des θ-défensines (synonymes rétrocyclines ou démidéfensines). Ces peptides n'ont été retrouvés que chez certains primates non humains (Conibear & Craik, 2014). Ce sont des peptides cycliques composés de 18 acides aminés. Les θ-défensines ont évolué à partir des gènes des α-défensines il y a environ 40 millions d'années (Conibear & Craik, 2014). La structure des θ-défensines est caractérisée par le motif cyclique en

échelle de cystine (Conibear & Craik, 2014), qui consiste en trois liaisons disulfure et une chaîne polypeptidique fermée de manière covalente (Figure 9) (Ouellette, 2015). La particularité des θ-défensines est qu'elles sont codées par deux gènes distincts (Conibear & Craik, 2014). Le premier peptide cyclique a été découvert lors d'une étude de l'expression des défensines dans les leucocytes du macaque rhésus, *Macaca mulata*, et nommée rhésus θ -défensine 1 (RTD-1) (Figure 9) (Conibear & Craik, 2014).

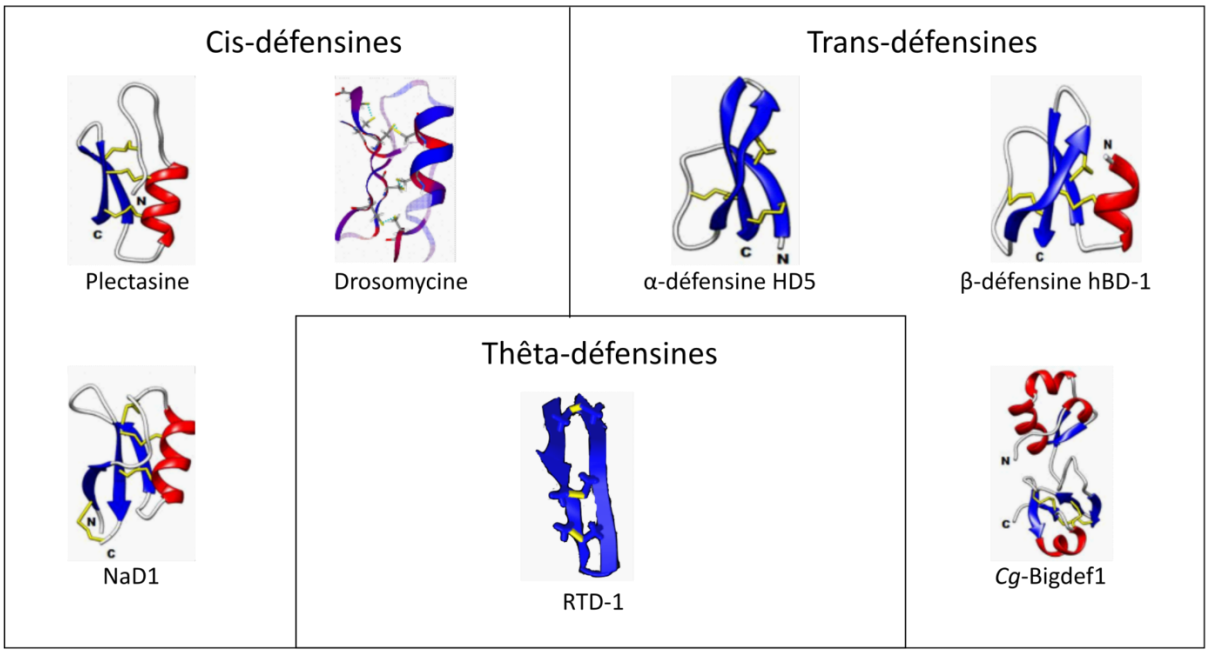


Figure 9. Représentations des structures tridimensionnelles des Défensines. La partie gauche illustre certains membres des familles de cis-défensines : la Plectasine du champignon *Pseudoplectania nigrella* (PDB : 1ZFU), la défensine NaD1 du tabac *Nicotiana alata* (PDB : 1MR4) et la Drosomycine de la drosophile *Drosophila melanogaster* (PDB : 1MYN). La partie droite illustre certains membres des principales familles de trans-défensines : l'α-défensine humaine HD5 (PDB : 2LXZ), la β-défensine humaine hBD-1 (PDB : 1IJV) et la big-défensine de l'huître *Crassostrea gigas* (*Cg*-BigDef1, PDB : 6QBL),. Les thêta-défensines sont illustrées par RTD-1 du macaque rhésus *Macaca mulata* (PDB : 1HVZ). Les numéros de la base de données structurales PDB sont indiqués entre parenthèses, les hélices α sont représentées en rouge, et les brins des feuillets β en bleu, et les ponts disulfures en jaune. N signifie extrémité N-terminale et C représente l'extrémité C-terminal de la molécule.

II.2. La plurifonctionnalité des défensines

II.2. 1 Propriétés antimicrobiennes et mécanismes d'actions

De par leurs propriétés physicochimiques (cationicité, amphipaticité) les défensines ont la capacité intrinsèque d'interagir avec les composants clés de l'enveloppe des cellules bactériennes. Leur charge nette positive à pH physiologique leur permet d'interagir avec les charges négatives de la paroi et des membranes des micro-organismes (Schmidt et al., 2011). Leurs régions hydrophobes et

cationiques leur permettent aussi d'interagir avec les membranes cellulaires négativement chargées. Il est considéré que le caractère amphipathique des défensines joue un rôle majeur dans leurs mécanismes d'actions. Des poids différents ont été donnés aux diverses propriétés physicochimiques des défensines. Ainsi la mutation des résidus arginine par des residus non chargé dans les α- et β-défensines humaines a montré que les résidus chargés jouent un rôle important dans l'activité antibactérienne contre les souches de bactéries à Gram négatif, alors que les résidus hydrophobes jouent un rôle fonctionnel moindre (Lehrer et al., 1989; Lehrer & Lu, 2012). Si les propriétés physicochimiques des défensines sont importantes pour l'interaction avec les cellules bactériennes, il n'en reste pas moins que la plupart de ces peptides n'agissent pas par simple altération de l'intégrité des membranes bactériennes. Leurs mécanismes d'action varient grandement en fonction de leurs structures (Pirtskhalava et al., 2021). Ainsi, bon nombre de défensines trouvent des cibles moléculaires très spécifiques chez les micro-organismes et les tuent en bloquant des processus physiologiques clés, ce qui leur confère une activité antimicrobienne puissante contre un large éventail de bactéries, de champignons et de virus (Gao et al., 2021). Nous présenterons ci-dessous quelques mécanismes d'action emblématiques des défensines (Tableau 1).

- Perméabilisation de la membrane plasmique

Certaines défensines exercent leur activité antimicrobienne en perturbant la membrane cellulaire des micro-organismes cibles. Ainsi il a été montré sur des bactéries vivantes que la défensine (super famille des cis-défensines) de la mouche à viande *Protophormia terranovae* forme des pores qui perméabilisent les membranes lipidiques, ce qui entraîne une perte d'intégrité et la mort de la bactéries à Gram positif *Micrococcus luteus* (Cociancich et al., 1993). Cette perturbation de la membrane est initiée par des interactions électrostatiques entre le peptide chargé positivement et la membrane microbienne chargée négativement. Des interactions hydrophobes interviennent également dans ce processus de mort bactérienne entre les régions hydrophobes des défensines et la bicouche lipidique de la membrane (Tableau 1) (Cociancich et al., 1993).

Toujours dans la superfamille des cis-défensines, la défensine NaD1 du tabac présente des propriétés antifongiques *via* sa capacité à perturber la membranaire de la cellule fongique (Vriens et al., 2014). La cible membranaire de NaD1 est le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), présent dans les membranes des cellules eucaryotes. Il a été démontré que NaD1 forme des oligomères de 14-mers, par l'intermédiaire du PIP2, et que cette oligomérisation est importante pour la perméabilisation de la membrane et la lyse de la cellule cible (Vriens et al., 2014). Après interaction et perméabilisation de la membrane cellulaire, NaD1 pénètre dans les hyphes fongiques et se localise dans le

cytoplasme, où elle provoque la granulation du cytoplasme et induit la production de ROS. NaD1 induirait la mort cellulaire par le biais du stress oxydatif (Vriens et al., 2014).

- Inhibition de la biosynthèse de la paroi bactérienne par liaison au lipide II

Diverses études ont montré que l'activité contre les germes à Gram positif de plusieurs défensines reposait sur leur capacité à inhiber la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne en ciblant spécifiquement un précurseur du peptidoglycane : le lipide II (Tableau 1). C'est le cas notamment pour la plectasine de champignon, les défensines d'huître *Cg*-BigDef1 et 2, qui appartiennent à la superfamille des *cis*-défensines et sont structurellement très proches de la plectasine, et la β défensine humaine hBD-3, qui appartient à la superfamille des *trans*-défensines (de Leeuw et al., 2010; Schmitt et al., 2010; T. Schneider et al., 2010). Chez l'huître, il a été observé que les résidus impliqués dans la liaison avec le lipide II étaient très conservés alors que d'autres résidus diversifiés à la surface des défensines pourraient améliorer les interactions électrostatiques avec les membranes bactériennes (Tableau 1) (Schmitt, Wilmes, Pugnière, et al., 2010). Ce type d'interaction peut induire la libération d'enzymes lytiques qui induisent la mort bactérienne. Ce phénomène a également été observé pour les θ-défensines qui induisent la libération d'enzymes lytiques de la paroi cellulaire, conduisant à la lyse des bactéries à Gram positif du genre *Staphylococcus* (Wilmes et al., 2014).

- Induction de la mort fongique par liaison aux sphingolipides

Un certain nombre de défensines de plantes (superfamille des cis-défensines, antifongiques) interagissent avec les sphingolipides (Tableau 1). Il a ainsi été constaté que la présence de sphingolipides très spécifiques était essentielle pour l'induction de la mort cellulaire des champignons et des levures. En effet, des mutants de levure dépourvus des gènes impliqués dans la biosynthèse des sphingolipides sont résistants à ces peptides. Différentes classes de sphingolipides sont les cibles de ces défensines de plante. Ainsi, la défensine *Rs*AFP2 du radis interagit avec les glucosylcéramides tandis que la défensine *Dm*AMP1 du dahlia interagit avec le mannosyl di-inositolphosphorylceramide. Après interaction avec leur cible, *Rs*AFP2 reste à la surface de la cellule et induit la mort cellulaire par l'induction d'une cascade de signalisation (Vriens et al., 2014). Tout comme les defensine de plante, L'ETD151, une défensine antifongique d'insecte (optimisé à partir de l'héliomicine, une défensine isolée chez le papillon *Heliothis virescens*), est un peptide exclusivement antifongique qui inhibe la germination des spores et l'élongation des hyphes tout en modifiant la morphologie du champignon en perturbant l'intégrité membranaire (Aumer, 2020). Une approches sphingolipidomique a permis de mettre en evidence le rôle de lipides membranaires appelés glucosylcéramides dans l'activité du peptide ETD151 (Aumer, 2020).

- Piégeage des bactéries par formation de nanonets

L'activité des défensines ne résulte pas toujours par la mort des bactéries. En effet, l'α-défensine humaine HD6 (superfamille des trans-défensines) possède une faible activité bactéricide et membranolytique *in vitro*. Cependant, chez la souris, la HD6 prévient de l'infection par *Salmonella* en formant un auto-assemblage supramoléculaire appelée nanonets qui piège les bactéries et prévient l'infection bactérienne sans pour autant tuer les bactéries (Tableau 1) (Chairatana & Nolan, 2014, 2017; Chu et al., 2012; Ericksen et al., 2005). Un tel mécanisme de piégeage par formation de nanonets a également été montre pour la big-défensine d'huître *Cg*-BigDef1 qui piège et tue différentes souches bactériennes comme par exemple *Staphylococcus aureus* (Figure 10) (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019).

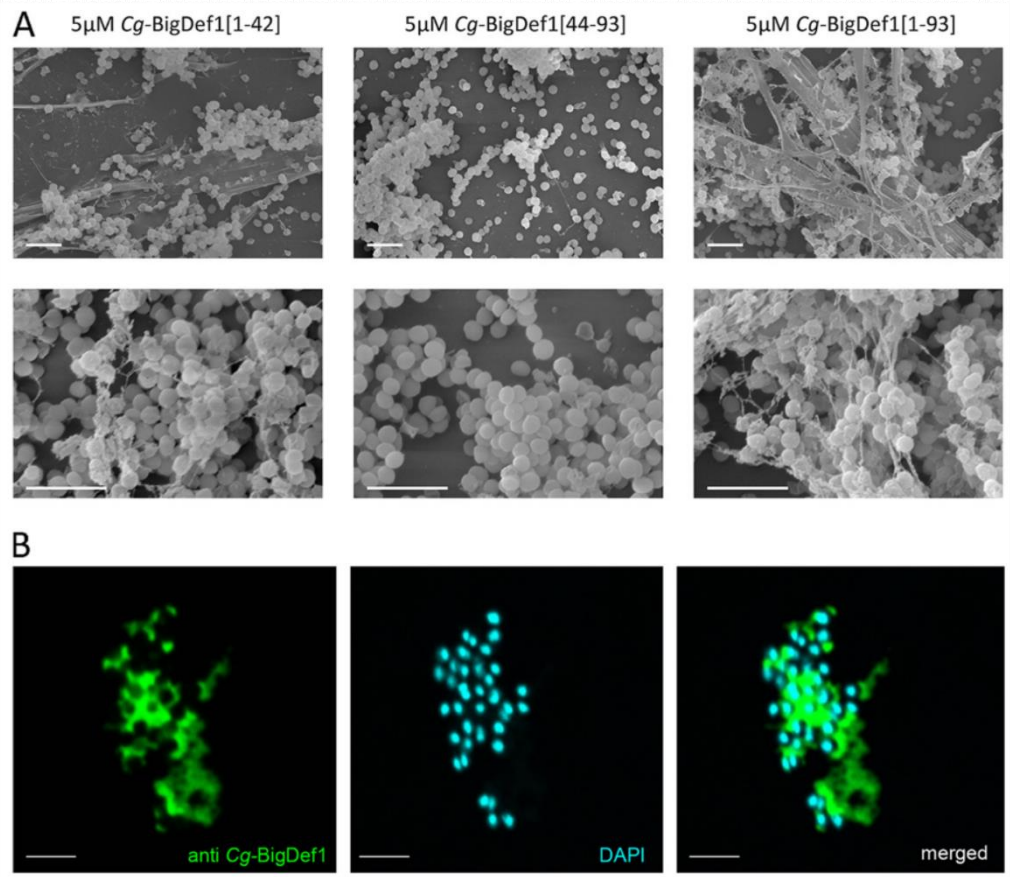


Figure 10. Observation des nanonets formés par *Cg*-BigDef1 en contact de *S. aureus* SG551. (A) Observation au Microscope électronique à balayage des nanonets du peptide de synthèses *Cg*-BigDef1 [1-93], de son domaine N-terminal *Cg*-BigDef1[1-42] et de son domaine C-terminal Cg-BigDef1[44-93] à 5µM en contact avec *S. aureus* SG511. (B) Observation au microscopie confocale à l'aide d'anticorps dirigés contre *Cg*-BigDef1 en contact avec *S. aureus* SG511. Les images de microscopie confocale ont été acquises après 30 minutes de contact entre les bactéries et les peptides. L'ADN a été coloré avec du DAPI (bleu), et *Cg*-BigDef1 a été coloré avec des anticorps polyclonaux (anti-*Cg*-BigDef1) révélés par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 488 (vert). Les barres d'échelle représentent 3 µm. Extrait de (Loth *et al.,* 2019).

- Activité antivirale

De nombreux travaux ont démontré que les α- et β-défensines présentaient également des activités antivirales sur des virus nus ou enveloppés (Tableau 1). Ceci fait intervenir différents mécanismes. La liaison aux virus, telle qu'observée entre les défensines NP-1 et NP-2 du lapin et le virus enveloppé *Herpes simplex* de type 1 HSV-1 (Lehrer et al., 1985), peut induire une agrégation extracellulaire (Gounder et al., 2012), bloquer la reconnaissance des virus par les récepteurs membranaires de leurs cellules cibles (Hazrati et al., 2006), inhiber la fusion virale avec les bicouches lipidiques de la cellule (Smith & Nemerow, 2008) ou encore les neutraliser après l'entrée du virus dans la cellule (Hazrati et al., 2006).

Plus récemment, La θ défensine a montré une puissante activité contre le virus de l'immunodéficience humaine VIH (Gupta et al., 2013). Il a aussi été démontré qu'elle inhibe l'infection par les flavivirus comme le virus Zika et l'encéphalite japonaise (JEV). Elle exerce un effet inhibiteur sur les étapes d'entrée du virus en ciblant la protéine virale qui permet la liaison à la cellule (Tableau 1) (Jia et al., 2021).

Tableau 1. Synthèse de l'expression, des mécanismes d'action, activités et fonctions des défensines sélectionnées dans la littérature.

Super famille	**Famille**	**Variant**	**Espèces**	**Tissus**	**Expression**	**Mécanismes d'action antimicrobien**	**Activité antimicrobienne**	**Fonction**	**références**
Trans-défensine	α-défensines	HD5	*Homo sapiens*	Cellules de Paneth	inductible	interagit avec la toxine B de *Clostridium difficile*	*Clostridium difficile*	antitoxine	Giesemann et al., 2008
						stabilisation de la capside et redirection vers le lysosome	Virus non enveloppés	antivirale	Wiens and Smith, 2017
						liaison à la membrane bactérienne	Bactéries à Gram négatif	antibactérien	Jung et al. 2017
		HD6	*Homo sapiens*	Cellules de Paneth	inductible	Nanonets		réparation tissulaire	Chu et al., 2012
								régulation du microbiote	Nakamura et al., 2016;
									Chairatana & Nolan, 2014, 2017
		HNP-1	*Homo sapiens*	Neutrophiles	constitutive	Liaison aux récepteurs de chimiokine CXCR1 et CXCR2		chimiotactisme	Yang et al 1999
								immunomodulation	
						Perméabilisation de la membrane	Bactéries à Gram négatif	antibactérien	Lehrer et'al., 1989

							Bactéries à Gram positif		
		ROAD-1	*Macaca mulatta*	Neutrophiles	nd	Perméabilisation de la membrane	Gram-positive, Gram-négative, virus et champignons	antimicrobien	(Vasudevan et al., 2008)
		GPNP1	*Cavia porcellus*	Neutrophiles	nd	nd	Gram-positive, Gram-négative, virus et champignons	antimicrobien	(Selsted et al., 1984).
		Crp4	*Rattus rattus*	Cellules de Paneth	nd	nd	Gram-positive, Gram-négative, virus et champignons	antimicrobien	(Jing et al., 2004).
	β-défensines	DefBD29	*Mus musculus*	Epithélium	inductible	Liaison aux récepteurs de chimiokine CCR6 et coopère avec Vegf-A		chimiotactisme / vasculogenèse	Conejo-Garcia et al., 2004
		HBD-3	*Homo sapiens*	Epithélium	inductible	Liaison aux récepteurs de chimiokine CCR6		immunomodulation	Wu et al. 2003
						perméabilise les cellules tumorales		antitumorale	Phan et al., 2016
						induit des protéines de remodelage tissulaire	Gram-positive, Gram-negative, virus et champignons	antivirale	Sun et al. 2005
						liaison au lipide II		antibactérien	Dhople et al. 2006
						inhibe l'expression des gènes responsable de la formation du biofilm		antibiofilm	Zhu et al. 2013
		HBD-1	*Homo sapiens*	Epithélium	constitutive	perméabilisation de la membrane (pore-forming)	Bactéries à Gram négatif	régulation du microbiote	Jia et al., 2021
							Bactéries à Gram positif		Madhusudhan et al., 2020
							Champignons		Meade & O'Farrelly, 2019
						liaison au récepteur de chimiokine CCR6 et TLR4	Virus	chimiotactisme	Harder et al., 2001
									Jin et al., 2010

						régule l'expression des gènes impliqués dans la progression tumorale et induit l'apoptose		anticancéreux	Sun et al. 2006
	Big défensines	*Cg*-BigDef1	*Crassostrea gigas*	Hémocytes	inductible	Nanonets	Bactéries à Gram négatif	antibactérien	Rosa et al. 2011
							Bactéries à Gram positif		Loth et al. 2020
									Gerdol et al. 2020
		Cg-BigDef3	*Crassostrea gigas*	Hémocytes	constitutive	nd	nd	nd	Rosa et al. 2011
		ApBD1	*Argopecten purpuratus*	Epithélium	inductible	nanonets	Bactéries à Gram négatif	Régulation du microbiote	Stambuk et al. 2020
							Bactéries à Gram positif		González et al., 2020
							Champignons		
cis défensines		Plectasine	*Pseudoplectania nigrella*	Mycélium	nd	liaison au lipide II (peptidoglycane)	Bactéries à Gram positif	antibacterien	Schneider et al 2010
		RsAFP2	*Raphanus sativus*	Graine	nd	liaison aux sphingolipides	Champignons	antifongique	Vriens et al., 2014
		DmAMP1	*Dahlia merckii*	Graine	nd	liaison aux sphingolipides	Champignons	antifongique	Vriens et al., 2014
		C8 ATT	*Arabidopsis thaliana*	nd	nd	liaison au site actif de la protéase		anti-protéasiques	Shafee et al., 2017
									Zhao et al. 2002
		Drosomycine	*Drosophila melanogaster*	Epithélium, corps gras et sécrété dans l'hemolymphe	inductible	liaison et permeabilisation des hyphes	Champignons filamenteux	antifongique	Fehlbaum et al., 1994
									Tian et al., 2008
									Zhang and Zhu, 2009
		NaD1	*Nicotiana alata*	Epithélium	nd	perméabilisation membranaire granulation du cytoplasme et active la production de ROS	Champignons	antifongique	Parisi et al., 2019
									Vriens et al. 2014
Thêta-défensines		rétrocycline	*Macaca mulatta*	Leucocytes	nd	liaisons sur glycoproteines et glycolipides	Virus enveloppés	antivirales	Tang et al 1999
									Jia et al., 2021
									Lehrer, 2004

II.2. 2. Autres propriétés des défensines

Historiquement les PAMs ont été nommés ainsi pour leurs propriétés antibactériennes mais par le développement de nouveaux tests de criblage il s'est avéré au fil du temps que ces peptides présentaient d'autres fonctionnalités. De nombreux travaux ont montré que leurs fonctions sont en fait multiples, les PAMs peuvent en effet jouer un rôle dans la cicatrisation, le chimiotactisme, l'inhibition de canaux ioniques et de protéases, ou présenter des propriétés antibiofilm, antiendotoxines, antitoxines, antiparasitaires, anticancéreuses, antidiabétiques, antiinflammatoires, spermicides, insecticides, antioxydantes (G. Wang et al., 2016; Q.-Y. Zhang et al., 2021). Alors que les fonctions immunomodulatrices des PAMs commençaient à être découvertes, Robert Hancock a proposé de renommer les PAMs en peptides de la défense de l'hôte (HDP, pour Host Defense Peptides et IDR peptides pour innate defense regulator) afin de mieux affirmer la diversité de leurs fonctions (Figure 11 ; Tableau 1). Parmi les HDPs, les défensines ne font pas exception : elles présentent des fonctions diverses et polyvalentes à la fois dans la défense de l'hôte et l'immunomodulation (Fruitwala et al., 2019).

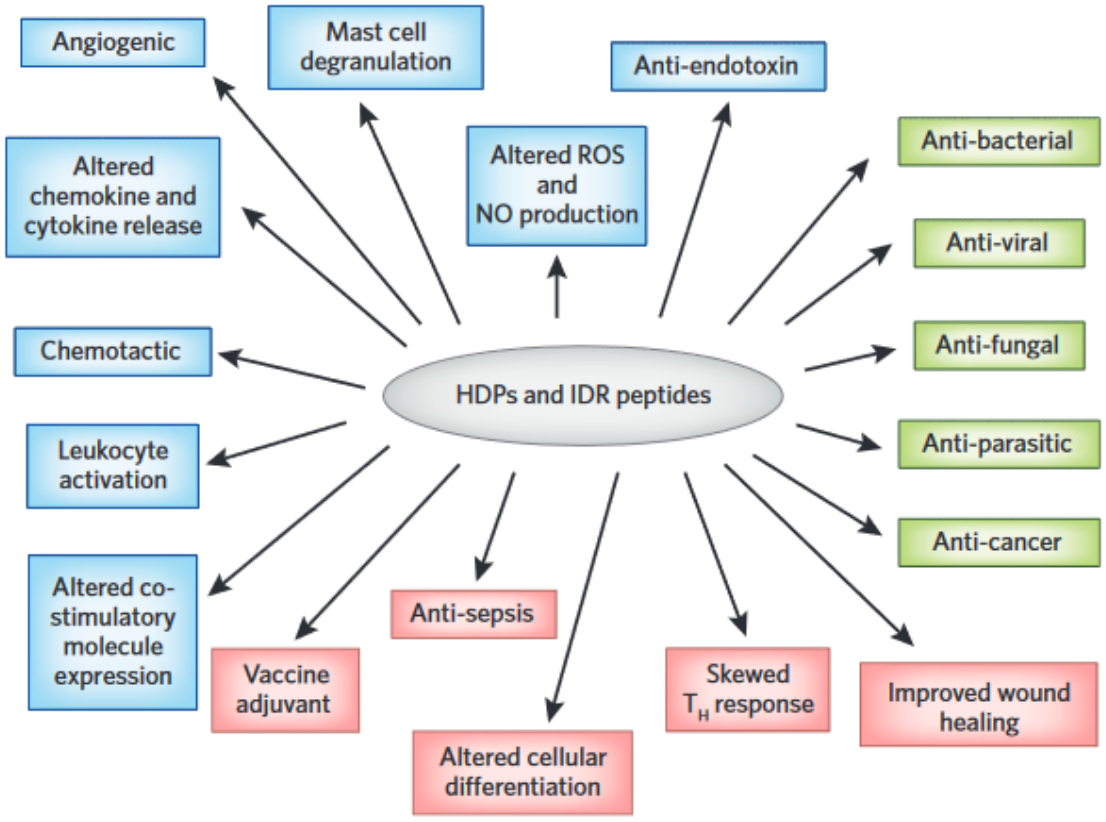


Figure 11. Vue d'ensemble des activités biologiques des HDP et des peptides immunomodulateurs (innate defense regulator, IDR). Les activités cytotoxiques directes sont indiquées en vert, les propriétés immunomodulatrices directes sont indiquées en bleu et les propriétés immunomodulatrices indirectes qui sont une conséquence des propriétés immunomodulatrices directes sont indiquées en rose. ROS, espèces réactives de l'oxygène ; NO, oxyde nitrique. Extrait de (Hilchie *et al.*, 2013).

- Activités immunomodulatrices

En plus de leurs activités antimicrobiennes, certaines les défensines possèdent des fonctions immunomodulatrices telles que le chimiotactisme, la production de cytokines, la cicatrisation des plaies, la stimulation de l'angiogenèse, et la modulation de la réponse immunitaire adaptative et innée (Figure 11 ; Tableau 1) (Ganz, 2003; Hilchie et al., 2013; D. Yang et al., 1999). C'est le cas des β-défensines humaines hBD-1 et hBD-2, qui attirent les lymphocytes T à mémoire et les cellules dendritiques immatures ; leur activité chimio-attractante pourrait être due à la liaison de la défensine au récepteur de chimiokine CCR6 (Yang et al., 1999). La β-défensine de souris, DefBD29, est impliquée dans la vasculogenèse, elle permet la différenciation des cellules endothéliales à partir des cellules au cours du développement des vaisseaux sanguins, et donc induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Conejo-Garcia et al., 2004). De plus, les défensines NPs et hBDs peuvent également réduire l'inflammation en limitant la réponse immunitaire excessive qui pourrait endommager les tissus sains (Kohlgraf et al., 2010).

- Activités anti-tumorales

Certaines défensines présentent des effets anti-tumoraux directs en perturbant la membrane cellulaire des cellules tumorales et en favorisant leur mort comme démontré pour hBD-3 qui possède un motif oncolytique qui se lie et perméabilise les cellules tumorales (Phan et al., 2016). Mais leurs propriétés antitumorales peuvent aussi résulter d'une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale en recrutant des cellules immunitaires et en stimulant la production de cytokines (Figure 9). C'est ce qui a été observé pour diverse trans-défensines telles que les α défensines humaines HNP-1 à HNP-3, leurs orthologues de lapin NP-1 à NP-3, ainsi que pour la β-défensine hBD-1 et hBD-3 (Shafee et al., 2017).

- Activités anti-protéasiques

Certaines défensines végétales comme VuD1, isolée de graines de niébé *Vigna unguiculata,* une Fabaceae originaire d'Afrique tropicale (Pelegrini et al., 2008) ou encore Slα-1, Slα-1 et Slα-3 purifiées à partir de graines de sorgho (Bloch & Richardson, 1991) sont capables d'inhiber des protéases. Par exemple, certaines cis-défensines comme la cis-défensine C8 d'*Arabidopsis thaliana* et certaines trans-défensines, comprenant des α et θ défensines, ont été décrites comme présentant des propriétés inhibitrices de protéases, en se liant au site actif de la protéase qui est différent du site de liaison du substrat (Shafee et al., 2017). Par exemple, l'inhibiteur de trypsine ATT d'*A.thaliana* utilise comme substrat la cis-défensine C8 pour inhiber de manière compétitive les protéases, telles que la trypsine (Shafee et al., 2017). Plus récemment, un peptide β-défensin-like appellé Hélianthamide

isolée de l'anémone de mer *Stichodactyla helianthus*, a été identifié comme présentant une activité inhibitrice sélective envers l'α-amylase pancréatique humaine (Shafee et al., 2017).

- Régulation du microbiote

Dès 2010, Salzman et collègues ont montré que diverses trans-défensines, notamment HD5 et HD6, jouaient un rôle essentiel dans la régulation de la composition du microbiote bactérien chez les mammifères sans que l'on puisse vraiment dire si cela résulte de leurs propriétés immunodulatrices et/ou antibactériennes (Nakamura et al., 2016; Salzman et al., 2007, 2010). Des changements significatifs ont été observés dans la composition du microbiote intestinal de souris lorsque HD5 était exprimée par des souris transgéniques (Salzman et al, 2010). De même il a été montré que hBD-1 et hBD-2 contrôlaient le dialogue entre l'hôte et le microbiote et maintenaient un équilibre sain et dynamique dans les systèmes muqueux (Jia et al., 2021; Madhusudhan et al., 2020; Meade & O'Farrelly, 2019). Plus récemment, il a été démontré par RNAi que la Big-défensine *Ap*BD1 de la coquille Saint-Jacques exprimée par les hémocytes façonnait le microbiote bactérien de l'hémolymphe de l'hôte. Par conséquent, certaines défensines apparaissent comme des régulateurs du microbiote et des acteurs de l'homéostasie immunitaire (González et al., 2020; Meade & O'Farrelly, 2019; Pütsep et al., 2000; Salzman et al., 2010; Zong et al., 2020).

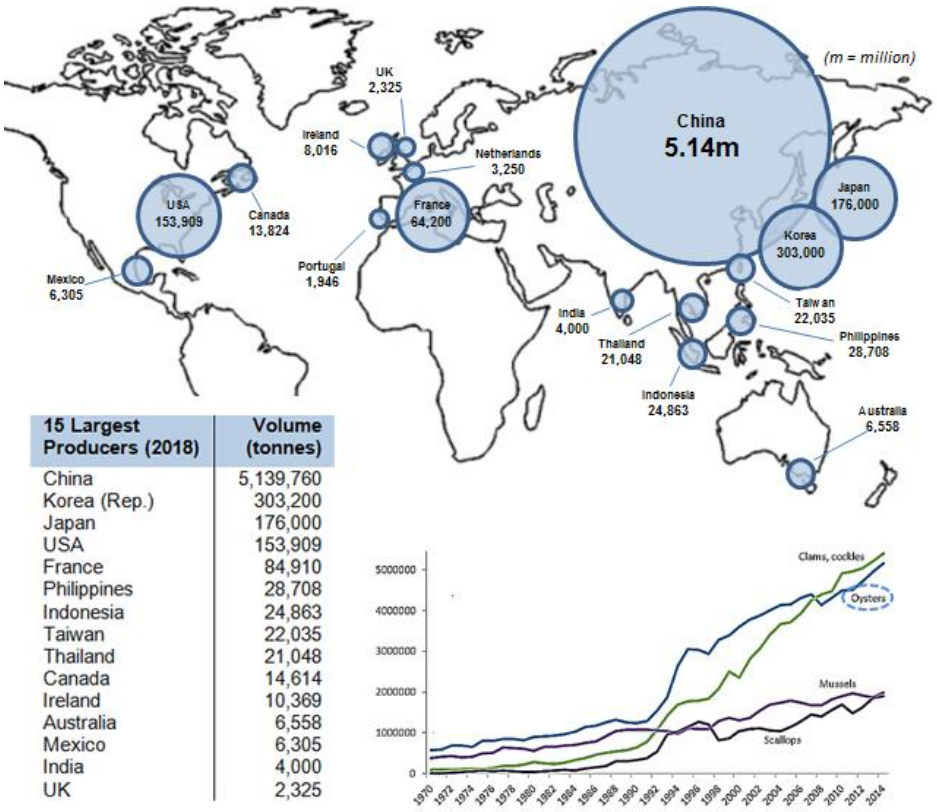
En résumé, les défensines ont des fonctions multiples et importantes dans la défense de l'organisme contre les infections, la régulation de la réponse immunitaire et dans la régulation du microbiote.

III. Modèle biologique : l'huître *Crassostrea gigas*

III. 1. Ostréiculture et importance économique

L'huître creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), aussi renommée *Magallena gigas* (Salvi & Mariottini, 2016), est aussi appelée huître du Pacifique ou huître japonaise. Bien qu'originaire du Japon, *C. gigas* est une espèce rustique qui a été introduite sur tous les continents (Amérique du nord et du sud, Europe, Océanie ou Afrique du Sud) à des fins d'aquaculture. Elle représente aujourd'hui l'espèce d'huître la plus cultivée dans le monde en raison de ses qualités organoleptiques, de ses capacités de croissance rapide et d'une grande tolérance aux conditions environnementales (FAO 2008) (Figure 12). Sa production ne fait qu'augmenter depuis son

introduction dans de nombreux pays avec plus de 640 000 tonnes vendues dans le monde en 2018 (FAO 2018). L'Asie domine largement le marché international, avec pour principaux producteurs la Chine (responsable d'environ 86% de sa production en 2018), la Corée du Sud et le Japon (Figure 12).



15 Largest Producers (2018)	Volume (tonnes)
China	5,139,760
Korea (Rep.)	303,200
Japan	176,000
USA	153,909
France	84,910
Philippines	28,708
Indonesia	24,863
Taiwan	22,035
Thailand	21,048
Canada	14,614
Ireland	10,369
Australia	6,558
Mexico	6,305
India	4,000
UK	2,325

Figure 12. Production globale d'huîtres (toutes espèces confondues) dans le monde. Source : https://www.seafish.org/responsible-sourcing/aquaculture-farming-seafood/species-farmed-in-aquaculture/aquaculture-profiles/oysters/sources-quantities-and-cultivation-methods/

L'huître creuse a été introduite en Europe dans les années 1960 pour reconstituer les stocks d'huîtres après l'éradication de l'huître locale *Crassostrea angulata* par un iridovirus (Renault, 2006). La France est le 5ème producteur d'huîtres (Figure 12) mais surtout le 4ème pays producteur mondial d'huîtres creuses *C. gigas* et le principal producteur, consommateur et exportateur d'huîtres en Europe avec 79 500 tonnes produites en 2020 (FAO, 2020). En France, l'ostréiculture y est pratiquée au sein de 7 régions et bassins ostréicoles principaux: la Normandie, la Bretagne Nord et Sud, la Vendée, la Charente-Maritime, Arcachon, et la Méditerranée. L'élevage se fait en milieu ouvert à partir de naissains produits en écloserie ou issus du captage en milieu naturel (Figure 13). Les pratiques culturales varient en fonction des bassins de production (en surélévation, en suspension, au sol). L'ostréiculture représente une activité économique importante en France, il s'agit de la principale ressource en zone côtière, occupant à elle seule près de 2 654 entreprises et représente un chiffre d'affaire estimé à 508 millions d'euros (CNC, 2020).

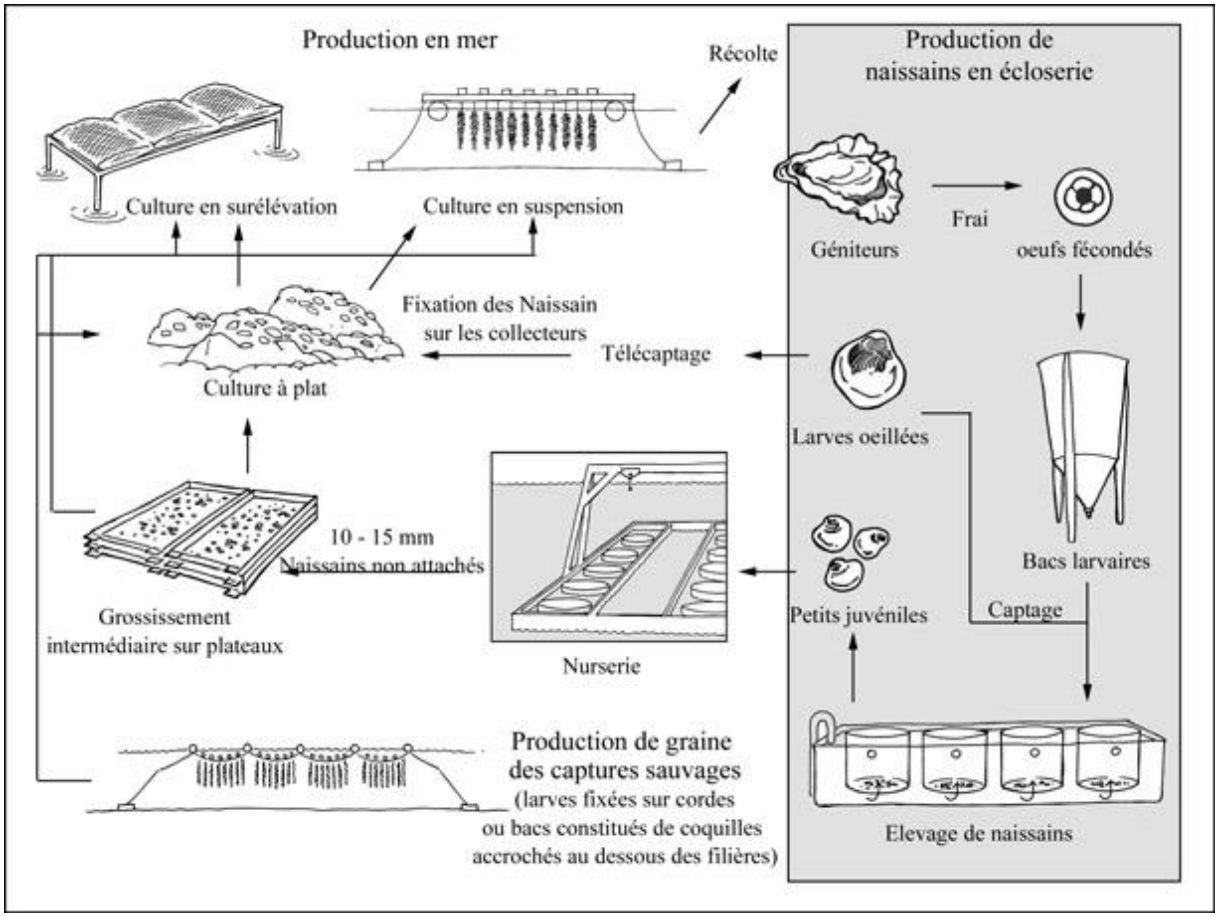


Figure 13. Cycle de production de *Crassostrea gigas* en écloserie pour les naissains et en mer pour les juvéniles jusqu'à obtention d'adultes. *(*FAO*, s. d.)*.

Cependant, l'ostréiculture est une filière confrontée à de nombreux freins et défis. C'est une activité totalement dépendante de son environnement. La qualité des eaux côtières est une composante incontournable de la production ostréicole, étant destinée à l'alimentation humaine. Or la qualité de l'eau peut être dégradée sous l'effet de l'eutrophisation (accumulation de nutriments dans le milieu) et de la pollution chimique et microbiologique qui sont notamment liées à la proximité des côtes et aux apports des bassins versants. Au-delà des entérobactéries, des norovirus (petits virus non enveloppés à ARN simple brin) viennent occasionnellement coloniser les huîtres (Stoppel et al., 2023). A cela viennent s'ajouter des efflorescences d'algues toxiques qui rendent les huîtres également impropres à la consommation (Lassudrie et al., 2020). L'ensemble de ces facteurs qui entrent en compte pour la sécurité des aliments, peuvent conduire à des interdictions de vente qui menacent la profession.

L'environnement conditionne aussi directement la santé des huîtres d'élevage. Les variations de température saisonnières suffisent à déclencher dans les élevages des évènements infectieux de grande ampleur dus à des virus et à des bactéries (cf. chapitre III.4). Des vagues de chaleur viennent par ailleurs détruire localement la production d'huître (De Marco et al., 2023). Ces évènements

extrêmes sont amenés à se répéter dans le contexte du réchauffement climatique. Les élevages sont ainsi soumis à des épizooties récurrentes qui affectent de manière significative la production des huîtres de par le monde (Barbosa Solomieu et al., 2015; Paillard et al., 2004).

III. 2. Biologie de l'huître *Crassostrea gigas*

L'huître est un mollusque bivalve, appartenant à l'ordre des Ostreida, et à la famille des Ostreidae qui comprend plusieurs genres[1]. Le genre *Crassostrea* compte une vingtaine d'espèces comprenant *C. angulata* (huître portugaise), *C. virginica* (huître américaine) et notamment l'espèce qui nous intéresse*, C. gigas* (huître creuse du Pacifique).

Cycle de vie

L'huître *C. gigas* est décrite comme une espèce hermaphrodite asynchrone à tendance protandrique c'est-à-dire successivement mâle puis femelle. Elle présente une maturation déphasée des lignées mâles et femelles et une sexualité alternée (Marteil, 1976). La reproduction est externe et sexuée, les gamètes sont expulsées dans le milieu naturel où se produit la fertilisation (Buroker, 1983; Gerard et al., 1995; Marteil, 1976). La gamétogenèse et l'expulsion de gamètes est dépendante des conditions environnementales, notamment de température et de salinité (Lubet, 1980).

Le cycle de vie de l'huître creuse est composé de deux phases bien distinctes : une phase juvénile et adulte sessile peuplant majoritairement des substrats durs, au niveau des zones littorales, qui succède à une phase larvaire planctonique (Figure 14). Au cours de cette phase planctonique, les larves sont sujettes à d'importantes prédations et mortalités dues à des facteurs biotiques (pathogènes) ou abiotiques (variations environnementales). Le succès reproductif de cette espèce repose sur une importante fécondité, une femelle pouvant produire jusqu'à une centaine de millions d'œufs (Thompson et al., 1996). Certains caractères de développement définissent leur appartenance taxonomique : des caractères tels que le devenir du blastopore qui donnera la bouche et l'anus les classent parmi les protostomiens ; la formation d'une larve trocophore dans les lophotrochozoaires et eutrochozoaires (caractère partagé par les annélides, plathelminthes et mollusques). Après fécondation, l'embryon se divise progressivement jusqu'à la larve nageuse, la larve trochophore (Figure 14) puis se différencie en larve véligère où elle devient strictement planctotrophe, c'est à dire qu'elle se nourrit du phytoplancton. La larve véligère se différencie progressivement en larve pédivéligère qui se fixera au substrat pour ensuite subir une métamorphose où le développement des organes adultes se met en place (Marteil, 1976). Il faut

[1] https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/853681/tab/taxo

typiquement 15 à 24 jours à l'huître pour se développer de la métamorphose, le développement complet jusqu'à la maturité sexuelle.

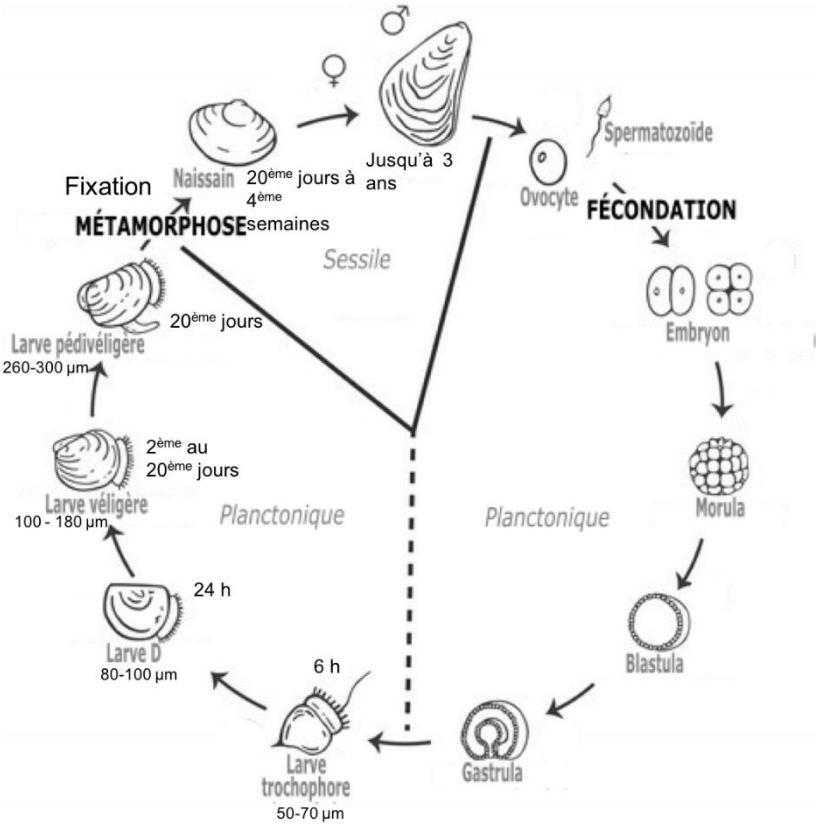


Figure 14. Cycle de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'huître creuse a une première phase de vie planctonique depuis la fécondation, l'étape embryonnaire et juqu'au stade larvaire puis une phase benthique lorsqu'elle devient sessile et qui couvre la période fixation des naissains jusqu'à l'âge adulte. Extrait de (Vogeler et al., 2016).

Anatomie et physiologie

L'huître creuse adulte est constituée d'un corps mou, protégé par une coquille comportant deux valves asymétriques reliées par une charnière dont l'ouverture est régulée par un unique muscle adducteur. Le corps est enveloppé par un tissu appelé le manteau qui assure le développement et la croissance de la coquille et joue également un rôle sensoriel (Figure 15). Pour assurer les fonctions de respiration, de nutrition et d'excrétion de certains déchets, l'huître est munie d'une paire de branchies lamellaires qui s'étendent de l'anus à la bouche. Le système nerveux est réduit et constitué de quelques ganglions. Le système d'excrétion est assuré par un rein constitué d'une glande tubulaire situé au sein d'un sinus rénal. Les huîtres ont un système circulatoire qualifié de semi-ouvert où le fluide circulant (hémolymphe - équivalent du sang des vertébrés) n'est pas confiné aux vaisseaux et au cœur au contraire il peut également s'insinuer librement au sein des tissus et de sinus cœlomiques. Le cœur est composé de deux oreillettes et d'un ventricule qui propulse l'hémolymphe

dans le système circulatoire. L'hémolymphe est un fluide complexe, où circulent les cellules multi-potentes et immunocompétentes que sont les hémocytes, qui héberge un riche microbiote (Bachère et al., 2015; Dupont et al., 2020). L'oxygène est transporté, dissous directement dans l'hémolymphe car dépourvue de pigments respiraroires tels que l'hémoglobine ou l'hémocyanine (Ellerton et al., 1983).

Les huîtres sont des organismes filtreurs microphages, qui sélectionnent la nourriture en fonction de la taille (de 5 à 100 µm). Au critère de la taille, s'ajoute aussi un critère biochimique mais celui-ci reste encore mal compris (Pales Espinosa et al., 2007). Les huîtres se nourrissent généralement de bactéries associées à des particules en suspension et de phytoplancton comme les microalgues. En tant qu'organismes filtreurs sessiles, les huîtres sont en interaction permanente avec leur environnement biotique et abiotique et peuvent influer sur leur propre milieu en participant au dépôt des vases et à la formation d'argile. Les huîtres jouent un rôle important au sein des écosystèmes côtiers et outre leur intérêt aquacole, elles représentent des modèles d'intérêt écologique notamment comme espèce sentinelle pour surveiller la qualité et l'évolution des estuaires (présence de toxines et polluants chimiques, suivi de pathogènes).

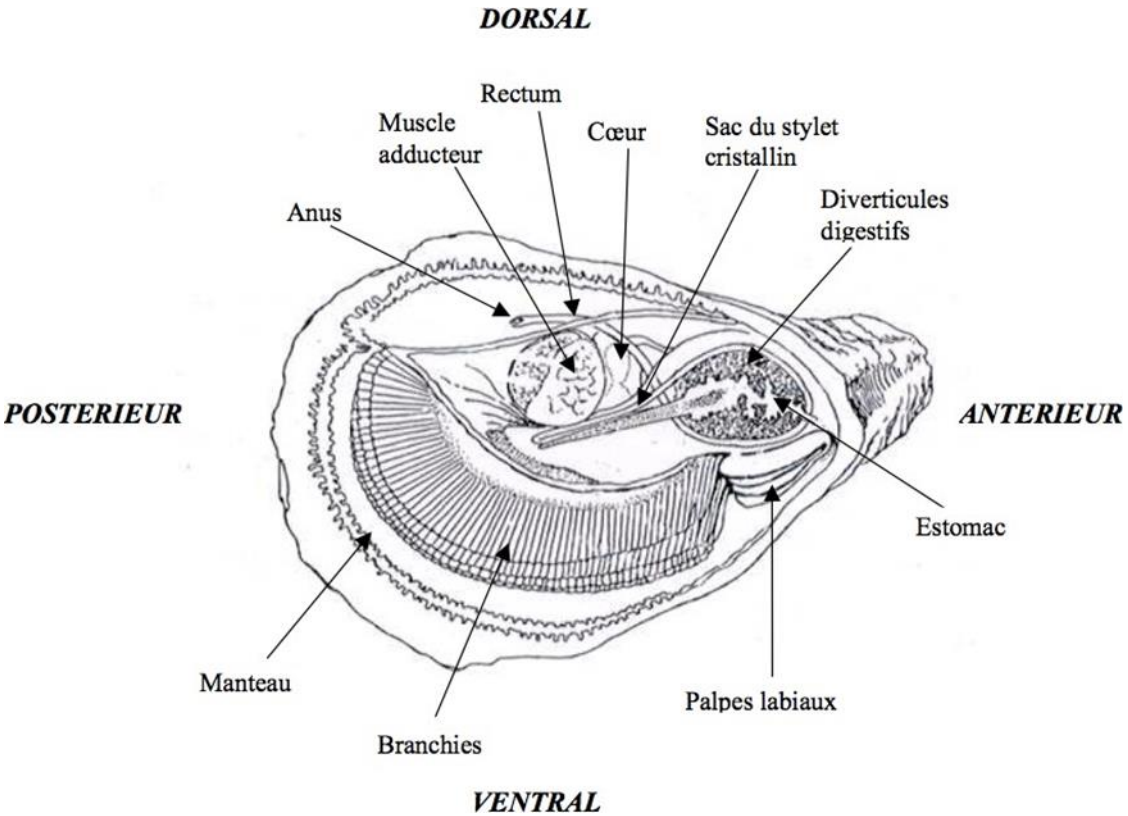


Figure 15. Anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas* d'après Howard & Smith (1983).

III. 3. Caractéristiques génomiques de *C. gigas*

Comme toutes les espèces du genre *Crassostrea*, *C. gigas* est une espèce diploïde et possède un caryotype de 10 chromosomes (Gong et al., 2004). Le génome de *C. gigas* a été entièrement séquencé une première fois en 2012 (Zhang et al., 2012) faisant de cet organisme le premier représentant des mollusques bivalves à avoir été séquencé. L'analyse du séquençage a révélé un génome de 1002 megabases (Mb). Ce génome est très polymorphe et riche en séquences répétées, avec des éléments transposables façonnant encore activement les variations du génome. Un total de 28027 gènes a été prédit codant des protéines de 50 acides aminés ou plus ; 96% des gènes sont exprimés au sein des transcriptomes étudiés (Zhang et al., 2012).

Depuis 2012, de nouvelles données s'accumulent sur le génome de *C. gigas*. Peñaloza et al. ont réalisé un nouvel assemblage du génome de *C. gigas* au niveau des chromosomes avec un scaffold lo de 58,4 Mb et un contig N50 de 1,8 Mb par des données de séquençage à haute couverture, à lecture longue et courte, générées sur les plateformes Pacific Biosciences et Illumina pour générer un assemblage initial, qui a ensuite été structuré en 10 pseudo-chromosomes à l'aide du séquençage Hi-C et d'une carte de liaison à haute densité. Cet assemblage a permis d'identifier environ 30 000 gènes putatifs codant pour des protéines, avec une moyenne de 3,1 transcrits par gène (Peñaloza et al., 2021).

Le séquençage, l'assemblage ainsi que l'étude phylogénique du génome chez d'autres espèces d'huîtres ont aussi été réalisés. C'est notamment le cas, pour l'huître creuse américaine, *C. virginica* (Gómez-Chiarri et al., 2015) ainsi que, l'huître creuse australienne *Saccostrea glomerata* qui est étroitement apparentée au genre *Crassostrea* (Powell et al., 2018). Les transcriptomes et génomes de référence d'autres espèces bivalves ajoutés aux génomes et aux transcriptomes déjà disponibles pour l'huître creuse du Pacifique sont une ressource précieuse pour faire avancer les études comparatives à l'avenir et permettent la découverte de gènes candidats et de marqueurs liés à des traits d'importance commerciale, biologique et écologique, y compris celles liées aux interactions et à l'immunité entre hôte-pathogènes et ainsi accroître les connaissances et les voies d'amélioration de l'élevage (Gómez-Chiarri et al., 2015).

III. 4. Principales maladies touchant *C. gigas*

Comme dans de nombreuses régions du monde, l'ostréiculture française est touchée de façon récurrente par des épizooties pour lesquelles aucun traitement prophylactique ou thérapeutique n'est aujourd'hui disponible (Figure 16). Différents facteurs ont été identifiés au fil des recherches pour expliquer l'augmentation des ces phénomènes de mortalités, des facteurs génétiques,

environnementaux (en particulier la température de l'eau, la salinité ou les polluants) et la présence d'agents pathogènes (Samain & Mccombie, 2007). De nombreuses études révèlent que *C. gigas* peut être affectée par différentes maladies d'étiologies variées, virales, bactériennes, protozoaires ou métazoaires aux effets plus ou moins graves sur la production (Figure 16) (King, Jenkins, Seymour, et al., 2019).

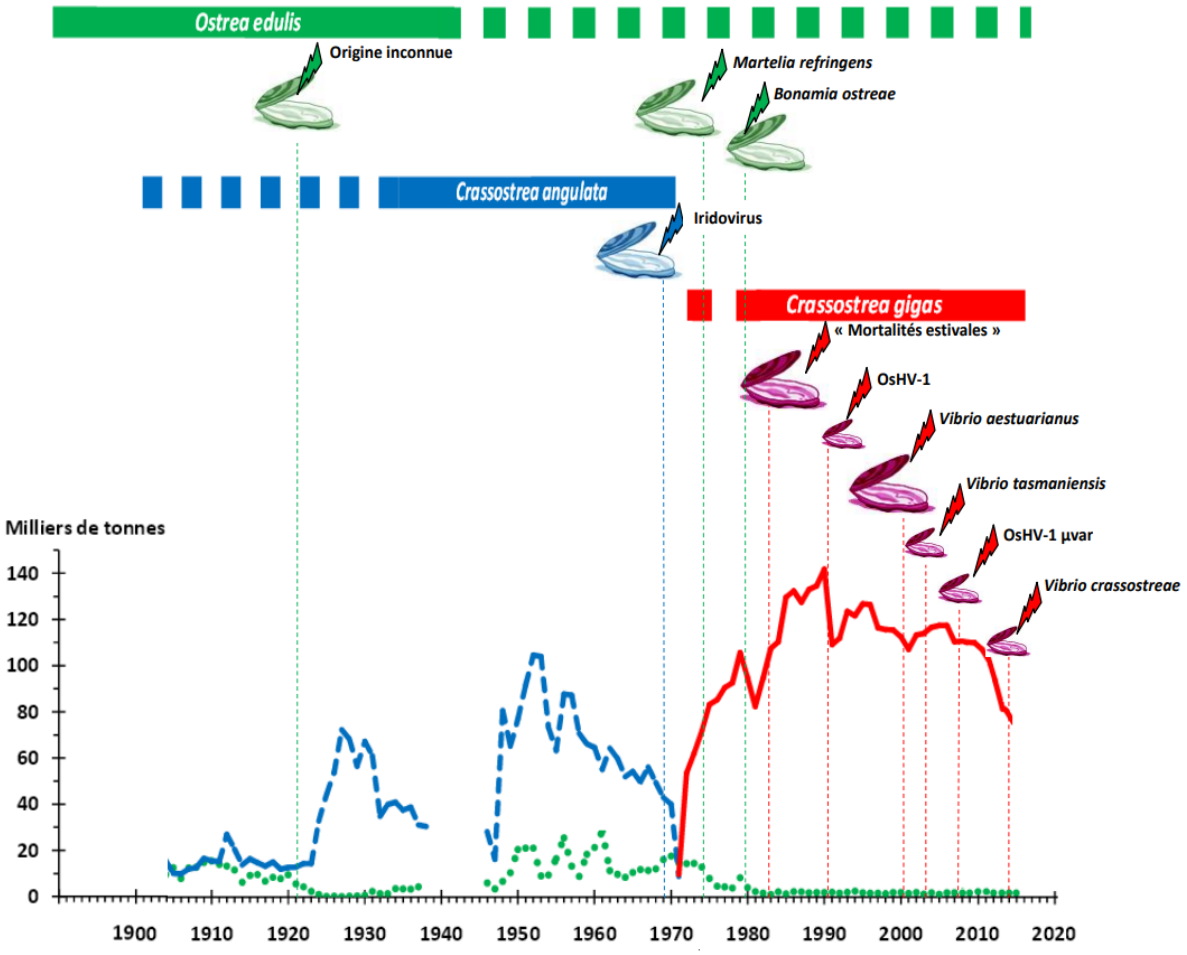


Figure 16. Historique de la production (en milliers de tonnes) de l'ostréiculture en France. Représentation de la production et des principaux agents pathogènes associés aux mortalités chez les huîtres adultes, juvéniles et naissains des différentes espèces d'huîtres cultivées en France (huître *Ostrea edulis* en vert, *Crasostrea angulata* en bleu et *C. gigas* en rouge) représentés en fonction de l'année d'identification. Extrait de *(Lafont, 2017)*.

III.4. 1. Maladies affectant les stades larvaires

Différentes maladies d'origine parasitaire, virale ou bactérienne peuvent affecter les stades larvaires d'huîtres. Des mortalités sporadiques parfois élevées (60-100% de mortalité) associées à la détection d'un virus de type herpès appelé OsHV-1 pour Ostreid herpes virus 1, ont été détectées depuis 1991 chez des larves d'huîtres du Pacifique élevées en écloserie notamment en France et en Nouvelle-Zélande (Figure 16) (Barbosa Solomieu et al., 2015; Dégremont et al., 2021; King, Jenkins, Seymour,

et al., 2019; Nicolas & Cochennec, 1992; Renault et al., 1994; Samain & Mccombie, 2007; Segarra et al., 2010).

Les bactéries du genre *Vibrio* (γ-protéobactéries) sont associées à des épisodes infectieux régulièrement rapportés dans les écloseries et les nurseries qui pratiquent l'élevage intensif de bivalves ((Figure 16). Les *Vibrio* concernés comprennent les espèces *V. coralliilyticus , V. neptunius, V. tubiashii* et *V. europaeus* (Destoumieux-Garzón et al., 2020; Elston et al., 2008; W. L. King, Jenkins, Seymour, et al., 2019; Travers et al., 2015).

Le protiste *Haplosporidium nelsoni* est un parasite qui infecte les huîtres creuses du Pacifique. Le parasite a été signalé chez des spécimens de *C. gigas* élevés en Californie, dans l'Etat de Washington ainsi qu'en France (Figure 17). Nous ne possédons pas de détails précis concernant le stade de développement de l'huître creuse du Pacifique qui est affecté par l'infection du *H. nelsoni.* Les observations générales indiquent que les huîtres juvéniles infectées peuvent avoir une croissance ralentie de leur coquille et des glandes digestives pâles.

III.4. 2. Maladies affectant les stades juvéniles (naissains)

On observe dans le cas des juvéniles de *C. gigas*, différents syndromes associés à la présence de bactéries : la maladie d'érosion des ligaments des charnières causées par *Cytophaga* spp. (Dungan et al., 1989; Dungan & Elston, 1988) et le syndrome de mortalité des huîtres du Pacifique dit « Pacific Oyster Mortality Syndrome » (POMS), causée par un variant du virus OsHV-1, OsHV-1 µVar, et associe diverses espèces de *Vibrio* (Figure 16 et Figure 17).

Depuis 2008, le POMS cause des mortalités massives et récurrentes affectant les jeunes stades de *C. gigas*, et entraînant des pertes de 60 à 100% dans certaines zones ostréicoles (Martenot et al., 2011; Segarra et al., 2010). Il s'agit d'une maladie multifactorielle. Différents facteurs ont été identifiés influençant l'apparition de ce syndrome : des facteurs génétiques, environnementaux (notamment la température), physiologiques (immunité), mais aussi l'alimentation influant notamment sur le statut métabolique (Petton et al., 2023). Ces mortalités ont été associées à la détection d'un nouveau variant du virus OsHV-1 appelé OsHV-1 µVar (Martenot et al., 2011; Segarra et al., 2010). Des travaux récents ont permis de mettre en évidence la nature polymicrobienne de cette maladie et la succession des évènements menant aux mortalités (de Lorgeril et al., 2018). Ces travaux ont montré que l'infection de l'huître par OsHV-1 µVar était l'étape initiale et nécessaire de la pathogenèse. Le virus induit une altération des défenses immunitaires de l'huître et une déstabilisation de son microbiote. Cette immunosuppression se traduit par l'inhibition de l'expression de certains PAMs comme les Big-défensines. Ce processus conduit à une infection secondaire par des bactéries

opportunistes qui se multiplient dans les tissus entrainant des dommages tissulaires irréversibles conduisant à une septicémie et la mort des huîtres (de Lorgeril et al., 2018). Cette infection bactériémie secondaire implique des bactéries du genre *Vibrio* et *Arcobacter* sp. (Clerissi, 2020; de Lorgeril et al., 2018; Destoumieux-Garzón et al., 2020; Lucasson et al., 2020). Au sein du genre *Vibrio*, les espèces associées au POMS en Bretagne sont *V. tasmaniensis, V. splendidus, V. cyclitrophicus,* et *V. crassotreae* (Bachère et al., 2015; Bruto et al., 2017; Destoumieux-Garzón et al., 2020; King, Jenkins, Go, et al., 2019; Lasa et al., 2019). En méditerranée (bassin de Thau), *V. harveyi* et *V. rotiferianus* sont les espèces prédominantes trouvées dans les huîtres infectées par OsHV-1 µVar. *V. harveyi* agit de façon synergique avec OsHV-1 µVar pour accélérer le processus infectieux et la mortalité des huîtres (Oyanedel et al., 2023).

III.4. 3. Maladies affectant les stades adultes

Chez des huîtres adultes, le virus OsHV-1 a été détecté (Arzul et al., 2002; Barbosa-Solomieu et al., 2004). En revanche, les adultes sont moins sensibles que les juvéniles aux infections à OsHV-1, et les infections aux virus sont le plus souvent asymptomatiques (Green et al., 2016; Segarra et al., 2014). Tout comme dans le stade précèdent, à l'âge adulte, *C. gigas* peut subir des infections bactériennes qui provoquent des mortalités comme la nocardiose induite par des bactéries du genre *Nocardia* qui a causé des épisodes de mortalités massives d'huîtres creuses du Pacifique en Californie, à Washington et en Colombie-Britannique, au Japon, et aux Pays-Bas (Friedman et al., 1998).

La maladie préoccupante actuellement est celle causée par *V. aestuarianus*, un agent qui a été associé à des mortalité chez les huîtres adultes depuis 2001 en Europe (Garnier et al., 2008; Mesnil et al., 2023). Depuis 2012, *C. gigas* fait face à une réémergence de *V. aestuarianus* entrainant des taux de mortalité d'environ 25 % et constitue une préoccupation économique majeure car touchant des huîtres de taille commerciale (Dégremont et al., 2020; Mesnil et al., 2023). Il s'agit ici d'une maladie sous contrôle environnemental notamment par les variations de température et de salinité. De plus, *V. aestuarianus* est capable de persister dans les tissus de l'huîtres durant l'hiver (Mesnil et al., 2023; Parizadeh et al., 2018).

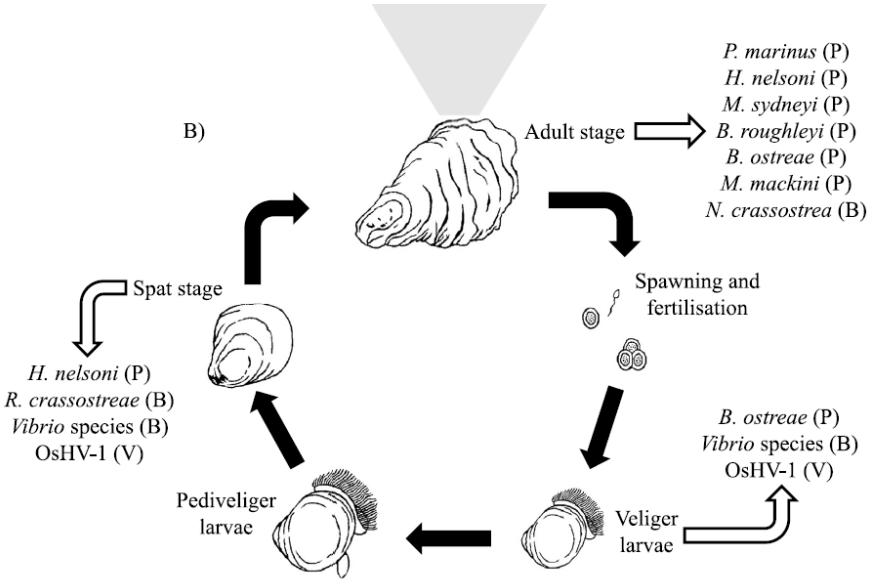


Figure 17. Les agents pathogènes des huîtres qui infectent les différents stades du cycle de vie de l'huître. (P), (B) et (V) représentent respectivement les parasites, les bactéries et les agents viraux. Extrait de King et al. 2019.

III. 5. Le système immunitaire de l'huître

Les huîtres sont cultivées dans des écosystèmes marins côtiers où les micro-organismes sont abondants et, en tant que filtreurs, ces organismes sont en contact permanent avec une grande diversité de micro-organismes potentiellement pathogènes. Pour gérer ces interactions avec le monde microbien, l'huître possède des mécanismes de défense qui reposent sur une immunité de type innée (Escoubas et al., 2016). Les premières lignes de défense face aux infections sont les barrières physico-chimiques c'est-à-dire la coquille, le mucus sur les épithélia ou encore la régulation du flux d'eau. Cependant, si le pathogène franchit ces premières barrières protectrices, l'huître est capable de développer une réponse immunitaire systémique efficace qui repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux hautement conservés dans le règne animal. Des données récentes ont également montré que les huîtres pouvaient développer une forme de mémoire immunitaire innée (T. Green & Speck, 2018), un mécanisme adaptatif longtemps négligé chez les invertébrés.

III.5. 1. Les cellules immunitaires : les hémocytes

Si de nombreux tissus sont capables de mettre en place des réponses immunitaires localisées (cellules épithéliales, branchies, glande digestive, manteau), les mécanismes systémiques de réponse immunitaire reposent principalement sur des cellules circulantes multi-potentes et immunocompétentes : les hémocytes (Bachère et al., 2015; Schmitt, 2011).

Chez l'huître, les populations d'hémocytes sont classiquement divisées en trois principaux types cellulaires, définies encore aujourd'hui sur la base d'observations morphologiques, fonctionnelles ou ultra-structurales : 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 (Bachère et al., 2015) (Figure 18). Cependant, des travaux actuels visant à caractériser les types hémocytaires à des échelles moléculaires et fonctionnelles laissent à penser qu'il pourrait exister jusqu'à sept populations d'hémocytes (E. Vignal, pers.com.). De plus, il n'existe pas de consensus clair chez l'huître sur les lignages cellulaires au sein des hémocytes. Actuellement, le tissu hématopoïétique qui produit les hémocytes n'a pas été précisément identifié, un ensemble d'études suggèrent que les branchies ou l'endothélium des vaisseaux sanguins seraient des organes participant à l'hématopoïèse (Jemaà et al., 2014; Y. Li et al., 2017; T. Zhang et al., 2014).

Les hémocytes jouent de nombreux rôles dans la physiologie de l'huître (nutrition, excrétion, réparation des lésions) et sont capables de reconnaître le non-soi, localiser, ingérer, transporter et digérer les particules étrangères (Fisher, 1986). Ils sont responsables de nombreux mécanismes permettant l'élimination des pathogènes : depuis la phagocytose, un des principaux mécanismes de défense, ou l'encapsulation de pathogènes, à la production de composés antimicrobiens comme des PAMs, des enzymes hydrolytiques (lyzozymes), mais aussi des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ROS pour « Reactive Oxygen Species » et RNS pour « Reactive Nitrogen Species ») jusqu'à la production de pièges d'ADN extracellulaire (appelés ETs pour « Extracellular Traps »), suite à l'activation de différentes voies de signalisation immunitaires (Figure 19) (Bachère et al., 2015; Escoubas et al., 2016).

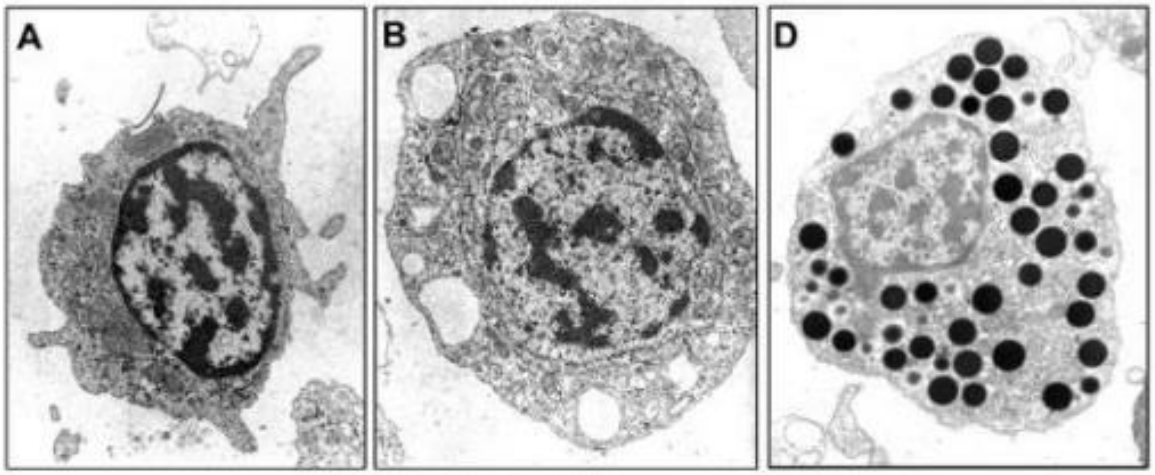


Figure 18. Morphologie des populations d'hémocytes de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. (A) les « blast-like cells », (B) les hyalinocytes. (D) les granulocytes. Microscopie électronique à transmission x15000. Adaptée de (Bachere et al. 2004).

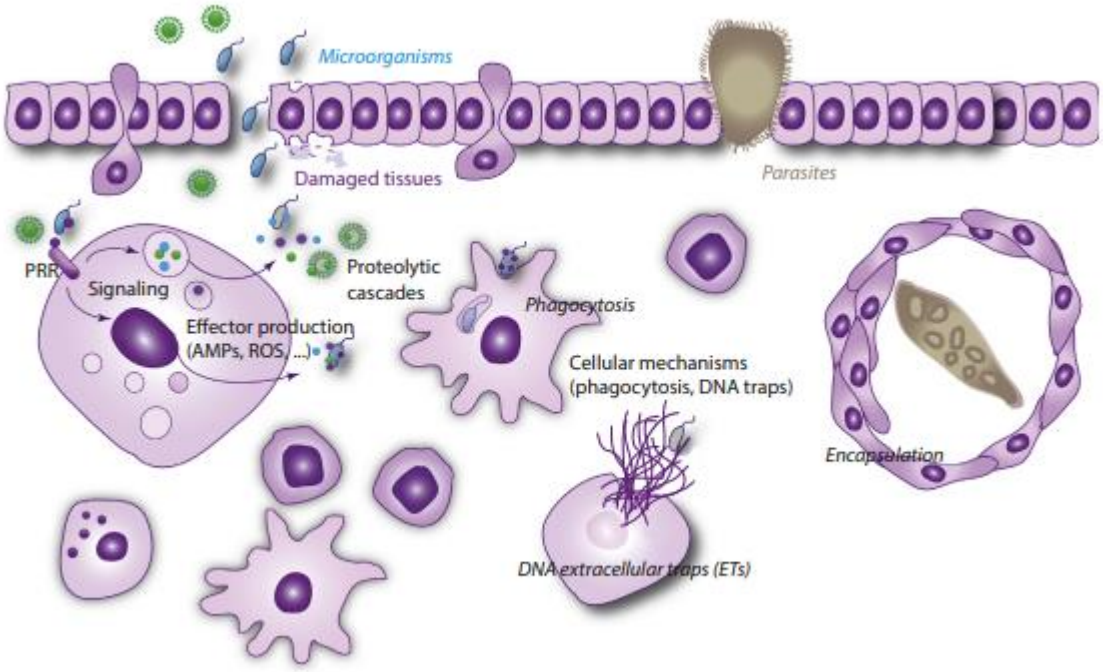


Figure 19. Représentation schématique des mécanismes de défenses médiés par les hémocytes dans la réponse immunitaire innée chez les mollusques. Extrait de *(Escoubas et al., 2016)*.

III.5. 2. Reconnaissance du non soi

La reconnaissance du non soi est la première étape essentielle de l'activation du système immunitaire inné. Cette reconnaissance repose notamment sur la reconnaissance par le système immunitaire de signatures moléculaires portées par des micro-organismes ou agents pathogènes dits MAMPs, pour « Microorganism Associated Molecular Pattern » ou PAMPs, pour « Pathogen-

Associated Molecular Patterns », ou encore de signaux émis par des cellules anormales ou endommagées dits DAMPs pour « Damage-Associated Molecular Patterns » (Matzinger, 2002). Les récepteurs cellulaires impliqués dans la reconnaissance des MAMPs/PAMPs sont appelés PRRs, pour « Pathogen-associated pattern Recognition Receptors ». S'il s'agit de protéines circulantes, on les appelle PRPs pour « Pathogen-associated pattern Recognition Proteins ».

Les PAMPs peuvent être de diverse nature biochimique (protéique, glucidique, nucléotidique). Il s'agit le plus souvent de molécules exposées à la surface des micro-organismes. On peut citer, chez les bactéries, les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif, l'acide lipotéichoique des bactéries à Gram positif, ou encore le peptidoglycane, la flagelline. (Schmitt, 2011). Chez les virus, il s'agit de glycoprotéines d'enveloppe ou encore des acides nucléiques ADN, ARN double ou simple brin (Mogensen, 2009; Schmitt, 2011). Chez les champignons, ces motifs peuvent être des β-1,3-glucanes de la paroi (De Marco Castro et al., 2021). Une des hypothèses pour expliquer que les organismes en contact constant avec une microflore commensale et pathogènes ne développent pas de réactions immunitaires disproportionnées est que les pathogènes sont reconnus s'il y a combinaison de PAMP et de DAMP qui formeraient des PoP (Patterns of Pathogenesis), ce qui reste à démontrer chez l'huître (Vance et al., 2009). Il existe aussi des mécanismes de régulation par des hydrolases comme les PGRP amidases (pour amidase « PeptidoGlycan Recognition Protein ») qui dégradent le peptidoglycane en composés non immunogènes et jouent un rôle clé dans l'homéostasie (Orlans et al., 2021).

Les PRRs et les PRPs reconnaissent directement ou indirectement les PAMPs. Un grand nombre de molécules de reconnaissance a été identifié chez l'huître creuse (G. Zhang et al., 2012). L'analyse *in silico* réalisée par Zhang et al. 2015 révèle même une expansion massive et une divergence fonctionnelle de nombre de ces récepteurs immunitaires (L. Zhang et al., 2015). On retrouve ainsi des protéines sécrétées de reconnaissance telles que les PGRP citées plus haut, qui reconnaissent le peptidoglycane (L. Zhang et al., 2015), les FREPS (« Fibrinogen-related proteins ») (Huang et al., 2015), ou les protéines LBP/BPI (« Lipopolysaccharide-binding protein »/ « bactericidal-permeability-increasing protein ») qui se lient au LPS, ainsi que des récepteurs membranaires ou cytoplasmiques tels que des récepteurs scavenger (« scavenger receptors », SRs) (Fleury et al., 2010), les TLRs (« Toll-like Receptors ») impliqués dans la reconnaissance d'un large éventail de MAMPs à la fois chez les vertébrés (pour revue voir (Kawai & Akira, 2006) et les invertébrés (Green, Montagnani et al., 2014; Segarra et al., 2014; L. Zhang et al., 2015; Zhang et al., 2013), des récepteurs RIG-I-like d'ARN doubles brins de petites taille (« Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors », RLRs) (Green et al., 2015; Huang et al., 2017; L. Zhang et al., 2015) ainsi que des lectines qui sont des protéines présentes à la surface des cellules capables de se liés aux glycoprotéines, glycolipides ou aux polysaccharides

présents à la surface des pathogènes (Zhang et al., 2015). Ces molécules membranaires ou circulantes peuvent avoir des affinités et des fonctions très différentes : elles peuvent servir d'opsonines, c'est-à-dire de PRPs initiateurs de la phagocytose, initier des voies de signalisation immunitaires ou des cascades protéolytiques impliquées dans différentes réactions immunitaires comme les cascades du complément et de la mélanisation (L. Zhang et al., 2015).

L'identification de bon nombre de ces récepteurs et protéines de reconnaissance du système immunitaire inné a été réalisée de manière *in silico* par des approches d'homologie de séquences. Chez les vertébrés et certains invertébrés modèles, les fonctions de ces molécules et leur rôle dans les mécanismes de l'immunité sont bien connus et ont pu être mis en évidence chez l'huître (Escoubas et al., 2016).

La reconnaissance du non soi par la liaison de ligands aux récepteurs de la surface cellulaire ou intracellulaires (dans les vésicules d'endocytose ou dans le cytoplasme), et l'interaction de protéines solubles avec des protéines d'adhésion cellulaire transmembranaires activent les voies de signalisation du système immunitaire inné, et engendrent de nombreuses réponses cellulaires et moléculaires comme l'expression d'effecteurs antimicrobiens ou encore la phagocytose. On peut citer pour la phagocytose les β-intégrines qui chez *C. gigas* sont capables d'activer la phagocytose par les hémocytes en reconnaissant une opsonine majoritaire du plasma d'huître, appelée *Cg*-EcSOD, pour « *Crassotrea gigas* extracellular superoxide dismutase » (Duperthuy et al., 2011; Terahara et al., 2006).

III.5. 3. Signalisation

Les voies de signalisation cellulaires sont activées à la suite de la reconnaissance du non soi ou de signaux de dommage. Elles permettent d'activer une réponse immunitaire adéquate, telles que l'activation et la migration des hémocytes et l'expression d'effecteurs immunitaires spécifiques (Lemaitre et al., 1997) qui permettra *in fine* l'élimination des pathogènes et le maintien de l'homéostasie. Les voies de signalisation sont très conservées au travers des espèces. Ainsi, la présence de nombreux éléments de voies de signalisation a été décrite chez l'huître présentant d'importantes similarités avec des composants de voies de l'immunité innée connus chez d'autres invertébrés (notamment la drosophile) ou chez les vertébrés.

Parmi les voies de signalisation connues, on trouve chez *C. gigas* des voies liées à la défense antibactérienne et antivirale: la voie de l'interferon (IFN), la voie JAK-STAT, la voie Toll/NF-κB, la voie de l'ARN interférence, et les mécanismes cellulaires tels que l'apoptose et l'autophagie (Green et al., 2015) (Figure 20). La voie Toll/NF-κB est une des voies les plus conservées à travers le règne vivant (des éponges aux mammifères) connue pour son implication dans de nombreuses fonctions

physiologiques et en particulier le développement précoce et l'immunité innée. Chez l'huître, de nombreux éléments de cette voie ont été identifiés dont des kinases (oIKK, IRAK, TBK1) (Escoubas et al., 1999; Tang et al., 2016, 2017), des inhibiteurs (*Cg*IκB1, *Cg*IκB2) du facteur NF-κB (Montagnani et al., 2008; Y. Zhang et al., 2011), des homologues du facteur de transcription NF-κB (*Cg*-Rel, p100) (Montagnani et al., 2004) et différentes protéines associées à cette voie (MyD88, TRAF et ECSIT) (Gueguen et al., 2003; Tang et al., 2020). chez l'huître, cette voie est impliquée dans des réponses antibactériennes mais aussi antivirales (Escoubas et al., 2016; Lafont et al., 2020).

Par ailleurs, différentes voies de régulations impliquées dans des mécanismes antiviraux ont été identifiées chez l'huître. Les voies de signalisation de l'IFN et cGAS/STING ont ainsi été identifiées (Green et al., 2015; Huang et al., 2017; Zhang et al., 2015). Ces voies comportent de nombreux éléments conservés avec les voies qui existent chez les vertébrés incluant des récepteurs de type RIG (RLR, cGAS), des facteurs de stimulation (« Stimulator of interferon genes », STING), de transcription (« Interferon regulatory factor », IRF) et des gènes cibles de cette voie (« Interferon stimulated genes », ISGs) tels que des effecteurs antiviraux (viperin) (Figure 20) (Green et al., 2015). Chez les vertébrés, ces voies sont activées via l'identification d'ADN ou d'ARN viraux et des glycoprotéines virales, ce qui va induire une sécrétion d'interférons. Ces protéines activent alors la voie JAK/STAT donnant lieu à la transcription de nombreux gènes (Darnell et al., 1994). Ainsi, une série de mécanismes antiviraux va être induit, allant de la production de molécules antimicrobiennes à l'activation de mécanismes de mort cellulaire pour empêcher l'entrée du virus dans d'autres cellules (Randall & Goodbourn, 2008). Chez l'huître, si des gènes d'éléments de ces voies ont été identifiés (T. J. Green et al., 2015) et des preuves de la régulation de leur expression en réponse à l'infection virale ont été apportées (de Lorgeril et al., 2018; Lafont et al., 2020), le lien entre ces différentes voies n'a pas encore été mis en évidence.

Le mécanisme de RNAi, bien décrit chez les vertébrés, permet de contrôler l'expression de gènes à l'échelle transcriptomique et post-transcriptomique (Meister and Tuschl, 2004) mais cette voie a aussi été décrite comme étant impliquée dans la réponse antivirale innée chez les vertébrés et les arthropodes contre des virus à ARN et à ADN (Deddouche et al., 2008; Jeang, 2012). L'ARN interférence est un processus activé par la reconnaissance d'ARNs doubles brins par une ribonucléase nommée Dicer, qui clive les ARNs doubles brins en fragments d'ARN doubles brins non codants. Les petits ARNs formés vont être ensuite transportés via les protéines argonautes (AGO) vers le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui va dégrader les ARNs messagers cibles, de séquence complémentaire des brins ARNs formés (Jeang, 2012). Des éléments de la voie de l'ARN interférence ont également été identifiés chez l'huître (Figure 20), comme la protéine Dicer (Lv et al., 2019) ou encore la protéines argonautes AGO2 (Jin et al., 2023). Des éléments de ces voies semblent

aussi régulées en réponse à l'infection virale chez l'huître (Lafont, 2020) mais son implication directe dans la réponse antivirale rest à démontrer.

Si beaucoup de voies ont pu être identifiées, la plupart des interactions entre les composants ainsi que les gènes cibles de ces voies ont été déduites de la littérature chez les vertébrés et les invertébrés et restent à élucider chez l'huître. Si certaines études ont montré l'implication de divers de ces composants dans l'immunité, pour beaucoup, leur rôle direct dans la réponse antibactérienne ou antivirale reste une question ouverte.

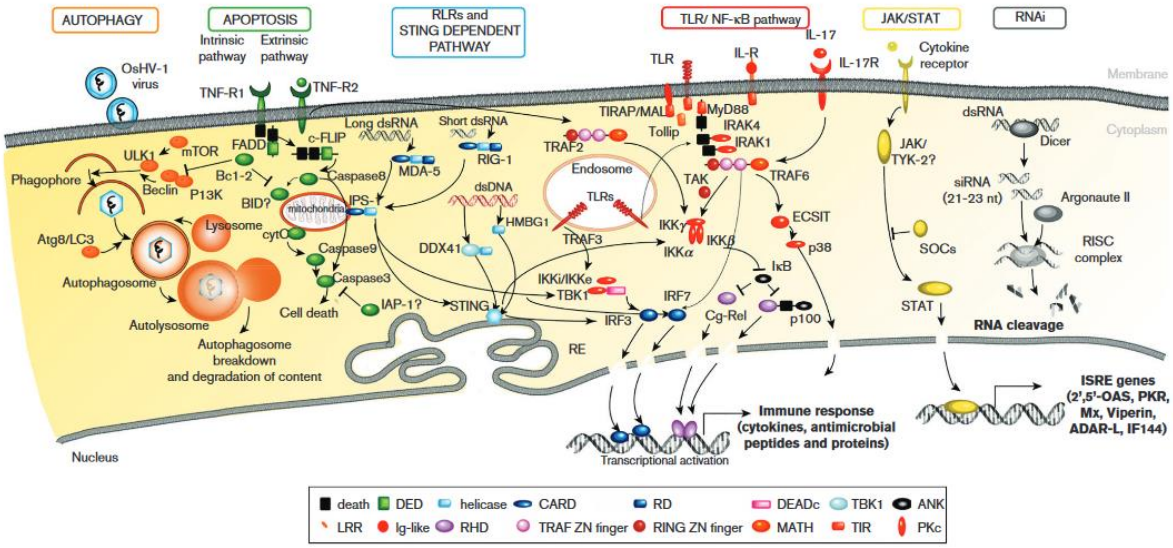


Figure 20. Représentation de voies de signalisations du système immunitaire inné de l'huître *Crassostrea gigas.* Les voies de l'autophagie, de l'apoptose, de signalisation STING, NF-kB et JAK/STAT ainsi que ARN d'interference RNAi. Ces voies ont été identifiées à partir des données de la littérature et du génome de l'huître *(G. Zhang et al., 2012)*. La plupart des interactions entre les composants ainsi que les gènes cibles de ces voies ont été déduites de la littérature sur les vertébrés et les insectes et restent à élucider chez l'huître. Extrait de (Green et al., 2015).

III.5. 4. Molécules et mécanismes effecteurs

Différents mécanismes cellulaires permettent l'isolement et l'élimination des pathogènes. Lorsque l'huître est infectée par des parasites de grande taille (nématodes, hyphes fongiques, certains protistes), les hémocytes sont capables de s'agréger en entourant le parasite, empêchant ainsi sa propagation dans d'autres tissus, organes (Schmitt, 2011). Ce phénomène est appelé encapsulation ou nodulation (Figure 19).

La phagocytose qui intervient lorsque le pathogène est de petite taille est également médiée par les hémocytes ; elle joue un rôle majeur dans l'immunité de *C. gigas*, elle permet la dégradation des bactéries (Figure 19) (Bachère et al., 2015). Dans le processus de phagocytose, l'agent étranger est

d'abord reconnu et internalisé au moyen d'une déformation de la membrane plasmique des hémocytes appelé par la suite le phagosome. Il peut y avoir fusion du phagosome avec des vésicules/granules cytoplasmiques (y compris les lysosomes). Après la fusion, des actions microbicides ont lieu (acidification du milieu, métaux toxiques, la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, ainsi que l'action de PAMs) dans le phagosome, conduisant à la neutralisation par lyse des particules ingérées. Au moment de la phagocytose, les lysozymes présents dans les lysosomes sont importants dans l'élimination bactérienne de par leurs propriétés lytiques sur le peptidoglycane de la paroi cellulaire des bactéries (Hancock & Scott, 2000). Les lysozymes de l'huître présents dans les hémocytes sont CGL-1 ou *Cg*-lysoz, il en existe d'autres exprimés dans d'autres tissus comme le manteau, le tube digestif (Itoh & Takahashi, 2007, 2008). Pareillement, les ROS sont des molécules oxygénées hautement réactives qui permettent de dégrader les bactéries phagocytées dans les hémocytes de *C. gigas* ; parmi ces molécules on compte des radicaux libres (anion superoxyde $O_2^{\bullet}$ et le radical hydroxyl $OH^{\bullet}$) et le péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Donaghy et al., 2012; Lambert et al., 2003). Les ROS provoquent un stress oxydatif qui perturbe les chaines respiratoires des micro-organismes. Les superoxides dismutases extracellulaires (*Cg*-SODs) qui catalysent la conversion de l'anion superoxyde en péroxyde d'hydrogène moins réactif sont des protéines plasmatiques majoritaires chez l'huître et exclusivement produites par les hémocytes. Il est discuté qu'elles pourraient à la fois jouer un rôle antioxydant face aux ROS pour protéger les tissus de l'huître mais aussi un rôle d'opsonine, en participant à la phagocytose des bactéries par les hémocytes (Duperthuy et al., 2011; Gonzalez et al., 2005).

D'autres mécanismes cellulaires potentiellement antiviraux et antibactériens et liés à l'élimination de pathogènes ont été identifiés chez l'huître. C'est le cas de l'autophagie. Des gènes impliqués dans l'autophagie ont été identifiés chez *C. gigas* et il a été observé une diminution de la survie des huîtres infectées par à la fois par OsHV-1 et *V. aesturianus lorsque* l'autophagie est inhibée (P. Moreau et al., 2015; Picot et al., 2019). L'autophagie est un mécanisme de mort cellulaire entrainant la lyse des pathogènes intracellulaires *via* la libération d'enzymes lysosomiales. Dans ce même sens, des molécules pro- et anti-apoptotiques ont été identifiées chez *C. gigas* (Qu et al., 2015; Zhang et al., 2011), notamment lors d'infection à OsHV-1 faisant de l'apoptose un autre mécanisme de défense antiviral de l'huître (Green et al., 2015; Green, Robinson, et al., 2014; Segarra et al., 2014). L'apoptose aussi appelé mort cellulaire programmée. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée conduit à une autodestruction des cellules infectées, ce qui permet de limiter la prolifération des pathogènes.

Les hémocytes sont aussi responsables de la production de protéases et d'inhibiteurs de protéases comme des cathepsines, des protéines apparentées à l'astacine, des métalloprotéases, des serpines,

des cystatines, de l'α2-macroglobuline mais aussi d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéases (TIMP) (Armstrong & Quigley, 1999; Fleury et al., 2010; Gueguen et al., 2003; Montagnani et al., 2007; Taris et al., 2009). Ces enzymes sont importantes pour la fonction immunitaire car elles sont indispensables au déclenchement et au maintien de la réponse cellulaire immune à travers leur activité enzymatique et leur capacité à activer les différentes voies biologiques associées à l'immunité (Armstrong, 2006).

III.5. 5. Les effecteurs de l'immunité : cas de PAMs

A l'heure actuelle, quatre familles de PAMs ont été caractérisées chez *C. gigas* (Tableau 2). On trouve d'abord des peptides cationiques de la famille des cis-défensines, avec une structure tridimensionnelle en motif CSαβ. La première défensine décrite a été appelée *Cg*-Defm pour « *C. gigas* mantle defensin » (Tableau 2). Elle est en effet exprimée de manière constitutive dans le manteau de l'huître. On trouve également deux défensines à la structure très similaire, appelées *Cg*-Def1 et *Cg*-Def2 exprimées dans les hémocytes (Tableau 2) (Gonzalez, Gueguen, Destoumieux-Garzon, et al., 2007; Gueguen et al., 2006). Les défensines de *C. gigas* sont essentiellement actives contre des bactéries à Gram positif. En effet, les *Cg*-Defs se lient au précurseur du peptidoglycane, le lipide II, comme montré par chromatographie sur couche mince et résonance plasmonique de surface, inhibant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane (Schmitt, Gueguen, et al., 2010).

Dans les hémocytes de *C. gigas*, il a été aussi identifié une famille de peptides cationiques contenant deux répétitions d'un motif Proline-Arginine-Proline (PRP) (Tableau 2). Ces peptides de taille variable ont été nommés *Cg*-Prp pour « *C.gigas* prolin-rich peptide » (Gueguen et al., 2009). Les *Cg*-Prp sont assez faiblement actifs sur les bactéries mais ils agissent en synergie avec les *Cg*-Defs (Schmitt, Lorgeril, et al., 2012). On ignore tout des mécanismes qui sous-tendent leur activité.

La troisième famille de peptides cationiques est la famille de Big-défensines qui font l'objet de mes travaux de thèse. Chez *C gigas*, 7 gènes codant des Big-defensines ont été identifiés (Gerdol et al., 2020a) (Tableau 2). Les gènes codant *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef2 sont exprimées suite à un stimuli, alors que le gène codant *Cg*-BigDef3 est exprimé de manière constitutive dans les hémocytes. *Cg*-BigDef1 est active sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif y compris des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (Loth *et al.,* 2019). De plus *Cg*-BigDef1, qui est soluble en solution, est capable de s'oligomériser : en s'auto-assemblant, elle forme des nanonets qui viennent enchâsser les bactéries et les tuer (Loth *et al.,* 2019). Les nanonets ont pu être visualisés en microscopie

électronique à balayage (Figure 10) ainsi que par microscopie confocale à l'aide d'anticorps dirigés contre *Cg*-BigDef1. On ignore par quel mécanisme la mort cellulaire est induite.

Des protéines antimicrobiennes de plus grandes tailles ont également été identifiées. En particulier un homologue de la protéine bactéricide/augmentant la perméabilité humaine (hBPI) nommé *Cg*-BPI a été identifié chez *C. gigas* (Gonzalez et al., 2007) (Tableau 2). Un autre membre de la famille appelé *Cg*-BPI2 a par la suite été décrit (L. Zhang et al., 2011) (Tableau 2). Ces PAMs sont exprimés de manière constitutive dans les tissus épithéliaux des huîtres et peuvent être induits dans les hémocytes lors d'une stimulation bactérienne, comme révélé par hybridation *in situ* (Gonzalez et al., 2007). Comme l'indique son nom, *Cg*-BPI est active contre des bactéries à Gram négatif dont elle perméabilise les membranes, comme cela a pu être montré par des tests colorimétriques révélant les activités d'enzymes cytoplasmiques ou périplasmiques rendues accessibles par la permébilisation membranaire (Gonzalez et al., 2007). En plus de son activité antimicrobienne, *Cg*-BPI participe à la reconnaissance du non soi grâce à sa capacité à se lier au LPS, comme montré par résonance plasmonique de surface (Gonzalez, Gueguen, Destoumieux-Garzon, et al., 2007).

Outre les peptides et protéines antimicrobiens, des molécules multifonctionnelles possédant des éléments moléculaires communs avec les PAMs comme la charge cationique, l'hydrophobicité mais aussi l'amphipathicité ont été identifiés et présentent des activités antimicrobiennes. Il s'agit des histones *Cg*-H2A et des protéines ribosomales *Cg*-RL29 et *Cg*-RL35 purifiées à partir de branchie d'huîtres (Tableau 2) (Schmitt et al., 2010). Ces molécules sont actives contre des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, cependant leur implication dans la défense immunitaire des huîtres n'a pas été encore démontrée. Par contre, le rôle dans la réponse immunitaire d'autres fragments d'histones nommés "histones H1- and H5-like" a été caractérisé : ils sont libérés des hémocytes par un phénomène d'ETose en réponse au stress oxydant et ils restent associés aux pièges extracellulaires d'ADN qui enchâssent les bactéries. Ces associations ont pu être révélées en microscopie confocale à l'aide d'anticorps anti-histone. Ils sont actifs sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Poirier et al., 2014). Un peptide antimicrobien, appelé *Cg*-Molluscidin a également été isolé des branchies de *C.gigas* par chromatographie liquide à haute performance à échange d'ions et en phase inverse C18 (Tableau 2) (Seo et al., 2013). Ce peptide de 5,5 kDa présente une activité contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, mais pas contre la levure *Candida albicans* (Seo et al., 2013). Il ne montre aucune similitude avec d'autres peptides connus et est spécifique aux huîtres. L'expression de *Cg*-Molluscidin est constitutive et son niveau est régulé à la hausse après l'injection de *Vibrio* sp. (Seo et al., 2013). Bien que le *Cg*-Molluscidin possède une structure basique et des répétitions de résidus dibasiques, il ne forme pas de structure ordonnée (Seo et al., 2013).

Tableau 2. Listes des PAMs identifiés chez C. gigas.

Chez *C.gigas*	Famille	Variant	Numéro GenBank	Taille (kDa)	Lieu d'expression	Expression	Structure (code PDB)	Activité antimicrobienne	références
Protéines et peptides antimicrobiens conventionnelle	Défensine	*Cg*-Defm	AJ565499	4,64	manteau	constitutif	2B68	Gram +	(Schmitt, Rosa, et al., 2012a)
		Cg-Defh1	ACQ73009	4,76	hémocytes	constitutif		Gram +	(Gueguen et al., 2006)
		Cg-Defh2	ACQ76280	4,67	hémocytes	constitutif		Gram +	(Gueguen et al., 2006)
	Big défensines	*Cg*-BigDef1	JN251125	10,77	hémocytes	inductible par challenge bactérien	6QBL	Gram +, Gram -	(Rosa et al., 2011)
		Cg-BigDef2	JN251126	9,85	hémocytes	inductible par challenge bactérien		nd	(Rosa et al., 2011)
		Cg-BigDef3	JN251122	9,8	hémocytes	constitutif		nd	(Rosa et al., 2011)
		Cg-BigDef4	OP191675	9,51	hémocytes	nd		nd	(Gerdol et al., 2020)
		Cg-BigDef5	OP191676	10,04	hémocytes		8BGK	nd	(Gerdol et al., 2020)
		Cg-BigDef6	OP191677	9,31	hémocytes	nd		nd	(Gerdol et al., 2020)
		Cg-BigDef7	OP191678	11,24	hémocytes	nd		nd	(Gerdol et al., 2020)
	Proline rich peptide	*Cg*-IgPrp	FJ669252	1,8	hémocytes	constitutif		synergie avec Cg-Defs sur Gram -	(Schmitt, Gueguen, et al., 2010; Schmitt, Lorgeril, et al., 2012; Schmitt, Rosa, et al., 2012b)
		Cg-stPrp	FJ669286	1.55	hémocytes	constitutif		synergie avec Cg-Defs sur Gram -	(Gueguen et al., 2009)
	bactericidal/ permeability-increasing protein	*Cg*-BPI1	AY165040	50.14	hémocytes	inductible par challenge bactérien	1BPI	Gram -, champignon	(Gonzalez, Gueguen, Desserre, et al., 2007; Gonzalez, Gueguen, Destoumieux-Garzon, et al., 2007; Schmitt, Rosa, et al., 2012b)
					épithélium plusieurs tissus	constitutif			(Gonzalez et al., 2007a; Gonzalez et al., 2007b; Schmitt, Rosa, et al., 2012b)
		Cg-BPI2	FP005503		tous les tissus	constitutif / inductible		Gram -	(Y. Zhang, He, Li, et al., 2011)
Protéines et peptides antimicrobiens non conventionnelle	Macrophage expressed gene 1 like protein	*Cg*-Mpeg1	EF627979.1	81,8	tous les tissus	constitutif		Gram +, Gram -	(He et al., 2011)
	Histones	*Cg*-H1/H5	EKC36743/ EKC17653	19,6	branchies	nd		Gram +, Gram -	(Poirier et al., 2014)
		Cg-H2A	AM856086	20,2	branchies	nd		Gram +, Gram -	(Schmitt, 2010)
	Protéines ribosomales	*Cg*-RL29	JF766757.1	6,4	branchies	nd		Gram +, Gram -	(Schmitt, 2010; Seo et al., 2017)

		Cg-RL35	ABY27350	nd	branchies	nd		Gram +, Gram -	(Schmitt, Rosa, et al., 2012b)
	Molluscidin	*Cg*-molluscidin	JX549384.1	5,5	manteau et branchies	constutitive		Gram +, Gram -	(Seo et al., 2013)

III.5. 6. La mémoire immunitaire innée

Des études récentes ont apporté des arguments en faveur de l'existence d'une forme de reconnaissance spécifique et d'un mécanisme de mémoire immunitaire appelé priming immunitaire chez l'huître creuse *C. gigas*. Des travaux ont notamment montré l'amélioration des capacités de survie ou de réponse immunitaire en réponse à des infections virales ou des infections de bactéries à Gram négatif. L'exposition à des ARNs double brin synthétiques mimant la présence d'un virus, appelé poly (I:C), a spécifiquement induit un état de protection antivirale chez l'huître lorsqu'elle a ensuite été infectée par OsHV-1 µVar (Green & Montagnani, 2013; Lafont et al., 2017, 2020). En 2017, Lafont et al. ont montré que ce phénomène était durable, persistant pendant au moins cinq mois, suggérant ainsi l'existence d'une mémoire immunitaire innée chez cette espèce (Lafont et al., 2017). Outre cette démonstration de la possibilité d'induire une protection antivirale, des travaux ont montré qu'une exposition préalable à la bactérie *V. splendidus* tuée à la chaleur induisait une réponse immunitaire plus forte lorsqu'elles ont été soumises par la suite à une deuxième injection avec la même bactérie vivante (Zhang et al., 2014). Cette réponse immunitaire plus forte se traduit par une augmentation du nombre total d'hémocytes (stimulation de l'hématopoïèse), du taux de phagocytose (Li et al., 2017; Zhang et al., 2014) et une implication de *Cg*-EcSOD dans le mécanisme du priming antibactérien (Liu et al., 2016). Les huîtres sont des animaux en contact permanent avec un riche microbiote interne et environnementale, dans ce sens la découverte d'un système immunitaire complexe reste évident. Cependant, une des interrogations restantes consiste à comprendre l'importance du microbiote dans l'homéostasie de ces animaux et les mécanismes immunitaires impliqués dans le maintien de cette homéostasie (Escoubas et al., 2016).

III.6. Le microbiote de l'huître

III.6. 1. Caractérisation du microbiote de l'huître

En tant qu'organisme filtreur, les tissus de l'huître abritent de nombreux micro-organismes qui composent son microbiote. Avec le développement des techniques de séquençage à haut débit, la diversité microbiologique de l'huître a fait l'objet d'études approfondies (Li et al., 2017).

Pendant longtemps, les connaissances sur le microbiote de l'huître se sont limitées à son microbiote cultivable. La méthode de culture conventionnelle est encore largement utilisée pour analyser la

population bactérienne. Cette technique a permis d'identifier plusieurs phyla bactériens majeurs chez différentes espèces d'huîtres. Les protéobactéries des genres *Pseudomonas, Vibrio, Actinobacter et Aeromonas* sont les plus abondantes chez l'huître, suivies par les Firmicutes qui constituent moins de 20% des isolats et des *Bacteroidetes* qui représentent 90% des bactéries coliformes et hétérotrophes (représentant de la flore microbienne de l'eau de mer) présentes dans les organes associés au tube digestif (Colwell & Liston, 1960; Kueh & Chan, 1985). Ces méthodes de culture peuvent entraîner une surestimation ou sous-estimation de la communauté microbienne, car de nombreuses bactéries ne sont pas cultivables. En effet, seulement moins de 0,01% des bactéries totales dans les huîtres sont dites cultivables (Li et al., 2017). L'approche moléculaire se montre plus efficace que la méthode de culture et d'isolement pour l'identification du microbiote bactérien (Romero et al., 2002). Les techniques employées sont entre autres la réaction de polymérase en chaine (PCR) ciblant L'ADN 16S, la PCR en temps réel, l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE), la dénaturation électrophorèse sur gel à gradient dénaturant(DGGE), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP), FISH (Li et al., 2017).

En 2012, Trabal et al. ont ainsi révélé par amplification de l'ARN 16S et l'analyse par TGGE, une faible diversité bactérienne (principalement des β-protéobactéries, des firmicutes et des spirochètes), identifiant la bactérie *Burkholderia cepacia* comme étant la plus abondante chez *C. gigas* et *C. cortezien.* Durant ces dernières décennies, les méthodes de séquençage ont nettement évolué. En utilisant le métabarcodage et la métagénomique, Dupont et al. ont démontré que l'hémolymphe abritait des communautés de bactéries, de protistes et de virus, chacune étant façonnée par différents facteurs et distinctes des communautés de l'eau de mer environnante (Dupont et al., 2020). De plus, par pyroséquençage de la boucle V3-V5 de l'ADN 16S, il a été démontré que le microbiote de l'hémolymphe était principalement constitué de Protéobacteries et de Bacteroidetes (Lokmer & Mathias Wegner, 2015). Dans les glandes digestives et les gonades, les γ-protéobactéries et les bactéries à Gram-positif à faible teneur en G + C ont été identifiées comme métaboliquement actives par FISH (Hernandez-Zarate & Olmos-Soto, 2006). Dans les branchies d'huîtres creuses, le microbiote dominant identifié par séquençage du gène de l'ARN 16S est composé des genres *Lactococcus, Lactobacillus, Enterobacter* et *Aeromonas* (Roterman *et al.,* 2015).

Cependant l'utilisation de techniques reposant sur le gène 16S de l'ARN possède des biais, certains genres bactériens ne possèdent pas de fort pouvoir discriminant phylogénétique. Pour améliorer l'efficacité de l'identification, de nouvelles méthodes émergent. C'est notamment le cas de la spectrométrie de masse qui est désormais couramment utilisées pour l'identification des micro-organismes en milieu clinique. Le MALDI Biotyper est un instrument qui comprend (i) une source laser qui vient ioniser les molécules co-cristallisées dans une matrice et (ii) un analyseur de masse par

le temps de vol (TOF, pour « time of flight ») capable d'obtenir un spectre d'ions représentatif des protéines principalement ribosomales d'un organisme cible. Comme une empreinte digitale, ce spectre est unique à chaque bactérie et permet l'identification de l'espèce par comparaison à la base de données actuellement composée de 90% de bactéries pathogènes de l'homme. Compte tenu de la classification robuste, des temps d'acquisition rapides et du faible coût par échantillon, il est intéressant d'étendre l'utilisation du MALDI Biotyper à l'identification d'isolat environnementaux (Fergusson et al*.,* 2020).

Chez l'huître, l'identification d'un microbiote de base nommé « core microbiote » reste encore une énigme. Mais les tentatives d'identification des espèces bactériennes associées de manière stable aux tissus de l'huître ont conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse de la présence de bactéries autochtones potentiellement nécessaires pour la survie de l'huître et la présence de bactéries allochtones, présentes dans les tissus de manière transitoires sous l'influence par l'environnement (Z. Li et al., 2017). Cette hypothèse expliquerait la grande diversité microbienne observée chez l'huître. Cependant ce « core microbiote » pourrait changer en fonction de chaque organe et du stade de croissance de l'huître (Lokmer, Goedknegt, et al., 2016; Lokmer, Kuenzel, et al., 2016). Néanmoins, la présence ou l'absence d'une espèce bactérienne dépend de multiples facteurs tels que les limites techniques de détection mais aussi des différents stades de croissance et des conditions environnementales (King et al., 2012; Li et al., 2017).

III.6. 2. Impact du microbiote sur la santé de l'huître : influence de l'environnement, des pathogènes.

Le mode de vie de l'huître fait qu'elle se trouve en interaction directe et permanente avec les micro-organismes de son environnement. Son microbiote est donc variable et peut changer tout au long de son cycle de vie. Celui-ci s'est révélé plus diversifié au stade post-larvaire qu'au stade adulte (Trabal Fernández et al., 2014). Le microbiote des huîtres est dynamique et peut être affecté par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Clerissi et al., 2018; Paillard et al., 2022).

Les facteurs biotiques

Comme décrit précédemment, *C. gigas* est sujette à des mortalités massives. Ces mortalités estivales, notamment dû au POMS induit par le virus OsHV-1, peuvent impacter le microbiote de l'huître et le déstabiliser. En 2014, Normand et al. ont montré qu'une augmentation progressive de la température chez des huîtres apparemment saines entraîne une réplication accrue de l'OsHV-1 et une surmortalité. En 2018, Clerissi et al. ont observé par une analyse de metabarcoding 16S que des familles sensibles au POMS présentaient un microbiote moins diversifié que les familles résistantes au POMS en période de stress thermique. Ils ont également mis en évidence que le microbiote des

familles d'huîtres sensibles au POMS présentait une plus grande variabilité que celui des familles résistantes à l'échelle des ordres bactériens (Clerissi et al., 2018). De plus, leur étude a également permis d'identifier des taxons bactériens liés à l'état de santé des huîtres. Alors que les familles résistantes présentent une forte abondance relative de cyanobactéries pendant la période de stress, les huîtres sensibles présentent une faible stabilité des Rhodospirillales, Rhodobacterales, Flavobacteriaceae et Erythrobacteraceae (Clerissi et al., 2018).

Les facteurs abiotiques

Le microbiote des huîtres est fortement influencé par les conditions environnementales, c'est-à-dire par leurs mode de vie, stades de vie sessiles ou libres, leurs niches écologiques, et par la variation spatiale et temporelle des facteurs abiotiques (saison, pollution, qualité de l'eau, nutriments) (Clerissi et al., 2018; Paillard et al., 2022). Il a été démontré que la pollution de l'eau par un herbicide très répandu dans les pratiques agricoles, l'atrazine, entraînait une perte significative d'espèces microbiennes mutualistes et une colonisation ultérieure par des bactéries pathogènes (Britt et al., 2020). Lokmer et Wegner en 2015, ont exposé *C. gigas* à des contraintes de température et à une souche de *Vibrio* virulent. Ils ont surveillé la survie des huîtres et à plusieurs reprises recueilli l'hémolymphe pour déterminer la composition du microbiome par Pyroséquençage du gène 16s de l'ARNr. Cette étude a révélé que le dynamisme microbien et la composition des communautés microbiennes chez les huîtres en bonne santé (y compris les survivants de l'infection) étaient significativement affectés par la température et le stress thermique, mais pas par l'infection avec le *Vibrio* testé (Lokmer & Mathias Wegner, 2015).

Un différentiel de salinité favorise également la prolifération de bactéries pathogènes potentielles dans le microbiote de l'huître, ce qui augmente donc la sensibilité aux maladies. Par exemple, chez *V. splendidus* et *V. aesturianus*, la salinité optimale est de 20% (Vezzulli et al., 2015). De plus, la salinité joue également un rôle dans l'infection par le virus OsHV-1. L'adaptation des huîtres à une faible salinité (10%) peut réduire le taux de mortalité d'infection par ce virus (Fuhrmann et al., 2016). De plus, il a été observé qu'une faible salinité modifiait de manière significative la composition microbienne et la réponse immunitaire des huîtres infectées par *V. alginolyticus* sans affecter de manière significative la prolifération et la virulence de ce Vibrio (Li et al., 2022).

En 2019, une étude réalisée par Flores-Higuera et al. a montré que les changements dans les environnements marins, en particulier les changements de pH, sont corrélés à des altérations de la physiologie, à la susceptibilité aux maladies et à des altérations du microbiote des larves et naissains de *C.gigas* (Flores Higuera et al., 2019). Les communautés bactériennes associées aux larves pédiveligères et au naissain ont été modifiées en réponse aux conditions acides. Les familles

Rhodobacteraceae et Campylobacteraceae ont été les plus affectées par le changement de pH, avec des augmentations de Vibrionaceae dans les larves pédivéligères et des Planctomycetaceae et Phyllobacteriaceae dans le naissain (Flores Higuera et al., 2019).

III.6. 3. Interactions entre le microbiote et le système immunitaire

Comme vu précédemment dans la section I.5, le système immunitaire joue un rôle régulateur sur le microbiote. Chez l'huître, ce rôle du système immunitaire n'est pas clairement identifié, notamment parce qu'il n'existe pas à l'heure actuelle d'outils opérationnels pour faire de la génomique fonctionnelle chez l'huître. Il a cependant été montré, qu'au cours de la maladie du POMS, une dysbiose et la prolifération de bactéries opportunistes étaient observées alors que les hémocytes sont infectés par le virus OsHV-1. L'infection des hémocytes a été associée à une immunosuppression notamment caractérisée par l'inhibition de l'expression de certains PAMs (de Lorgeril et al., 2018). De façon similaire, chez des huîtres affaiblies suite à une infection par une souche de *Vibrio,* la mise en place d'une dysbiose déstabilisant le microbiote de l'hémolymphe a pu être démontré (Lokmer, Kuenzel et al., 2016; Lokmer & Mathias Wegner, 2015). De plus, l'implication du microbiote, de sa diversité et de sa stabilité chez les huîtres en bonne santé par rapport aux huîtres malades a également été mise en évidence (Clerissi et al., 2018). Récemment, une étude a démontré que l'exposition des huîtres à une microflore environnementale dès les premiers stades larvaires améliorait durablement la survie des huîtres lorsqu'elles sont confrontées à l'agent pathogène responsable du POMS, à la fois sur la génération exposée mais aussi sur la génération suivante (Fallet et al., 2022). Ces travaux ont montré que l'amélioration de la survie était liée à une éducation précoce du système immunitaire par la microflore environnementale et suggérait également que le système immunitaire pouvait façonner durablement le microbiote de l'huître, notamment via l'induction de l'expression de peptides et protéines antimicrobiens (*Cg*-BigDef1-2, *Cg*-Defh et *Cg*-BPI).

Chez l'huître creuse, cette relation entre système immunitaire et le microbiote pourrait aussi être à double sens comme décrit dans la section I.3.2. En effet Desriac et al. ont observé que certaines espèces bactériennes présentes dans l'hémolymphe de *C. gigas* exercent une activité antibactérienne sur des pathogènes de l'huître (Defer et al., 2013). Ces activités sont dues entre autres à la production par les bactéries du microbiote de PAMs appelés altérines (Desriac et al., 2020). En contribuant au bouclier microbien de l'huître, son microbiote pourrait jouer un rôle bénéfique à la santé de de l'huître (Desriac et al., 2014). Un tel effet protecteur a récemment été mis en évidence. On ignore à ce jour s'il relève de la simulation de l'immunité des huîtres ou des activités antimicrobiennes directes exercées par certaines espèces du microbiote, ou des deux phénomènes

simultanément (Dantan et al., 2022) Cette question fait actuellement l'objet de la thèse de Luc Dantan au laboratoire IHPE.

IV. Objectifs du projet de thèse

Cette thèse se focalise sur l'étude d'une famille de peptides antimicrobiens de l'huître creuse *Crassostrea gigas,* les Big défensines.

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'UMR IHPE (Interactions Hôtes Pathogènes Environnements) qui développe des recherches intégratives sur les interactions entre les animaux, leurs agents pathogènes et leurs environnements. Les pathosystèmes étudiés couvrent un large éventail d'interactions en milieux marins et intègrent l'étude de l'émergence, des mécanismes de virulence des pathogènes et celle des mécanismes de résistance des hôtes. Dans ce cadre, de nombreuses études ont été menées sur la compréhension des maladies touchant les invertébrés d'intérêt aquacole et leurs mécanismes de défense. Les membres de ce laboratoire ont notamment mené des recherches pionnières sur les peptides antimicrobiens (PAMs) des invertébrés marins (Bachère et al., 2015; Destoumieux et al., 1997; Gonzalez, Gueguen, Destoumieux-Garzon, et al., 2007; Gueguen et al., 2006; Mitta et al., 2000). Ces travaux ont abouti à la découverte des Big défensines chez l'huître *Crassostrea gigas* dans le cadre du doctorat de Rafael Da Rosa (Rosa, 2011).

Les Big défensines possèdent un domaine C-terminal de type β-défensine lié à un domaine N-terminal hydrophobe, qui ne présente pas de similarité avec d'autres protéines connues (Gerdol et al., 2020a). Cette structure unique n'est retrouvée que dans un nombre limité d'espèces phylogénétiquement éloignées : les mollusques, les limules (chélicères ancestrales) et les céphalochordés, vivant principalement dans des environnements marins. Les Big défensines se sont diversifiées de manière remarquable, notamment en termes de structure primaire, mais aussi de profils d'expression (Gerdol et al., 2020a). Chez *C. gigas*, sept gènes codant des Big défensines ont été identifiés (Gerdol et al., 2020a). Il a été précédemment montré que l'expression des *Cg*-BigDef1 et 2 était induite suite à une infection bactérienne, contrairement à la Cg-BigDef3 dont l'expression est constitutive (Rosa et al., 2011). Ces résultats ont soulevé la question de la fonction de ces différentes Big défensines chez l'huître. Au début de ces travaux de thèse, aucune étude n'avait évalué si la grande diversité structurale de ces PAMs, la diversité de leur profil d'expression, se traduisait aussi par une diversité fonctionnelle.

Des travaux récemment menés au laboratoire ont cependant permis de mettre en évidence une fonction potentielle des Big défensines chez l'huître. L'huître creuse *C. gigas* souffre depuis 2008 d'une maladie nommée Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS). L'étude de cette maladie

polymicrobienne a permis de mettre en évidence l'inhibition de l'expression de certaines *Cg*-BigDefs chez des animaux sensibles à la maladie (qui subissent une dysbiose lors du POMS) contrairement aux animaux résistants (qui ne subissent ni dysbiose, ni mortalités) (de Lorgeril et al., 2018). Ces travaux ont ainsi permis d'émettre l'hypothèse que les Big défensines pourraient jouer un rôle dans le contrôle du microbiote de l'huître. En effet, de nombreuses études menées notamment chez les mammifères, ont montré l'importance du système immunitaire de l'hôte dans la structuration, le façonnage et la stabilité de leur communauté microbienne et notamment le rôle des PAMs dans ces interactions (Hooper et al., 2012; Kvennefors et al., 2012; Ramirez et al., 2012). Cette fonction dans le contrôle du microbiote a récemment été mise en évidence chez un bivalve, le pétoncle *Argopecten purpuratus*, où il a été démontré que l'invalidation du gène codant la Big défensine *Ap*BD1 par interférence de l'ARN (RNAi) induisait des modifications du microbiote, suivies par des méthodes de métabarcoding (González et al., 2020).

Par ailleurs, la synthèse chimique d'un membre de cette famille, *Cg*-BigDef1, a été mise au point par le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) d'Orléans, offrant l'opportunité d'explorer les mécanismes d'action de ce peptide. Le laboratoire a ainsi montré que contrairement à la plupart des défensines, l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1 était particulièrement stable à des concentrations élevées en sels. De plus, *Cg*-BigDef1 présente une activité antimicrobienne sur un large spectre de bactéries comprenant des bactéries marines ainsi que des bactéries responsables de pathologies humaines dont des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Il a également été démontré que les domaines C- et N-terminaux agissent en synergie (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019). Il a par ailleurs été observé que *Cg*-BigDef1 s'auto-associe pour former des assemblages supramoléculaires appelés nanonets permettant d'emprisonner les bactéries et de les tuer (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019). Ce mécanisme d'oligomérisation est porté par le domaine N-terminal de la molécule (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019) et rappelle celui observé pour la défensine humaine 6 (HD6) qui contribue aux défenses intestinales chez l'homme, capturant des bactéries dans des nanonets mais qui à l'inverse de *Cg*-BigDef1 n'exerce pas d'activité antimicrobienne directe (Chu et al., 2012). Cependant, aucune donnée n'est encore disponible sur les bases moléculaires des interactions entre les bactéries et les Big défensines. Une autre inconnue majeure était le rôle de la diversification des big défensines chez l'huître *C. gigas* alors que par exemple il n'en existe qu'une seule chez le pétoncle *A. purpuratus.*

Les découvertes récentes sur les big-défensines, ancêtres marins des ß-defensines, et l'apparition de nouvelles méthodologies en ligation chimique et ingénierie des protéines ont permis de développer le projet MOSAR-Def (ANR-19-CE18-0025). Ce projet a regroupé cinq laboratoires aux expertises

complémentaires (chimistes des peptides, structuralistes, biochimistes, microbiologistes spécialistes des microorganismes marins et des pathogènes de l'Homme): le CBM (Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS , UPR4301 Orléans), la plateforme BioPark (Archamps), le CRSA (Centre De Recherche scientifique Saint-Antoine, Institut Pasteur – INSERM U938, Paris), le LIAA (Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Brésil) et mon laboratoire d'accueil, l'UMR 5244 IHPE (Montpellier). Inspiré par la biodiversité marine, le projet MOSAR-Def a pour but d'explorer la diversité fonctionnelle des big-défensines pour développer de nouveaux antimicrobiens actifs à des concentrations (physio)pathologiques en sels dérivés de défensines humaines comme alternative aux antibiotiques conventionnels. Une des tâches du projet était dédiée à l'exploration de la diversité structurelle et fonctionnelle des Big défensines de l'huître, une autre à leurs mécanismes d'action. C'est dans ces deux tâches que se sont inscrits mes travaux de thèse (co-financés par l'ANR et l'Ifremer).

D'une manière plus générale, les objectifs de cette thèse étaient ainsi de répondre aux questions encore en suspens (i) sur la relation entre la diversité structurale des Big défensines et leurs fonctions chez l'huître, et (ii) sur les mécanismes d'action antibactérienne des Big défensines et leurs interactions avec les bactéries.

Dans une première partie (chapitre 2- section I), nous avons étudié deux peptides représentatifs de la diversité moléculaire au sein de la famille des Big défensines de *C. gigas, Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 qui ont été synthétisés par nos collaborateurs du CBM d'Orléans. Dans un premier temps, une approche *in vitro* a été mise en place pour explorer le spectre d'activité de ces peptides sur une collection de bactéries cultivables appartenant au microbiote de l'huître (collaboration plateforme BioPark d'Archamps). Dans un second temps, par une approche *in vivo*, nous avons exploré l'impact d'un de ces représentants, la *Cg*-BigDef1, sur le microbiote de l'huître. Les travaux antérieurs chez l'huître et le pétoncle avaient en effet permis d'émettre l'hypothèse du rôle de ces peptides, et notamment de *Cg*-BigDef1, dans le contrôle du microbiote. Dans ce but, la première stratégie a été de tester l'invalidation *in vivo* de l'expression des gènes *Cg-big-def1-2* par la technique d'interférence par l'ARN (ARNi) présentée dans le résultat complémentaire 2 de la section I du chapitre 2. Cependant, aucune invalidation des gènes *Cg-bigdef1-2* n'a pu être observée. En conséquence, une stratégie alternative a été mise en place utilisant la protéine *Cg*-BigDef1 synthétique. L'impact sur le microbiote a été suivi par Metabarcoding 16S. Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 1 de la section I du chapitre 2.

En parallèle, nous avons exploré la diversité des gènes de *big-defensines,* sujets au phénomène de PAV (variation de présence/absence), au sein des populations d'huître et leur relation avec le statut

de résistance au POMS. Les animaux ont été collectés en France dans des zones impactées ou non par le POMS, et au Brésil où le POMS n'a à ce jour jamais été recensé (collaboration avec le LIAA de Florianopolis, Brésil). Des outils ont été développés pour le suivi des sept Big défensines de *C. gigas.* Ainsi la prévalence des sept Big défensines de l'huître creuse chez des populations naturelles françaises et chez la famille d'intérêt F14-V dont le statut de résistance/sensiblité au POMS avait été caractérisé a pu être observé. Cette étude initialement prévue au début de la thèse a été retardée de 2 ans suite à la pandémie COVID (fermeture des universités brésiliennes). Les résultats de cette étude sont présentés dans le résultat complémentaire 1 de la section I du chapitre 2.

Dans une seconde partie (chapitre 2, section II), nous avons exploré le mécanisme d'action des *Cg*-BigDefs sur les bactéries. Plus précisément nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'interaction entre *Cg*-Bigdef1 et *Staphylococcus aureus*. S'inscrivant dans le projet ANR MOSAR-Def, le choix de cette bactérie a été fait car *S. aureus* est sujette à devenir résistante aux antibiotiques (SARM, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ; SARV, *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine) et est responsable de nombreuses infections nosocomiales. Le peptide entier et les domaines N- et C-terminaux séparés ont été modifiés lors de la synthèse au CBM Orléans afin de permettre de réaliser des marquages a *posteriori.* Un groupement azide a été ajouté, afin de pouvoir les marquer par chimie click avec un fluorochrome permettant de les localiser après contact avec la bactérie cible. Cette étude a également a été réalisée en collaboration avec Albane Jouault et Lhousseine Touqui de l'institut Pasteur de Paris. A l'échelle cellulaire, les éventuels dommages membranaires causés aux bactéries ainsi que la cinétique de bactéricidie de *Cg*-BigDef1 ont été évalués. La microscopie de fluorescence à super résolution a été utilisée pour suivre l'interaction du peptide et de ses différents domaines N- et C-terminaux sur la paroi bactérienne. Des mutants de *S. aureus* dépourvus d'acides teichoïques ou avec une charge sur l'acide teichoïque modifiée ont été utilisés pour identifier les déterminants moléculaires de l'interaction. La microscopie quantitative a été utilisée pour mesurer l'effet de la mutation sur l'interaction. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un second article (en préparation) présenté dans la section II du chapitre 2.

CHAPITRE 2 : RESULTATS

SECTION I : Etude de la diversité fonctionnelle des Big-défensines de l'huître *Crassostrea gigas.*

I.1 Contexte et objectifs de l'étude

L'interaction entre le système immunitaire et le microbiote de l'hôte est nécessaire dans le maintien de l'homéostasie. Les PAMs sont des molécules clés dans cette interaction, car ils sont impliqués dans l'établissement précoce et la mise en forme du microbiote bactérien, le maintien de la tolérance aux micro-organismes bénéfiques, et ont une grande influence sur la composition de la communauté bactérienne dans le tractus intestinal, les épithéliums et les surfaces muqueuses des vertébrés et invertébrés. Les PAMs ont également un rôle important chez les arthropodes et les cnidaires dans la régulation de la composition du microbiote.

L'étude de la maladie du POMS chez l'huître a par ailleurs mis en évidence qu'il s'agit d'une maladie polymicrobienne, initiée par une infection au virus OsHV-1 µVar. Le virus cible notamment les cellules immunitaires de l'huître qui, associé à une répression de l'expression de certains PAMs, entraîne une dysbiose et une bactériémie secondaire conduisant à la mort de l'animal (de Lorgeril et al., 2018). C'est le cas des Big défensines *Cg*-BigDef1 et 2 qui voient leur expression au cours de la maladie induite chez les animaux résistants et réprimée chez les animaux sensibles.

Comme indiqué dans l'introduction, 7 gènes codant des Big-défensines ont été identifiés chez *C. gigas*, (Gerdol et al., 2020a). Parmi ces séquences, *Cg*-BigDef1,2 et 3 et *Cg*-BigDef5 et 6 se regroupent phylogénétiquement en deux groupes distincts (Gerdol et al., 2020a). Des études antérieures sur *Cg*-BigDef1,2 et 3 ont révélé une grande variabilité de la présence et l'expression de ces gènes chez l'huître creuse (Rosa et al., 2015). Cependant, seules des données fonctionnelles sur *Cg*-BigDef1 ont été obtenues jusqu'à présent (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019). Le développement d'une méthode de synthèse chimique de *Cg*-Bigdef1 par nos collaborateurs du CBM d'Orléans, a permis d'observer que ce peptide possède un large spectre d'activités antibactériennes contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif provenant de collections cliniques et environnementales (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019).

De plus, récemment, une étude sur la Big défensine du pétoncle *Argopecten purpuratus* a démontré son implication dans le contrôle de son microbiote (González et al., 2020).

Ces différentes études révélent l'importante diversité moléculaire des Big-défensines d'huître, leur large spectre d'activité, une corrélation entre leur expression et la dysbiose, et leur rôle dans le

contrôle du microbiote chez un autre bivalve. Ceci a permis, d'émettre l'hypothèse de leur implication dans la régulation du microbiote et de l'homéostasie de l'huître.

Dans **L'article 1**, Nous avons étudié le **potentiel des *Cg*-BigDefs à contrôler le microbiote de l'huître par deux approches complémentaires, l'une *in vitro* et l'autre *in vivo***. *In vitro*, nous avons caractérisé l'action antibactérienne de deux peptides représentatifs de la diversité moléculaire au sein de la famille des Big défensines de *C. gigas*, à savoir *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5. Ces deux peptides ont été synthétisés par ligation chimique native par nos collaborateurs du CBM d'Orléans. Nous avons testé l'activité antibactérienne de ces peptides synthétiques contre une collection de bactéries cultivables appartenant au microbiote de l'huître, qui ont été caractérisées par séquençage 16S et biotypage par MALDI. Les résultats ont montré que les deux peptides étaient actifs à une forte concentration en sel et ont montré de larges spectres d'activité contre le microbiote de l'huître dont certaines bactéries associées aux pathologies de *C. gigas*. Une spécificité antimicrobienne a été observée pour les deux peptides au niveau intra- et inter-générique. Nous avons également constaté que la diversification de la séquence primaire des *Cg*-BigDefs a généré (i) une spécificité, (ii) une synergie et (iii) a permis d'étendre le spectre d'activité de cette famille de peptides. Pour tester *in vivo* les effets des Big défensines sur le microbiote de l'huître, nous avons injecté *Cg*-BigDef1 synthétique dans le muscle adducteur de l'huître et avons suivi l'impact sur le microbiote par Metabarcoding 16S. Nous avons observé un changement significatif dans la diversité beta du microbiote de l'huître, renforçant ainsi l'hypothèse du rôle de *Cg*-BigDef1 dans la régulation du microbiote de l'huître.

Dans **le résultat complémentaire 1**, nous avons examiné la **variation de la présence et de l'absence (PAV pour presence-absence variations) des sept gènes codant des Big-défensines chez différentes familles de *C. gigas***. Une étude antérieure menée par Rosa et al. en 2015 a démontré une forte variation de présence-absence des gènes *Cg-bigdef1, 2* et *3* (Rosa et al., 2015). En collaboration avec Rafael Rosa du LIAA (Université fédérale de Santa Catarina – Florianópolis, Brésil), nous avons procédé au clonage moléculaire de *Cg-bigdef*7, les autres *Cg-bigdefs* ayant déjà été clonés avant cette étude. Les plasmides produits nous ont permis de tester et sélectionner des couples d'amorces spécifiques de chaque variant de *cg-bigdefs.* Ces outils nous ont ensuite permis de suivre la présence des sept gènes codant les différents Big-défensines au sein de la famille d'huîtres F14-V (matériel biologique utilisé dans l'article 1) et sur des populations naturelles d'huîtres récoltées sur les côtes françaises. Cette étude a permis de révéler que les formes de Big défensines les plus présentes dans l'ensemble des populations d'huîtres sélectionnées sont *cg-bigdef4 cg-bigdef7* et *cg-bigdef1-2* avec respectivement 100%, 98% et 41% des individus testés positifs. Aucune différence au niveau de PAV

a été observé entre les huîtres provenant de populations naturelles et la famille F14-V n'a été observée. De plus, aucune corrélation entre la présence et l'absence de *Cg-bigdefs* et la capacité à résister au virus OsHV-1 n'a été observée. Le développement d'amorces spécifiques et efficaces pour chacune des Big défensine ouvre la voie à l'étude de leur expression.

Dans le **résultat complémentaire 2**, la première stratégie testée pour étudier le rôle potentiel de *Cg*-BigDef1 dans le contrôle du microbiote de l'huître est présentée. Elle a consisté à tester l'**invalidation *in vivo* de l'expression des gènes *cg-bigdef1-2* par la technique d'interférence par l'ARN (ARNi)** (Cullen, 2006). Dans un premier temps, nous avons sélectionné une famille présentant un faible taux de PAV pour ces deux gènes, difficiles à distinguer par PCR, et la famille F32 a été choisie. Dans un second temps, nous avons étudié la cinétique d'induction de ces gènes après l'injection de *V. tasmaniensis* afin d'optimiser l'application de l'ARNi et avec un pic majeur d'expression 24 heures post-injection a été identifié. Pour tester l'invalidation des gènes, nous avons injecté un mix de trois siRNA (small interfering ribonucleic acid) ciblant des zones différentes du gène *cg-bigdef1-2*. Soixante-douze heures après la première injection, une infection expérimentale a été réalisée avec une dose sub-létale de *V. tasmaniensis* pour stimuler l'expression des gènes. En parallèle, nous avons effectué un contrôle expérimental sur un autre gène cible, *cg-mav*, dont l'invalidation avait été mise au point par Huang et al. (2017). Le suivi de l'expression des gènes après l'injection des siRNA ou après la stimulation par le Vibrio n'ont révélé aucune invalidation des gènes *cg-bigdef1-2* et *cg-mav*. En conséquence, une stratégie alternative a été mise en place qui est décrite dans l'article 1. Toutefois, la mise en place d'outils *in vivo* semble être difficile chez notre modèle *C. gigas*.

I.2 Article N°1. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota.

marine drugs

MDPI

Article

Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota

Noémie De San Nicolas [1], Aromal Asokan [2], Rafael D. Rosa [3], Sébastien N. Voisin [4], Marie-Agnès Travers [1], Gustavo Rocha [3], Luc Dantan [1], Yann Dorant [1], Guillaume Mitta [1,5], Bruno Petton [6], Guillaume M. Charrière [1], Jean-Michel Escoubas [1], Viviane Boulo [1], Juliette Pouzadoux [1], Hervé Meudal [2], Karine Loth [2,7], Vincent Aucagne [2], Agnès F. Delmas [2], Philippe Bulet [4,8], Caroline Montagnani [1] and Delphine Destoumieux-Garzón [1,*]

1 IHPE, University Montpellier, CNRS, Ifremer, University Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier, France
2 Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS, 45071 Orléans, France
3 Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil
4 Plateforme BioPark d'Archamps, Archparc, 74160 Archamps, France
5 Ifremer, IRD, ILM, Université de Polynésie Française, UMR EIO, Vairao 98179, French Polynesia
6 Ifremer, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale, 29840 Argenton-en-Landunvez, France
7 UFR ST, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France
8 CR UGA, IAB, INSERM U1209, CNRS UMR5309, 74160 La Tronche-Archamps, France
* Correspondence: delphine.destoumieux.garzon@ifremer.fr; Tel.: +33-467144625

Abstract: Big defensins are two-domain antimicrobial peptides (AMPs) that have highly diversified in mollusks. *Cg*-BigDefs are expressed by immune cells in the oyster *Crassostrea gigas*, and their expression is dampened during the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), which evolves toward fatal bacteremia. We evaluated whether *Cg*-BigDefs contribute to the control of oyster-associated microbial communities. Two *Cg*-BigDefs that are representative of molecular diversity within the peptide family, namely *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, were characterized by gene cloning and synthesized by solid-phase peptide synthesis and native chemical ligation. Synthetic peptides were tested for antibacterial activity against a collection of culturable bacteria belonging to the oyster microbiota, characterized by 16S sequencing and MALDI Biotyping. We first tested the potential of *Cg*-BigDefs to control the oyster microbiota by injecting synthetic *Cg*-BigDef1 into oyster tissues and analyzing microbiota dynamics over 24 h by 16S metabarcoding. *Cg*-BigDef1 induced a significant shift in oyster microbiota β-diversity after 6 h and 24 h, prompting us to investigate antimicrobial activities in vitro against members of the oyster microbiota. Both *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were active at a high salt concentration (400 mM NaCl) and showed broad spectra of activity against bacteria associated with *C. gigas* pathologies. Antimicrobial specificity was observed for both molecules at an intra- and inter-genera level. Remarkably, antimicrobial spectra of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were complementary, and peptides acted synergistically. Overall, we found that primary sequence diversification of *Cg*-BigDefs has generated specificity and synergy and extended the spectrum of activity of this peptide family.

Keywords: antibacterial peptide; beta defensin; diversity; evolution; microbiome; invertebrate; mollusk

check for updates

Citation: De San Nicolas, N.; Asokan, A.; Rosa, R.D.; Voisin, S.N.; Travers, M.-A.; Rocha, G.; Dantan, L.; Dorant, Y.; Mitta, G.; Petton, B.; et al. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 745. https://doi.org/10.3390/md20120745

Academic Editor: Céline Zatylny-Gaudin

Received: 28 October 2022
Accepted: 22 November 2022
Published: 26 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

From invertebrates to humans, active crosstalk between the host immune system and the microbiota plays a critical role in maintaining homeostasis [1,2]. Antimicrobial peptides (AMPs), among other immune effectors, are key players in host-microbe interactions [3–6].

AMPs encompass a highly diverse array of molecules widespread in multicellular organisms, which were initially described for their direct antimicrobial activities against pathogens [7,8]. AMPs are multifunctional: they are involved in the early establishment and shaping of bacterial microbiota; they maintain tolerance to beneficial microbes and greatly affect community composition in the guts, epithelia, and mucosal surfaces of mammals through direct and indirect activities against commensal bacteria [9,10]. In other animal branches as well, AMPs play an important role in host-microbiota interac- tions [5,11]. In arthropods such as insects and crustaceans, AMPs regulate microbiota composition [6,12,13]. In cnidarians, they are crucial in shaping microbial colonization during *Hydra* development [14].

Several families of AMPs have been identified in *Crassostrea gigas* oysters (mollusks) and characterized in terms of expression, structure, and function [15–17]. AMP families in oysters have widely diversified; they are expressed at low concentrations by immune cells, hemocytes, and epithelia [15]. Recent studies have highlighted the role of host-microbiota interactions in oyster health [18,19]. The structure of the oyster microbiota is modified under stressful conditions promoting the development of opportunistic infections [18]. The resulting dysbiosis can be associated with significant mortality. In particular, *C. gigas* suffers from a polymicrobial disease called the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), which

is triggered by infection with the OsHV-1 µVar virus and affects the oyster's immune cells. Interestingly, hemocyte infection has been associated with attenuation of AMP expression with a loss of barrier function leading to dysbiosis and fatal bacteremia [20,21]. Oyster big defensins are among the peptide families whose expression is altered during POMS, suggesting that they may contribute to the control of oyster microbial communities [21].This hypothesis is further supported by the recent finding that a big defensin mediates microbial shaping in another bivalve mollusk, the scallop *Argopecten purpuratus* [22].

is triggered by infection with the OsHV-1 µVar virus and affects the oyster's immune cells. Interestingly, hemocyte infection has been associated with attenuation of AMP expression with a loss of barrier function leading to dysbiosis and fatal bacteremia [20,21]. Oyster big defensins are among the peptide families whose expression is altered during POMS, suggesting that they may contribute to the control of oyster microbial communities [21].This hypothesis is further supported by the recent finding that a big defensin mediates microbial shaping in another bivalve mollusk, the scallop *Argopecten purpuratus* [22].

Knowledge of big defensins has significantly increased over the past decade, particularly with the growing availability of next-generation sequencing data. Phylogenetic analyses have shown that big defensins are a family of two-domain AMPs that expanded in mollusks as a result of independent lineage-specific tandem gene duplications, followed by rapid molecular diversification [23,24]. Canonical big defensins harbor an N-terminal hydrophobic domain specific to the peptide family and a C-terminal domain that resembles β-defensins [24,25]. Big defensins have diversified in the oyster *C. gigas* with up to seven distinct sequences described [24]. Among them, *Cg*-BigDef1-3 and *Cg*-BigDef5-6 form two phylogenetically distinct groups [24]. *Cg*-BigDefs are expressed by oyster hemocytes [23]. To date, functional data have only been acquired on *Cg*-BigDef1. This was made possible by developing the chemical synthesis of *Cg*-BigDef1 [26,27]. Synthetic *Cg*-BigDef1 showed a broad range of antibacterial activities against both Gram-positive and Gram-negative bacte- ria from clinical and environmental collections [27]. A remarkable feature of its mechanism of action was its ability to self-assemble in nanonets and trap and kill bacteria [27].

In this paper, we first tested the in vivo ability of *Cg*-BigDefs to control the commensal oyster microbiota by monitoring microbiota composition in oysters injected with *Cg*-BigDef1. Second, we searched whether primary sequence diversification among oyster big defensins translates into functional diversification. To answer this second question, we cloned the genomic sequences and chemically synthesized *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, which are representative of sequence diversity. Antimicrobial activity spectra of *Cg*-BigDefs were determined in vitro against a collection of culturable bacteria belonging to the oyster microbiota. Our data support a role for *Cg*-BigDefs in the regulation of oyster microbiota composition and show that the sequence diversity between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 generates antimicrobial specificity and synergy against members of the oyster microbiota, including bacteria associated with significant pathologies.

2.Results

2.1.*In Vivo Activity of Cg-BigDef1 on Oyster Commensal Microbiota*

We tested the effect of *Cg*-BigDef1 on oyster commensal microbiota by injecting the synthetic peptide into the adductor muscle (5 µM *Cg*-BigDef1 relative to oyster flesh volume) of anesthetized oysters. An injection of sterile artificial seawater (ASW), i.e., the solvent used for solubilizing synthetic *Cg*-BigDef1, was used as a control (Figure 1A). Since substantial inter-individual variations were observed in oyster microbiota composition [28] and oyster genetics influences microbiota composition [29], we used a pathogen-free oyster family of full siblings for our experiments (i.e., oysters with limited environmental and genetic variation; see Materials and Methods). Microbiota composition was monitored in whole tissue extracts by 16S metabarcoding.

We first verified that anesthesia had no significant effect on the homeostasis of oyster commensal microbiota. To this end, we compared the microbiota of eight non-treated control oysters (NTC, i.e., not anesthetized, not injected with ASW) and eight anesthetized control oysters (AC, i.e., oysters kept dry for 12 h and anesthetized for 2 h). This comparison was performed at time 0 before oysters were injected with *Cg*-BigDef1 or sterile artificial seawater, used as a control. We then examined the effect of *Cg*-BigDef1 on oyster commensal microbiota by comparing the microbiota of eight oysters injected with *Cg*-BigDef1 or ASW (control) at three time points after injection (0, 6, and 24 h) (Figure 1A). To compare microbiota composition over time and conditions, we generated a global dataset from a total of 7,320,778 raw reads obtained by Illumina MiSeq sequencing of the 64 oysters analyzed. Sufficient sequencing depth was confirmed by analyses of rarefaction curves of species richness (Supplementary Figure S1). We retained 6,371,737 sequences corresponding to 632 Amplicon Sequence Variants (ASV) for further analyses after filtering, chimera removal,clustering by dbOTU3, and rare ASVs filtration.

Anesthesia had no significant effect on oyster microbiota. Indeed, AC oysters did not differ from NTC control oysters in terms of α-diversity (measured here by the observed richness and Shannon H indices) nor β-diversity (measured by the Bray–Curtis dissimi- larity matrix estimates) (Supplementary Figure S2, Table S1) or relative abundance of the 10 most abundant genera in AC and NTC animals (Supplementary Figure S2, Table S2). Moreover, oysters injected with *Cg*-BigDef1 did not differ from oysters injected with ASW in terms of α-diversity as estimated with the observed richness and Shannon's H indexes (Supplementary Figure S3).

By contrast, *Cg*-BigDef1 altered the oyster microbiota in terms of β-diversity. This was determined using a final matrix of 632 ASVs distributed among the 48 oyster micro- biota samples and the three kinetic points after normalization/rarefaction and removal of low abundance ASVs (less than four reads in at least four individuals). Differences are depicted by principal coordinate analysis (PCoA) based on the Bray–Curtis dissimilarity matrix for T6 and T24 (Figure 1B). Subsequent statistical analyses demonstrated that at T0 (i.e., 10 min after injection with *Cg*-BigDef1 or ASW), oyster microbiota did not differ be-tween conditions (p = 0.779). The effect of *Cg*-BigDef1 became visible from T6 (p = 0.00064) to T24 (p = 0.00488) (PERMANOVA based on 100,000 permutations) (Tables S2 and S3), in agreement with the antimicrobial activity of *Cg*-BigDef1 measurable in vitro within 24 h [27]. No significant differences were observed among the 10 most abundant gen- era between *Cg*-BigDef1 and ASW-injected oysters (Figure 1C, Supplementary Figure S4). Significant differences were only observed at the ASV level. Overall, at T6, differential abun- dance analysis identified 156 ASVs, which were significantly enriched or impoverished in *Cg*-BigDef1-treated oysters. Among these, 47 ASVs were affiliated with 44 known genera(Figure 1D). Similar results were obtained at T24 (Supplementary Figure S5). While differ- ences were observed in microbiota composition, the relative abundance of total microbiota did not vary significantly upon *Cg*-BigDef1 treatment, as determined by 16S quantitative PCR (Supplementary Figure S6).

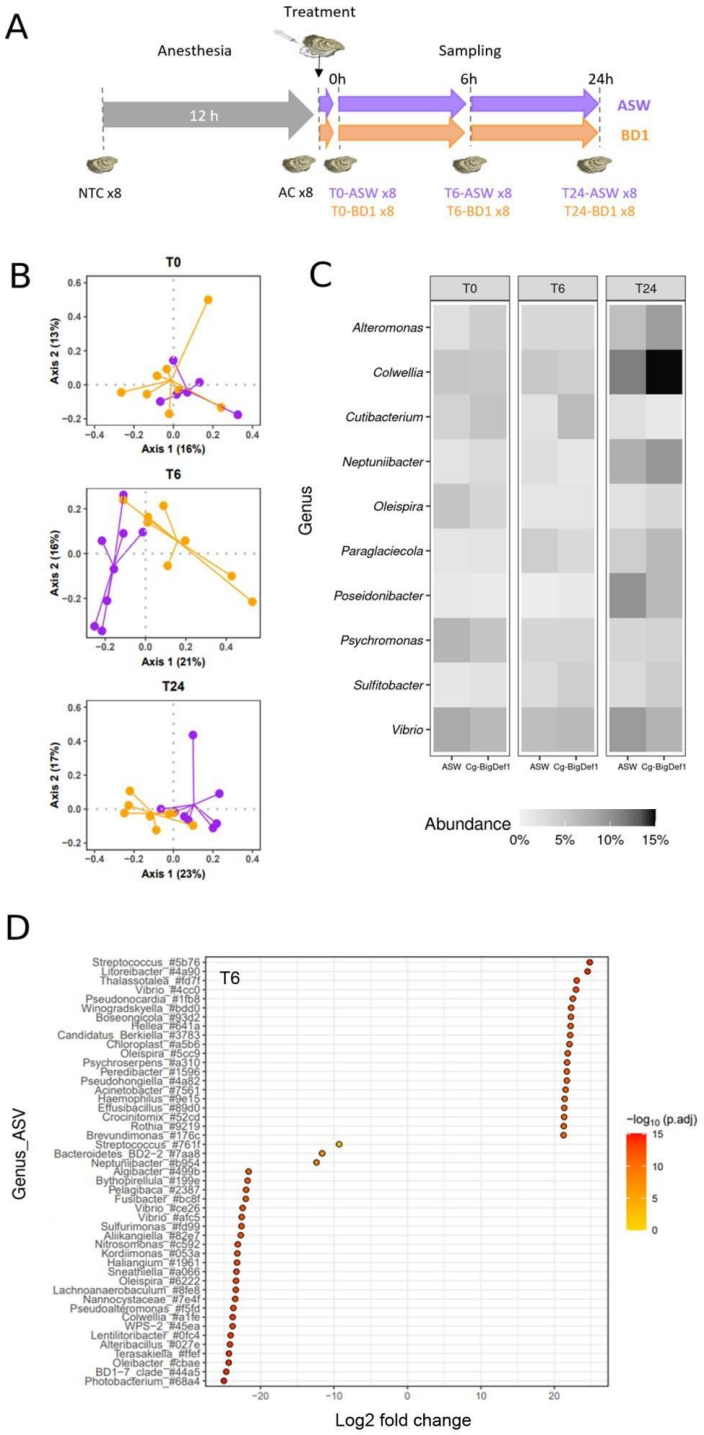


Figure 1. Effects of *Cg*-BigDef1 on β-Diversity and taxonomic composition of oyster microbiota. (**A**): Schematic representation of the experimental design used to test the impact of *Cg*-BigDef1 on the oyster microbiota after injection. From the same batch of oysters, 8 non-treated oysters were collected (NTC), the remaining oysters were anesthetized and 8 oysters were collected after 12 h (AC). The oysters were then injected with either *Cg*-BigDef1 at a final concentration of 5 µM (BD1) or with an equal volume of ASW (control). Oyster sampling was performed 10 min (T0), 6 h (T6) and 24 h (T24) after injection. (**B**): PCoA biplot based on Bray–Curtis distances showing differences between oysters injected with *Cg*-BigDef1 (BD1, orange) or ASW (purple) at T0, T6 and T24. (**C**): Mean relative abundance of bacterial genera in oyster microbiota, grouped according to oyster treatment and time after treatment. The heatmap shows the frequencies of the 10 most abundant bacterial genera in each condition. (**D**): Differential abundance analysis (DESeq2) at the ASV level between oysters injected

with ASW and *Cg*-BigDef1 at T6. Each circle represents an ASV showing significant log_2Foldchange (adjusted *p* value < 0.01) between experimental conditions. Positive log_2FoldChange means enrich- ment in *Cg*-BigDef1-injected oysters and negative log_2FoldChange means enrichment in ASW-injected oysters. Taxa are denoted by their attributed genus followed by the first four characters of the ASV barcode attributed by SAMBA. Note that ASVs without genera annotation were not represented in the figure.

2.2. Establishment of a Collection of Culturable Bacteria from *C. gigas* Microbiota

To further investigate the role of *Cg*-BigDefs in controlling the oyster microbiota, we built a collection of culturable bacterial strains representing 21 genera associated with healthy and diseased *C. gigas* [30,31]. Among them, we included genera repeatedly asso- ciated with oyster diseases, such as *Arcobacter*, *Aeromonas*, *Marinomonas*, *Marinobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Sulfitobacter*, *Tenacibaculum*, and *Vibrio* [21,30,32,33]. We obtained 16S rDNA sequences (V3-V4 loop) for 46 bacteria isolated from oysters with known health status (healthy or diseased). In addition, we purchased three type-strains of the genera of interest that were needed as a reference for the MALDI database (one *Pseudoalteromonas* and two *Alteromonas*). All 16S sequences exhibited ≥ 95% identity with a known type-strain sequence included in the analysis (Figure 2). For 41 strains of the 50 strains in the collection, we acquired molecular mass fingerprints by MALDI Biotyping. Strains with taxonomic assignation by 16S phylogeny but no match in MALDI databases were used to enrich the MALDI databases of marine bacteria https://doi.org/10.12770/2 61d7864-a44c-43ab-b0c6-57fdaf7360ac (accessed on 14 October 2022).

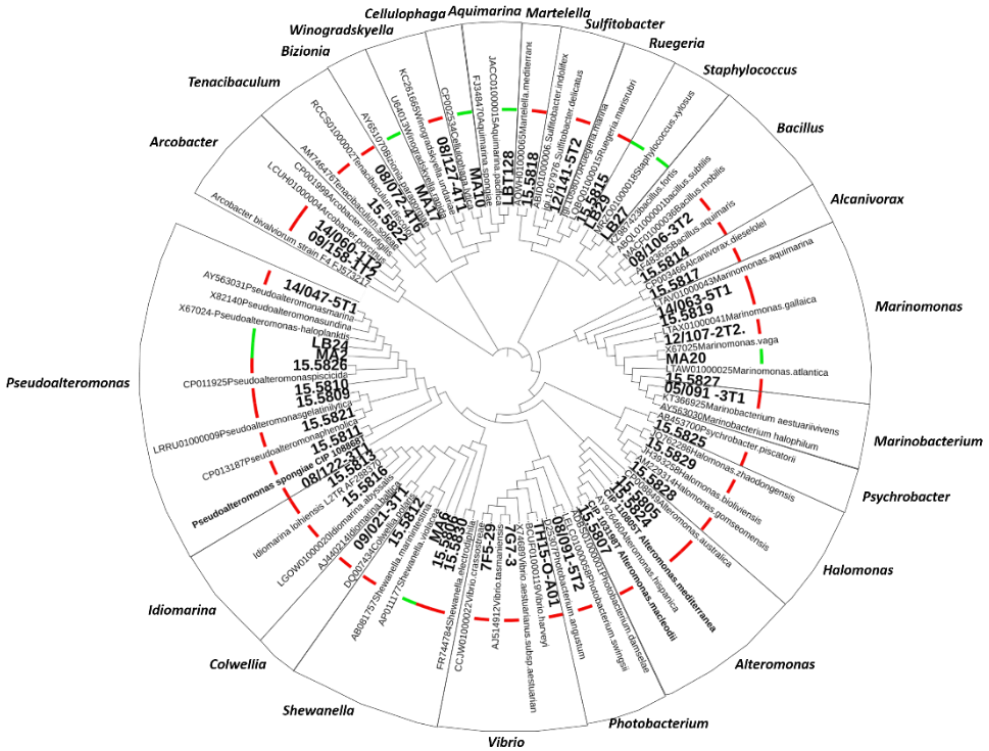


Figure 2. Constitution of a collection of oyster microbiota culturable bacteria. Phylogeny of strains isolated from the *C. gigas* oyster microbiota based on the V3–V4 loop alignment of bacterial 16S rDNA by a Maximum Likelihood method with the Kimura 2-parameter model in MEGA X (295-bp sequences, 105 sequences). Oyster isolates are indicated in boldface. The different genera are indicated. The pathological context at the time of isolation is indicated by a thick bar (red: diseasedand green: healthy oysters).

2.3. Gene Cloning and Chemical Synthesis of Cg-BigDef1 and Cg-BigDef5

To explore the impact of *Cg*-BigDefs sequence diversification on the control of oyster microbiota, we focused on *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, which belong to two phylogenetically distinct groups within this peptide family, as shown previously in [24].

We first cloned the gene encoding *Cg*-BigDef5 (*Cg-bigdef5* gene; GenBank: OP191676). Two distinct exons were found to encode the two putative domains of the molecule (Figure 3A), as previously found in *Cg-bigdef1* [27]. The first exon of *Cg-bigdef5* encodes the predicted signal peptide (or predomain, 23 residues), the prodomain (13 residues), and the N-terminal domain of the mature *Cg*-BigDef5 (42 residues). The second exon encodes a short linker (3 residues) and the C-terminal β-defensin-like domain (42 residues), with the canonical spacing of cysteines for big defensins [Cys-Xaa$_{(4–14)}$-Cys-Xaa$_{(3)}$-Cys-Xaa$_{(13–14)}$- Cys-Xaa$_{(4–7)}$-Cys-Cys] [27] (Figure 3B). After posttranslational modifications (which include removal of the preprodomain, oxidation of the three disulfide bridges, glutamine to py- roglutamic acid conversion, and C-terminal amidation by removal of a glycine residue), the calculated molecular weight (MW) of *Cg*-BigDef1 was 10,692 Da (93 amino acids). The calculated MW for *Cg*-BigDef5 was 9977 Da (86 amino acids) after the removal of the pre- prodomain, disulfide bridge oxidation, and C-terminal amidation by removal of a glycine residue (Figure 3C). Overall the two mature peptides show 62.8 % identity (54/86 identical residues) with a calculated positive net charge of +6 and +7 at pH = 7.4 for *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, respectively.

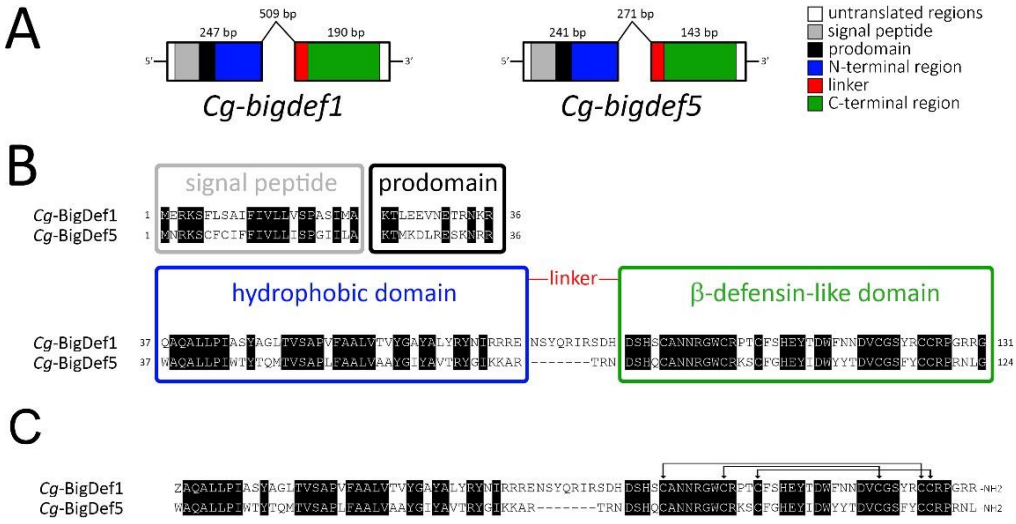


Figure 3. Gene structure and primary sequence of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5. (**A**): Schematic representation of *Cg*-BigDef1 (GenBank: JN251125) and *Cg*-BigDef5 (GenBank: OP191676) genes. Exons are represented by boxes; introns are represented by lines. The length of each exon/intron is displayed. Grey and black boxes represent nucleotide sequences encoding the signal peptides and prodomains, respectively, while white boxes represent untranslated regions. Blue, red and green boxes represent nucleotide sequences encoding the N-terminal hydrophobic domain, the linker region and the C-terminal β-defensin-like domain of the mature big defensins, respectively. (**B**): Pre- propeptides. Alignment of *Cg*-BigDef1 (131 amino acid residues) and *Cg*-BigDef5 (124 amino acidresidues) precursor sequences. The signal peptides, prodomains, the hydrophobic (N-terminal) and the β-defensin-like (C-terminal) domains are in boxes. Conserved amino acids are highlighted in black. The linker region is shown in red. (**C**): Putative mature peptides. Alignment of *Cg*-BigDef1 (93 amino acid residues) and *Cg*-BigDef5 (86 amino acid residues). *Cg*-BigDef1 starts with a pyrog-lutamic acid (Z) and ends with an amidated arginine (R-NH2). *Cg*-BigDef5 ends with an amidated leucine (L-NH2). Both *Cg*-BigDef1(1–93) and *Cg*-BigDef5(1–86) are folded by three intramoleculardisulfide bridges as shown by arrows.

The N-terminal domain of both peptides is hydrophobic and positively charged in the region preceding the linker due to repeats of basic residues such as arginine in *Cg*-BigDef1 and lysine in *Cg*-BigDef5. One remarkable difference between the two big defensins isthe length of the linker that connects the two domains, with 10 amino acid residues in *Cg*-BigDef1 and only three amino acid residues in *Cg*-BigDef5.

Cg-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were synthesized using a combination of solid-phase peptide synthesis, native chemical ligation, and oxidative folding as previously described for *Cg*-BigDef1 [26,27] (see Supplementary Figure S6 for HPLC and mass spectrometry characterization). Synthetic *Cg*-BigDef1 (1–93) corresponds to mature *Cg*-BigDef1 (Figure 3C) [27]. Synthetic *Cg*-BigDef5 (1–86) corresponds to mature *Cg*-BigDef5 (Figure 3C) with a substitu-tion of Met14 by norleucine (Nle) (this study). Detailed optimization of *Cg*-BigDef5 (1–86) synthesis and NMR structure determination will be described elsewhere [34].

2.4.Specificity, Synergy, and Complementary Broad-Spectrum Activity of Cg-BigDef1 and Cg-BigDef5 against Bacteria from the Oyster Microbiota

We used synthetic *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 to study their antibacterial activities against bacteria from the microbiota of *C. gigas*, including strains relevant to oyster infections. All assays were performed under physiological conditions, i.e., at a high salt concentration (400 mM NaCl).

Cg-BigDef1 showed antibacterial activity against 11/26 strains from *C. gigas* microbiota (Table 1). In total, *Cg*-BigDef1 was bactericidal against six strains. High bactericidal activity was observed against *Bacillus* sp. 15.5814 (MIC = 40 nM, MBC = 310 nM). In addition, bactericidal activity was recorded against *Alcanivorax* sp. 15.5817, *Alteromonas* sp. 15.5805, *Halomonas* sp. 15.5829, *Pseudoalteromonas* sp. 15.5809 and *Winogradskyella* sp. 08.27-4T1 with MICs in the range of 1.25–10 µM and MBCs in the range of 5–10 µM. Up to 10 µM, *Cg*-BigDef1 was inhibitory but not bactericidal against five additional strains, namely *Aquimarina* sp. LTB 128, *Marinomonas* sp. 15.5827, *Martellela* sp. 15.5818, *Shewanella* sp. 15.5830, and *Tenacibaculum* sp. 08.072-4T6 with MICs ranging from 1.25 to 5 µM (Table 1). All strains except *Aquimarina* sp. LTB 128 were isolated from diseased oysters.

Cg-BigDef5 tended to be less active than *Cg*-BigDef1. Still, it showed antibacterial activity against 9/26 tested strains from the *C. gigas* oyster microbiota (Table 1). The highest activity was recorded against *Marinomonas* sp. 14.063 with a MIC of 0.6 µM. *Cg*-BigDef5 was also active against *Alteromonas* sp. 15.5805, *Aquimarina* sp. LTB 128, *Bacillus* sp. 15.5814, *Marinobacterium* sp. *05.091-3T1*, *Martellela* sp. 15.5818, *Ruegeria* sp. 15.5815, *Shewanella* sp. 15.5830, and *Sulfitobacter* sp. 12.141-5T2 with MICs ranging from 1.25 to 10 µM. No bactericidal activity was observed at concentrations 10 µM.

Overall, *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were both active at a salt concentration (400 mM NaCl) pertinent to marine bacteria. They showed strain specificity and complementary activity spectra against the marine strains of the oyster microbiota collection: five strains were susceptible to both peptides, whereas six and four strains were only susceptible to *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, respectively. Only *Cg*-BigDef1 was active against *Marinomonas* sp. 15.5827, *Pseudoalteromonas* sp. 15.5809, and *Tenacibaculum* sp. 08.072-4T6, *Alcanivorax* sp. 15.5817, *Halomonas* sp. 15.5829, *Winogradskyella* sp. 08.27-4T1. Conversely, only *Cg*-BigDef5 was active against *Marinobacterium* sp. 05.091-3T1 and *Marinomonas* sp. 14.063, *Ruegeria* sp. 15.5815 and *Sulfitobacter* sp. 12.141-5T2. Both *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were active against *Alteromonas* sp. 15.5805. These data show that *Cg*-BigDef sequence diversity extendsthe activity spectrum at the inter-genera level. The example of *Marinomonas* sp. strains, which are susceptible to different *Cg*-BigDefs, highlights an undiscovered specificity of *Cg*-BigDefs and illustrates that their sequence diversity extends their activity spectrum at an intra-genus level as well. It is important to note that all the strains mentioned here have a significant role in oyster health: they have been isolated from OsHV-1-infected oysters https://doi.org/10.12770/0d529567-92fd-4dcd-9d9c-70e98ab6f772 (accessed on 14 October 2022), and several of them belong to a set of conserved genera that proliferate during OsHV-1-induced dysbiosis [30].

Table 1. Activity Spectrum and Synergy of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 against bacteria associatedwith disease in the oyster.

Strain	*Cg*-BigDef1 (1–93)		*Cg*-BigDef5 (1–86)		FIC
	MIC (µM)	MBC (µM)	MIC (µM)	MBC (µM)	Index
Alcanivorax sp. 15.5817	**2.50**	**5**	>10	>10	*nt*
Alteromonas sp. 15.5805	**1.25**	**5**	**2.50**	>10	**1**
Aquimarina sp. LTB 128	**5**	>10	**2.50**	>10	*nt*
Bacillus sp. 15.5814	**0.04**	**0.31**	**1.25**	>10	**0.35**
Halomonas sp. 15.5829	**2.50**	**10**	>10	>10	*nt*
Marinobacterium sp. 05.091-3T1	>10	>10	**2.50**	>10	*nt*
Marinomonas sp. 14.063	>10	>10	**0.60**	>10	*nt*
Marinomonas sp. 15.5827	**2.50**	>10	>10	>10	*nt*
Martellela sp. 15.5818	**2.50**	>10	**1.25**	>10	*nt*
Pseudoalteromonas sp. 15.5809	**10**	**10**	>10	>10	*nt*
Ruegeria sp. 15.5815	>10	>10	**10**	>10	*nt*
Shewanella sp. 15.5830	**1.25**	>10	**10**	>10	*nt*
Sulfitobacter sp. 12.141-5T2	>10	>10	**2.50**	>10	*nt*
Tenacibaculum sp. 08.072-4T6	**1.25**	>10	>10	>10	*nt*
Winogradskyella sp. 08.27-4T1	**1.25**	**5**	>10	>10	*nt*

MIC values reported in micromoles per liter (µM) refer to the minimum concentration required to achieve 100% growth inhibition. MBC values (µM) refer to the minimum concentration required to kill 100% of the bacteria. Activities were measured in Zobell medium at 400 mM NaCl. All bacteria were isolated from *C. gigas* during mortality episodes. Under the test conditions, no activity was recorded against *Amphitrea* sp. 14.114-3T2, *Arcobacter* sp. 08.122-3T1, *Arcobacter* sp. 14.060-1T2, *Colwellia* sp. 09.021-3T1, *Idiomarina* sp. 15.5813, *Photobacterium* sp. 08.091- 5T2, *Psychrobacter* sp. 15.5825, *Shewanella* sp. 15.5812, *Vibrio crassostreae* 7F5-29, *Vibrio harveyi* Th15-O-A01, *Vibrio tasmaniensis* 7G7-3. The synergies of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were measured as described previously [35]. Results are expressed as FIC index values according to the following formula: FIC = [*Cg*-BigDef1]/$MIC_{Cg\text{-}BigDef1}$+ [*Cg*-BigDef5]/$MIC_{Cg\text{-}BigDef5}$, where $MIC_{Cg\text{-}BigDef1}$ and $MIC_{Cg\text{-}BigDef5}$, are the MICs of the *Cg*-BigDef1 and *Cg*- BigDef5 tested alone and [*Cg*-BigDef1] and [*Cg*-BigDef1] are the MICs of the two peptides tested in combination. FIC index values are interpreted as follows: <0.5, strong synergy; 0.5 to 1, synergy; 1 to 2: additive effect; 2, no effect; >2, antagonism. *nt* stands for not tested. Boldface is used for active concentrations (MIC, MBC) and synergistic combinations of *Cg*-BigDefs (FIC).

Finally, we tested the synergies of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, by the checkerboard microtiter assay, against a Gram-positive and a Gram-negative strain displaying the lowest MICs for both peptides. The two big defensins acted synergistically against both strains. Indeed, synergy was recorded against the Gram-negative *Alteromonas* sp. 15.5805, with a fractional inhibitory concentration (FIC) index value of 1 (Table 1). Strong synergy was observed against the Gram-positive *Bacillus* sp. 15.5814 with an FIC value of 0.35 (Table 1).

To summarize, *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 exhibit a broad activity spectrum. They show strain specificity, as well as complementary activities. Together they inhibit the growth of 15/26 strains tested. Finally, they act synergistically against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Altogether, these data show that sequence diversification of *Cg*-BigDefs has generated antimicrobial specificity and extended the activity spectrum of the peptide family against marine bacteria from the oyster microbiota, including strains associated with oyster pathologies.

3.Discussion

We found that oyster big defensins (*Cg*-BigDefs), a family of AMPs that have widely diversified in mollusks, can alter oyster microbiota composition in vivo as a result of direct antimicrobial activity against members of the oyster microbiota. Remarkably, we observed that sequence diversification had generated antimicrobial specificity as well as synergy between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, thereby extending the activity spectrum ofthe peptide family and increasing its potency.

Until now, it was largely unknown whether AMPs could shape the microbiota of mollusks, while this had been demonstrated in other animal phyla, particularly mammals [4], cnidarians [14], and insects [6]. Furthermore, when available, antimicrobial data have been largely acquired on microorganisms unrelated to molluscan health [27,36,37]. The lack of

knowledge on immune/microbiota interactions in mollusks is due to several methodologi- cal obstacles and knowledge gaps. Among them, it is worth mentioning (i) the only recent description of molluscan microbiomes, accelerated by facilitated access to next-generation sequencing (for oysters, see [18,19,31]); (ii) the lack of well-characterized culturable micro- biota; and (iii) difficulties in producing a sufficient amount of high-quality AMPs and in developing efficient and reliable tools for gene knock-in, knock-out, and knock-down in several molluscan species. These difficulties were circumvented in this work by the chem- ical synthesis of pure big defensins from *C. gigas* according to our previously described procedure [26] and the construction of a collection of culturable bacteria isolated from oysters with known health status (identification by 16S phylogeny and MALDI Biotyping). With such tools, we showed that *Cg*-BigDefs have broad-spectrum activities against bacte- rial strains from the oyster microbiota, including strains associated with major infectious diseases in oysters. In line with these observations, in vivo, *Cg*-BigDef1 induced significant changes in oyster microbiota β-diversity. This is consistent with in vivo results recently obtained by Schmitt and collaborators in the scallop *Argopenten purpuratus* [22]. The au-thors showed that the big defensin *Ap*BD1 and the bactericidal/permeability-increasing protein *Ap*LBP/BPI1 have the potential to shape the hemolymph microbiota of the scallop, particularly by regulating the proliferation of γ-proteobacteria. Our present work shows that changes in microbiota composition observed in vivo are linked to direct antimicrobial activities of *Cg*-BigDefs against bacteria belonging to the microbiota. Similar to human α-defensin HD-5 in the mice gut [38], *Cg*-BigDef1 did not alter the overall bacterial load in oysters. Moreover, *Cg*-BigDef1 had no negative effects on oyster microbiota diversity, prob- ably due to the specificity of the peptides, which as host-defense effectors, have evolved to acquire antimicrobial activity against given bacterial strains without disrupting the entire oyster microbiota. Supporting this hypothesis, microbiota alterations were mainly visible at the ASV taxonomic level, indicating high specificity. For instance, upon treatment with *Cg*-BigDef1, we observed a reduced amount of *Vibrio* (γ-proteobacteria), which was in agreement with the in vitro activity of *ApBD1* in the scallop [22]. Changes were visible in whole-tissue microbiota. However, microbiota composition was shown to vary significantly between oyster tissues (hemolymph, gut, gills, mantle) [28]. Therefore, it is likely that more contrasting effects of *Cg*-BigDefs occur on specific tissue microbiota, particularly in the hemolymph, which carries the *Cg*-BigDef-producing cells, the hemocytes [23]. With mounting evidence on the regulatory role of AMPs on host-microbiota across animal phyla, including mollusks ([22], this study), one key question to be addressed in the future is how this affects the functions the microbiota serve in their host tissues.

A striking feature of the evolutionary history of big defensins is their extensive diversi- fication in some molluscan species, particularly the oyster *C. gigas* and the mussels *Mytilus galloprovinciallis* and *Dreissena rostriformis*, while they did not diversify in other species (e.g., the scallop *A. purpuratus*) [24]. The functional consequences of this diversification have remained unexplored. Our present results demonstrate that sequence diversification has generated specificity and synergy among *Cg*-BigDefs, as evidenced by two members of the *Cg*-BigDef family, *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5. Antibacterial specificity was observed from the bacterial genus down to the strain level within a given genus. Depending on bacterial strains, *Cg*-BigDefs were bactericidal or simply inhibitory, with contrasting MICs, from 40 nM to 10 µM. This suggests that distinct mechanisms of action can underpin *Cg*-BigDefs activities against the diversity of bacteria encountered in the oyster microbiota. Activities in the nanomolar range are consistent with receptor-mediator activities [36,39], while activities in the micromolar range are typically reported for membrane-active AMPs [40]. In oyster defensins (*Cg*-Defs), which have also diversified in oysters, we previously observed that sequence variation altered the activity of the peptide (more or less potent) without affecting the peptide range of activity [35]. Here, we also showed that sequence diversification was key to generating antimicrobial synergy between two members of the *Cg*-BigDef family. Similarly, sequence diversification generated synergy in two other families of oyster AMPs, the defensins *Cg*-Defs and the proline-rich peptides *Cg*-Prps [35]. Although not studied

in the present article, synergy also occurred between AMP families, as observed betweenthe bactericidal permeability-increasing protein *Cg*-BPI, *Cg*-Prps, and *Cg*-Defs in the oyster *C. gigas* and between Attacins and Diptericins in the insect *D. melanogaster* [41]. Thus, thein vivo effects of *Cg*-BigDefs on the shaping of oyster microbiota are likely to extend well beyond the observations in this paper, where we tested the effects of only one member ofthe *Cg*-BigDef family. This was also the case in the *A. purpuratus* scallop study. However, in scallops, unlike other molluscan species (oysters and mussels) big defensins have not diversified and the activity of *Ap*BD1 recapitulates that of the entire AMP family. Overall, we have highlighted an important role for sequence diversification in increasing the antimicrobial potential of oyster *Cg*-BigDefs, by generating both antimicrobial specificity and synergy, an observation that extends at least to two additional peptide families, *Cg*-Defs and *Cg*-Prps. We can hypothesize that some species of bivalve mollusks, such as oysters, have diversified their repertoire of AMPs to increase their adaptive potential while constantly exposed to diversified microbial communities.

While sequence diversification was shown to be a major asset in terms of antimicrobial defenses, we still do not know how antimicrobial specificity is generated. We have shown that changes in primary structure between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 (62.8% sequenceidentity) produced antibacterial specificity. *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 have similar bio- physical parameters in terms of size (86–93 amino acids) and positive net charge at neutral pH (+6 to +7 at pH = 7.4, i.e., oyster physiological pH), with conserved domains, as recently determined by NMR ([34]; Figure 4 top panel). The position and pairing of cysteines are also similar. A major difference observed between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 was the length and primary sequence of the linker region connecting the N-terminal hydrophobic domain and the C-terminal β-defensin-like domain, whereas the five residues linker of *Cg*-BigDef5 is exposed to the solvent, the ten residues linker of *Cg*-BigDef1 plays a key role in the 3D compaction of the protein by being buried at the interface of the two domains and locking their relative orientation [27]. In *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5, the orientation of the N- and C-terminal domains differs by around 100° (dihedral angle value between the β-sheet of the N-term domain and the last strand of the β-sheet of the C-term domain (Figure 4 top panel), leading the α-helix of the C-term domain not involved in the interac-tion interface between the two domains. We also looked at surface properties, as the surface charge is considered critical for the interactions of AMPs with bacteria [42]. However, no real quantitative difference can be observed between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5. Both are highly cationic, and positive charge repartition is shared by the N-terminal and C-terminal domains, yet the positive surface of each molecule is on opposite sides (Figure 4 middle panel). Since the salt concentration in the oyster is very high (similar to seawater), charges may be shielded and might not be the primary type of interaction that is important for bacterial interaction. Instead, the hydrophobicity of the big defensin surface could play a major role in how the molecules approach their target. As seen in Figure 4 (bottom), *Cg*-BigDef1 displays a more hydrophobic C-terminal domain than *Cg*-BigDef5, whereas *Cg*-BigDef5 displays a more hydrophobic N-terminal domain than *Cg*-BigDef1.

We are still unable to explain which structural determinants play a role in the specificityof *Cg*-BigDefs. For instance, we do not know whether residues exposed in the linker (i.e., the most diversified residues) play a role in the interaction with microbes. Another unresolved issue is the salt stability of *Cg*-BigDef activity at high salt concentrations. Indeed, both *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were active against a wide range of marine bacteria at 400 mM NaCl, in agreement with previous findings for *Cg*-BigDef1 [27]. This stability ofthe antimicrobial activity is unique and essential for the peptides to participate as direct effectors in oyster antimicrobial defense. While many questions are still open on the structure-activity relationships of big-defensins and their domains, the molecular tools are now available to unveil the consequences of sequence variation in the interactions of *Cg*-BigDefs domains with the bacteria and/or in nanonet assembly. The same applies tobacteria from the oyster microbiota, with a collection of culturable bacteria that will be highly useful for testing functional hypotheses.

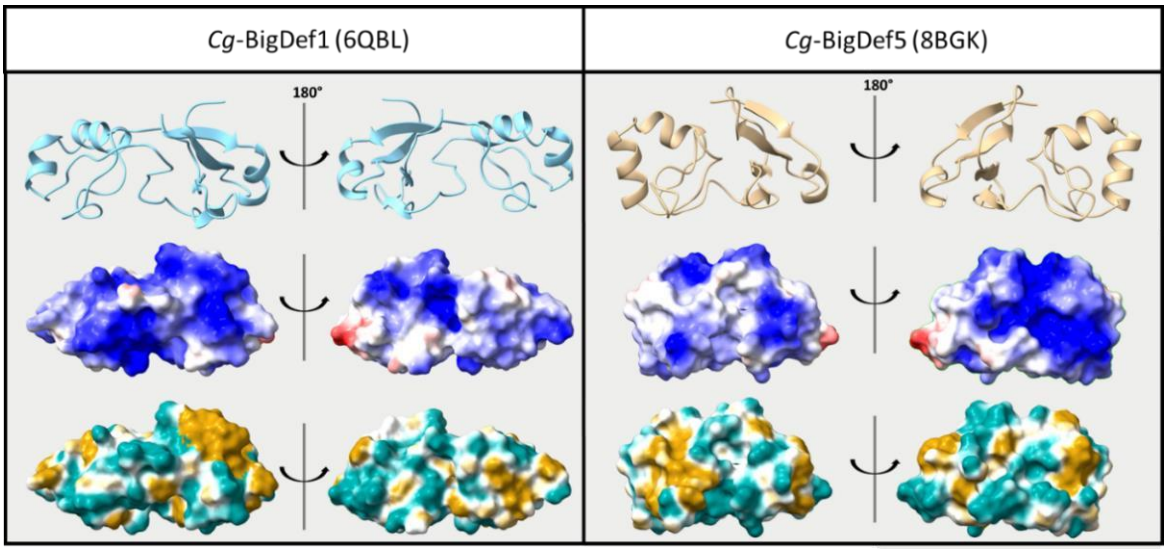


Figure 4. Structure comparison of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5. Top—Cartoon representation. Middle—Electrostatic potential on the accessible surface of the proteins with red representing negative charges and blue representing positive charges. Bottom—Hydrophobicity potential on the accessible surface of proteins with light blue representing hydrophilic properties and brown representing hydrophobic properties. Both electrostatic and hydrophobic potential were determined using ChimeraX software [42,43].

Conclusions

We have demonstrated that sequence diversification in *Cg*-BigDefs has helped to im- prove oyster defense against pathogens and to control oyster-associated bacterial communi- ties. Indeed, we highlighted an undiscovered specificity and synergy between *Cg*-BigDefs, which broadened their activity spectrum. These results pave the way for future studies on the mechanism of action of big defensins, which may vary depending on bacterial targets.

4.Materials and Methods

4.1.Chemicals and Reagents

MilliQ water (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) was used. LC-MS-grade acetoni- trile (ACN) was obtained from Carlo-Erba Reagents (Val de Reuil, France). LC-MS-grade formic acid (FA), trifluoroacetic acid (TFA), and alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (4-HCCA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.2.Oysters

Oysters with limited genetic diversity were obtained as follows. Genitor oysters were collected in 2015 from the Le Dellec area in Brest bay, which is devoid of shellfish farming. The first generation of full siblings was produced, named F14, as described in [21]. From this family, two oysters were used to generate a second generation of full siblings, referred to as F14V (Decicomp project ANR-19-CE20-004). Offspring were kept at the Ifremer hatchery in Argenton (France) up to day 40. Then, they were grown at the Ifremer station in Bouin (France) until they were 10 months old.

4.3.Bacterial Strains and Culture Conditions

Strains and media are listed in the Ifremer Sextant catalog at https://doi.org/10.12770/0d529567-92fd-4dcd-9d9c-70e98ab6f772 (accessed on 14 October 2022).

Isolation of bacteria from oyster flesh and antibacterial assays were performed in Zobell medium at 20 °C. Zobell medium is composed of artificial seawater (ASW) [44] supplemented with 0.4% bactopeptone and 10% yeast extract, pH 7.8.

Bacteria were isolated from the flesh of live oysters affected by the Pacific Oyster Mortality Syndrome (susceptible families F11, F14, and F15 from the Decipher project ANR-14-CE19-0023) [21]. Additional bacteria isolated from diseased oysters were provided by the French National Reference Laboratory (Ifremer, La Tremblade, France). Finally, bacteria isolated from healthy commercial or wild oysters were included.

4.4.Molecular Phylogeny Based on 16S RNA

Taxonomic assignment down to the genus was performed for each strain by molecular phylogeny based on the sequence of the V3-V4 region of 16S rRNA obtained by Sanger sequencing. In order to consolidate the phylogenetic tree, at least one Genbank reference sequence corresponding to a Type (T) strain per genus of interest was added from the NCBI database (Table S4). The 95 sequences were trimmed at 405 bp (V3-V4 loop) using BioEdit and aligned using ClustalW. The phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood method with the Kimura 2-parameter model [45] using MEGA X software [46] and annotated using ITOL software [47]. The branches are supported by the bootstrap method with 500 iterations.

4.5.Identification of Bacterial Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI Biotyping)

MALDI Biotyping was used to confirm 16S taxonomic assignments or, when the libraries required it, to enrich them with new bacteria absent from MALDI libraries (common for marine strains). For these purposes, a protocol coupling inactivation with 75% ethanol and extraction with 70% formic acid was performed based on the MALDI Biotyper® protocol (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Briefly, from each plate, one isolated colony was suspended in MilliQ water in 1.5 mL Eppendorf tubes. Ethanol (100%) was added to the suspension, and the tubes were centrifuged twice (13,000 rpm, 2 min). Subsequently, 10 µL of a 70% formic acid solution was added to the pellet. In order to complete the extraction, 10 µL of pure acetonitrile was added. One microlitre of each extract was deposited three times (technical replicates) on a MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), air-dried, and coated with 1 µL of fresh alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in a saturating amount in a solution of 50% ACN and 2.5% TFA (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The MALDI MS spectra of these spots were acquired with an Autoflex III Smartbeam MALDI-TOF MS, recording masses ranging from 2000 to 20,000 Da using standard parameters (flexControl 3.4, Bruker Daltonic, Bremen, Germany), and interrogated against the existing databases. For bacteria species not present in the existing MALDI Biotyper® reference mass spectra libraries, a reference spectrum was created and entered in our local database, as follows: the bacterial extract was spotted 8 times, each spot analyzed three times, for a total of twenty-four recorded spectra per bacterial strain. After manual checking, the twenty better spectra were transformed into an average spectrum by the MBT Compass Explorer software. The BTS (bacterial test standard) serves as a calibrator and contains *Escherichia coli* extract. The reference libraries used for the analysis are the official Bruker MALDI Biotyper® spectral library (MBT reference library https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification/maldi-biotyper-library-ruo.html; accessed on 10 October 2022) and the freely available EnviBase exclusively dedicated to the identification of potentially pathogenic *Vibrio* in marine mollusks (seanoe.org, accessed on 10 October 2022) [48].

4.6.Molecular Cloning and Sequence Data Analysis

The *Cg*-BigDef5 gene was PCR-amplified using specific primers (Fw: 5′-AATCAAGTCAACATGAACAG-3′; Rv: 5′-TTATCCTAGATTTCTAGGTC-3′) based on a transcript sequence previously found in publicly available databases [24], cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega) and then sequenced using the Sanger dideoxy methodology (Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer). Exon–intron boundaries were defined by the

alignment of cDNA and genomic sequences. Nucleotide sequences were manually inspected and translated using the ExPASy Translate Tool http://web.expasy.org/translate/ (accessed on 1 September 2022). Prediction of signal peptides and other posttranslational processing was carried out using the ProP 1.0 server https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?ProP-1.0 (accessed on 1 September 2022), while the theoretical isoelectric point (p*I*) and molecular weight (MW) of the mature peptides were calculated using the Expasy ProtParam Tool http://web.expasy.org/protparam/ (accessed on 1 September 2022). Mul- tiple alignments of amino acid sequences were generated using MUSCLE with default parameters https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/ (accessed on 1 September 2022).

4.7. Peptide Synthesis and Net Charge Calculation

Cg-BigDef1 was synthesized as already described, using a combination of solid-phase chemical synthesis and native chemical ligation (NCL) followed by a thermodynamically controlled oxidative folding step [26,27,49]. *Cg*-BigDef5 was obtained following a similar synthetic scheme (see Supplemental Figure S5 and [34] for optimization and details, as well as for 3D structure determination by NMR).

Peptide net charges at pH = 7.4 (oyster physiological pH) were predicted using the IPCprotein pKa dataset [50]. *Cg*-BigDef1 net charge = +6.05 (6.00 negative charges and 12.05 positive charges, calculated taking into account 12 Arg, 4 Asp, 2 Glu, 3 His, and 8 Tyr). *Cg*-BigDef5 net charge = +6.95 (4.00 negative charges and 10.95 positive charges, calculated taking into account 7 Arg, 3 Asp, 1 Glu, 2 His, 3 Lys, 8 Tyr, and the N-terminal amine group).

4.8. Determination of the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), Minimum Bactericidal Concentrations (MBC), and Synergy

Cg-BigDef1(1-93) and *Cg*-BigDef5(1-86) were dissolved in MilliQ water at a concentra- tion of 200 µM. Peptide concentration control was performed with a NanoDrop One spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a molar epsilon at 280 nm of 23,295 $M^{-1}.cm^{-1}$ for *Cg*-BigDef1 (peptide batch ARO-I-78) and of 34,295 $M^{-1}.cm^{-1}$ *Cg*-BigDef5 (peptide batch ARO-I-113).

MIC and MBC values were determined as previously described [35]. Briefly, big defensins stock solutions were serially diluted in sterile MilliQ water. A total of 10 µL of peptides were incubated with 90 µL of bacterial suspension, brought to the exponential growth phase, and adjusted to A_{600} = 0.001 in Zobell medium at 20 °C. Bacteria were grown under shaking in a sterile, non-pyrogenic polystyrene 96-well plate (Falcon). Growth was monitored at 600 nm on a TECAN spectrophotometer with one measurement/h over 24 h. MIC values are expressed as the lowest concentration tested (µM) that results in 100% growth inhibition. For the determination of MBCs, after a 24 h incubation, 100 µL of each well were plated on Zobell agar medium at 20 °C. MBC values are expressed as the lowest concentration tested (µM) for which no colonies could be counted on a Petri dish.

Synergies between *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 were measured as previously described using the checkerboard microtiter assay, which enables highlighting a potential reduction of the MIC values of each peptide when used in combination. In this assay, 2-fold serial di- lutions of one peptide are tested against 2-fold serial dilutions of the other peptide. Results are expressed by calculating fractional inhibitory concentration (FIC) index values [35].

4.9. Microbiota Modifications Induced by Cg-BigDef1 In Vivo

A biparental family of juvenile *C. gigas* oysters (family F14-V, 10 months old, average wet weight of flesh 200+/ 27 mg) was used in in vivo assays. All oysters were maintained under controlled biosecurity conditions to ensure their specific pathogen-free status. Foranesthesia, oysters were kept for 12 h outside seawater tanks and anesthetized two hours before the experiment in seawater containing 50 g/L $MgCl_2$ [51]. Control animals (n = 8) were collected before (NTC, non-treated controls) and after the entire anesthesia procedure (AC, anesthesia controls). Before injection into oysters, *Cg*-BigDef1 was dissolved in sterile

ASW at a concentration of 20 µM. Concentration was verified as described above for MIC and MBC determination. Injection of *Cg*-BigDef1 (50 µL) was performed right after anesthesia by injection into the oyster adductor muscle to reach a final concentration of 5 µM of *Cg*-BigDef1 in oyster flesh. An injection of 50 µL sterile ASW was used as a control treatment. Oysters (n = 8 per condition) were sampled 10 min (T0), 6 h (T6), and 24 h (T24) after injection. For oyster sampling, shells were removed, and flesh was recovered and snap-frozen in liquid nitrogen. Individual oysters were ground in liquid nitrogen in 50 mL stainless steel bowls with 20-mm-diameter grinding balls (Retsch MM400 mill) and stored at 80 °C until DNA extraction. DNA extraction was performed as described in [21] using the Nucleospin tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). DNA concentration and purity were checked with a NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.10.16S rRNA Metabarcoding

Bacterial metabarcoding was performed using 16S rRNA gene amplicon sequencing. Libraries were generated using the Illumina two-step PCR protocol targeting the V3-V4 region (341F: 5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′; 805R: 5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′) [52]. Sequencing was performed at the Bioenvironment Platform (University of Perpig- nan). A total of 64 libraries were paired-end sequenced with a 2 250 bp read length on a MiSeq system (Illumina) according to the manufacturer's protocol. Raw sequence data are available in the SRA database BioProject ID https://doi.org/10.12770/c960676e-2515-46f0-a313-4a91ac91908a (accessed on 17 October 2022).

Sequencing data were processed using the SAMBA pipeline v3.0.1. The SAMBA workflow, developed by the SeBiMER (Ifremer's Bioinformatics Core Facility), is an open-source modular workflow to process eDNA metabarcoding data. SAMBA is developed using the NextFlow workflow manager [53]. All bioinformatics processes are mainly based on the use of the next-generation microbiome bioinformatics platform QIIME 2 [54] (version 2020.2) and the approach of grouping sequences in ASV (Amplicon Sequence Variants) using DADA2 v1.14, [55]). Taxonomic assignment of ASVs was performed using a Bayesian classifier trained with the Silva database v.138 using the QIIME feature classifier [56]. Statistical analyses were also performed with R (R Core Team, 2020) using the R packages Phyloseq v1.38.0 [57] and Vegan v2.6-2 [53].

For α-diversity, we used the full data set to analyze differences in regularity (calculated as H/ln (S), where H is the Shannon–Wiener index, and S is species richness) and species richness (total number of species) using SAMBA pipeline and ANOVA.

For β-diversity, the ASV matrix of all 64 libraries was preliminarily normalized. Briefly, after verification of the rarefaction curves produced with the ggrare function [57]), libraries were sub-sampled to 45,361 reads using the rarefy_even_depth function. The normal- ized ASV matrix was then filtered for low-abundance ASVs to limit the prevalence of putative artifacts due to sequencing errors. For this purpose, only ASVs with at least four reads in at least four samples were retained. We then retained samples associated with ASW and *Cg*-BigDef1 experimental conditions at T0, T6, and T24. The variation in microbiota composition was then investigated using principal coordinate analyses (PCoA) based on Bray–Curtis distances at each kinetic point. Putative differences between groups were assessed by statistical analyses (Permutational Multivariate Analysis of Variance- PERMANOVA) using the adonis2 function implemented in vegan [58].

The mean relative abundance of the 10 most abundant bacterial genera in the oyster microbiota was also estimated. Results were graphically represented by a heatmap. We used the STAMPS software [59] to represent an extended error bar. Statistical differences were assessed by Welch's t-test with the Benjamini–Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR).

Finally, we used DESeq2 v1.36.0 [60] to identify ASVs whose abundance significantly varies in oysters injected with *Cg*-BigDef1 or ASW (control) for the last kinetic point (i.e., T24). Differential abundance was analyzed using a negative binomial method im- plemented in the DESeq2 package as recommended by [57]. For this latter analysis, we

only considered ASVs with an adjusted p value < 0.01. Note that ASVs lacking genera annotation and qualified as "unknown" were not considered for result interpretation.

4.11. Quantification of Total 16S Bacterial DNA

Total of 16S bacterial DNA was quantified by quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were analyzed using a Roche LightCycler 480 Real-Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University, Montpellier, France). The total qPCR reaction volume was 1.5 µL and consisted of 0.5 µL DNA (30 ng.µL^{-1}) and 0.75 µL LightCycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche) containing 0.5 µM PCR primer (Eurogenetec SA). Primers used for total bacteria were 341F 5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′ and 805R 5′-GACTACHV GGGTATCTAATCC-3′, which target the 16S variable V3V4 loops [52]. A Labcyte Acoustic Automated Liquid Handling Platform (ECHO) was used for pipetting into the 384-well plate (Roche). A LightCycler® 480 Instrument (Roche) was used for qPCR with the following program: enzyme activation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation (95 °C, 10 s), hybridization (60 °C, 20 s) and elongation (72 °C, 25 s). A melting temperature curve of the amplicon was then performed to verify the specificity of the amplification. Relative quantification of 16S bacterial DNA copies was cal- culated by the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method [61] using the mean of the measured cycle threshold values of a reference gene (*Cg*-EF1α (elongation factor 1α), GenBank: AB122066), as a calibrator.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/md20120745/s1, Table S1: Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table of oyster microbiota at ASV level for experimental anesthesia; Table S2: Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table of oyster microbiota at ASV level comparing experimental injections (i.e. oysters injected with ASW/ with Cg-BigDef1); Table S3: Results of ad hoc pairwise PERMANOVA testing for differences in oyster microbiota at ASV level between experimental conditions (i.e. injected with ASW/ injected with Cg-BigDef1); Table S4: List of standard strains used as reference sequences in the 16S phylogenetic analysis; Figure S1: Species richness rarefaction curves; Figure S2: Lack of effect of anesthesia on the oyster microbiome; Figure S3: No changes in oyster microbiota α-diversity after injection of Cg-BigDef1; Figure S4: Differences in oyster microbiota between ASW and Cg-BigDef1 conditions for the top10 genera; Figure S5: ASVs differentially represented at T24 in oyster injected with CgBigDef-1 or ASW; Figure S6: No changes in total bacterial load in oysters injected with Cg-BigDef1; Figure S7: Chemical synthesis of Cg-BigDef5 used in this study.

Author Contributions: Conceptualization, D.D.-G. and C.M.; methodology, N.D.S.N., V.A., R.D.R., G.R., M.-A.T., J.P., K.L.; formal analysis, N.D.S.N., D.D.-G., C.M., M.-A.T., J.-M.E., R.D.R., G.M.C., Y.D., K.L.; investigation, N.D.S.N., A.A., R.D.R., S.N.V., L.D., J.-M.E., V.B.; resources, V.A., A.F.D., B.P., H.M.; data curation, M.-A.T.; writing—original draft preparation, N.D.S.N., D.D.-G., R.D.R., C.M.; writing—review and editing, J.-M.E., P.B., S.N.V., M.-A.T., G.M.C., V.B., K.L., A.F.D.; supervision, D.D.-G., C.M., P.B., R.D.R.; project administration, A.F.D., D.D.-G.; funding acquisition, A.F.D., D.D.-G., P.B., G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (MOSAR-DEF, ANR-19-CE18-0025; DECICOMP, ANR-19-CE20-0004), the University of Montpellier, iSite MUSE, Kim Sea and Coast (DEPTH, KIM18SEA-FRV10-DESTOURN). This study falls within the framework of the "Laboratoires d'Excellence (LABEX)" Tulip (ANR-10-LABX-41). N.D.S.N. was the recipient of a PhD grant from Ifremer. G.R. and R.D.R. benefited from scholarships from the Brazilian funding agencies CAPES and CNPq (312047/2021-5), respectively. Luc Dantan was awarded a PhD grant from the Region Occitanie (Probiomic project) and the University of Perpignan Via Domitia graduate school ED305.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: MALDI spectra, 16S sequences and amplicon sequences for microbiota analysis have been made available on the Ifremer Sextant catalog https://doi.org/10.12770/261d786 4-a44c-43ab-b0c6-57fdaf7360ac (accessed on 14 October 2022); https://doi.org/10.12770/0d529567- 92fd-4dcd-9d9c-70e98ab6f772 (accessed on 14 October 2022. Raw sequence data of 16S sequencing for Metabarcoding analysis are available on on the Ifremer Sextant catalog https://doi.org/10.12770

/c960676e-2515-46f0-a313-4a91ac91908a (accessed on 17 October 2022).

Acknowledgments: We thank Céline Garcia from Ifremer, EU Reference Laboratory for mollusk diseases (La Tremblade, France), Céline Cosseau (IHPE) as well as Yannick Gueguen (MARBEC, Sète) and Julien de Lorgeril (Ifremer, LEAD and ENTROPIE, New Caledonia) for providing oyster bacterial isolates. We thank Jean-François Allienne (plateforme Bioenvironnement, University of Perpignan Via Domitia) for his help in building the 16S metabarcoding library and next-generation sequencing. We also warmly thank Cyril Noël from the SEBIMER bioinformatics platform (Ifremer) for his precious help in processing and analyzing metabarcoding data. We thank Eve Toulza, Léo Duperret (IHPE) and Carolane Giraud (IHPE, LEAD-ENTROPIE) for the fruitful discussions throughout this project, as well as Jamal Saad (IHPE) for critical reading of the manuscript. We thank Marc Leroy (IHPE) and Beatriz Garcia-Teodoro (LIAA) for their technical assistance. The authors thank the NMR sub-platform of the MO2VING facility (CBM, Orléans, France) as well as the qPHD platform from Montpellier GenomiX (University of Montpellier, France). We warmly thank the staff of the Ifremer stations of Argenton (PFOM, Brittany, France) and Bouin (EMMA, Vendée, France) for their technical support in the production of the two generations of oysters.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Buchon, N.; Broderick, N.A.; Lemaitre, B. Gut Homeostasis in a Microbial World: Insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 615–626. [CrossRef] [PubMed]
2. Hooper, L.V.; Littman, D.R.; Macpherson, A.J. Interactions between the Microbiota and the Immune System. *Science* **2012**, *336*, 1268–1273. [CrossRef] [PubMed]
3. Ostaff, M.J.; Stange, E.F.; Wehkamp, J. Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota in Homeostasis and Pathology. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1465–1483. [CrossRef] [PubMed]
4. Bevins, C.L.; Salzman, N.H. Paneth Cells, Antimicrobial Peptides and Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 356–368. [CrossRef] [PubMed]
5. Bosch, T.C.G.; Zasloff, M. Antimicrobial Peptides—Or How Our Ancestors Learned to Control the Microbiome. *MBio* **2021**, *12*,1–4. [CrossRef] [PubMed]
6. Marra, A.; Hanson, M.A.; Kondo, S.; Erkosar, B.; Lemaitre, B. *Drosophila* Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *MBio* **2021**, *12*, e0082421. [CrossRef]
7. Ganz, T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 710–720. [CrossRef]
8. Bulet, P.; Stöcklin, R.; Menin, L. Anti-Microbial Peptides: From Invertebrates to Vertebrates. *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 169–184. [CrossRef] [PubMed]
9. Hancock, R.E.W.; Haney, E.F.; Gill, E.E. The Immunology of Host Defence Peptides: Beyond Antimicrobial Activity. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 321–334. [CrossRef] [PubMed]
10. Haney, E.F.; Straus, S.K.; Hancock, R.E.W. Reassessing the Host Defense Peptide Landscape. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 1–22. [CrossRef]
11. Dierking, K.; Pita, L. Receptors Mediating Host-Microbiota Communication in the Metaorganism: The Invertebrate Perspective. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1251. [CrossRef] [PubMed]
12. Wang, X.-W.; Xu, J.-D.; Zhao, X.-F.; Vasta, G.R.; Wang, J.-X. A Shrimp C-Type Lectin Inhibits Proliferation of the Hemolymph Microbiota by Maintaining the Expression of Antimicrobial Peptides. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 11779–11790. [CrossRef]
13. Login, F.H.; Balmand, S.; Vallier, A.; Vincent-Monegat, C.; Vigneron, A.; Weiss-Gayet, M.; Rochat, D.; Heddi, A. Antimicrobial Peptides Keep Insect Endosymbionts Under Control. *Science* **2011**, *334*, 362–365. [CrossRef] [PubMed]
14. Franzenburg, S.; Walter, J.; Künzel, S.; Wang, J.; Baines, J.F.; Bosch, T.C.G.; Fraune, S. Distinct Antimicrobial Peptide Expression Determines Host Species-Specific Bacterial Associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, E3730–E3738. [CrossRef] [PubMed]
15. Schmitt, P.; Rosa, R.D.; Duperthuy, M.; de Lorgeril, J.; Bachère, E.; Destoumieux-Garzón, D. The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. How Diversity May Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 160. [CrossRef]
16. Bachère, E.; Rosa, R.D.; Schmitt, P.; Poirier, A.C.; Merou, N.; Charrière, G.M.; Destoumieux-Garzón, D. The New Insights into the Oyster Antimicrobial Defense: Cellular, Molecular and Genetic View. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *46*, 50–64. [CrossRef] [PubMed]
17. Destoumieux-Garzón, D.; Rosa, R.D.; Schmitt, P.; Barreto, C.; Vidal-Dupiol, J.; Mitta, G.; Gueguen, Y.; Bachère, E. Antimicrobial Peptides in Marine Invertebrate Health and Disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 20150300. [CrossRef] [PubMed]

18. Lokmer, A.; Mathias Wegner, K. Hemolymph Microbiome of Pacific Oysters in Response to Temperature, Temperature Stress and Infection. *ISME J.* **2015**, *9*, 670–682. [CrossRef]
19. Dupont, S.; Lokmer, A.; Corre, E.; Auguet, J.-C.; Petton, B.; Toulza, E.; Montagnani, C.; Tanguy, G.; Pecqueur, D.; Salmeron, C.; et al. Oyster Hemolymph Is a Complex and Dynamic Ecosystem Hosting Bacteria, Protists and Viruses. *Anim. Microbiome* **2020**, *2*, 12. [CrossRef]
20. Petton, B.; Bruto, M.; James, A.; Labreuche, Y.; Alunno-Bruscia, M.; Le Roux, F. *Crassostrea gigas* Mortality in France: The Usual Suspect, a Herpes Virus, May Not Be the Killer in This Polymicrobial Opportunistic Disease. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 686. [CrossRef]
21. de Lorgeril, J.; Lucasson, A.; Petton, B.; Toulza, E.; Montagnani, C.; Clerissi, C.; Vidal-Dupiol, J.; Chaparro, C.; Galinier, R.; Escoubas, J.-M.; et al. Immune-Suppression by OsHV-1 Viral Infection Causes Fatal Bacteraemia in Pacific Oysters. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4215. [CrossRef] [PubMed]
22. González, R.; Gonçalves, A.T.; Rojas, R.; Brokordt, K.; Rosa, R.D.; Schmitt, P. Host Defense Effectors Expressed by Hemocytes Shape the Bacterial Microbiota From the Scallop Hemolymph. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 599625. [CrossRef] [PubMed]
23. Rosa, R.D.; Santini, A.; Fievet, J.; Bulet, P.; Destoumieux-Garzón, D.; Bachère, E. Big Defensins, a Diverse Family of Antimicrobial Peptides That Follows Different Patterns of Expression in Hemocytes of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25594. [CrossRef]
24. Gerdol, M.; Schmitt, P.; Venier, P.; Rocha, G.; Rosa, R.D.; Destoumieux-Garzón, D. Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 758. [CrossRef] [PubMed]
25. Zhu, S.; Gao, B. Evolutionary Origin of Beta-Defensins. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *39*, 79–84. [CrossRef]
26. Terrier, V.P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. A Straightforward Method for Automated Fmoc-Based Synthesis of Bio-Inspired Peptide Crypto-Thioesters. *Chem. Sci.* **2015**, *7*, 339–345. [CrossRef]
27. Loth, K.; Vergnes, A.; Barreto, C.; Voisin, S.N.; Meudal, H.; Silva, D.; Bressan, A.; Bulet, P.; Touqui, L.; Delmas, A.F.; et al. The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets Karine. *MBio* **2019**, *10*, e01821-19. [CrossRef]
28. Lokmer, A.; Kuenzel, S.; Baines, J.F.; Wegner, K.M. The Role of Tissue-Specific Microbiota in Initial Establishment Success of Pacific Oysters. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 970–987. [CrossRef]
29. Wegner, K.M.; Volkenborn, N.; Peter, H.; Eiler, A. Disturbance Induced Decoupling between Host Genetics and Composition of the Associated Microbiome. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 252. [CrossRef]
30. Lucasson, A.; Luo, X.; Mortaza, S.; de Lorgeril, J.; Toulza, E.; Petton, B.; Escoubas, J.M.; Clerissi, C.; Dégremont, L.; Gueguen, Y.; et al. A Core of Functionally Complementary Bacteria Colonizes Oysters in Pacific Oyster Mortality Syndrome. *bioRxiv* **2020**. [CrossRef]
31. Clerissi, C.; de Lorgeril, J.; Petton, B.; Lucasson, A.; Escoubas, J.M.; Gueguen, Y.; Dégremont, L.; Mitta, G.; Toulza, E. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 311. [CrossRef] [PubMed]
32. Rahman, F.U.; Andree, K.B.; Salas-Massó, N.; Fernandez-Tejedor, M.; Sanjuan, A.; Figueras, M.J.; Furones, M.D. Improved Culture Enrichment Broth for Isolation of Arcobacter-like Species from the Marine Environment. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14547. [CrossRef] [PubMed]
33. Travers, M.A.; Boettcher Miller, K.; Roque, A.; Friedman, C.S. Bacterial Diseases in Marine Bivalves. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *131*, 11–31. [CrossRef]
34. Asokan, A.; Meudal, H.; de San Nicolas, N.; Loth, K.; Destoumieux-Garzón, D.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. Overcoming Challenges of Total Synthesis and 3D Structure Determination of Highly Hydrophobic Big Defensins. *in prep*.
35. Schmitt, P.; De Lorgeril, J.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzón, D.; Bachère, E. Expression, Tissue Localization and Synergy of Antimicrobial Peptides and Proteins in the Immune Response of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **2012**, *37*, 363–370. [CrossRef]
36. Schmitt, P.; Wilmes, M.; Pugnière, M.; Aumelas, A.; Bachère, E.; Sahl, H.G.; Schneider, T.; Destoumieux-Garzón, D. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action: Oyster Defensins Inhibit Peptidoglycan Biosynthesis by Binding to Lipid II. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 29208–29216. [CrossRef]
37. Gonzalez, M.; Gueguen, Y.; Destoumieux-Garzón, D.; Romestand, B.; Fievet, J.; Pugnière, M.; Roquet, F.; Escoubas, J.-M.; Vandenbulcke, F.; Levy, O.; et al. Evidence of a Bactericidal Permeability Increasing Protein in an Invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17759–17764. [CrossRef] [PubMed]
38. Salzman, N.H.; Ghosh, D.; Huttner, K.M.; Paterson, Y.; Bevins, C.L. Protection against Enteric Salmonellosis in Transgenic Mice Expressing a Human Intestinal Defensin. *Nature* **2003**, *422*, 522–526. [CrossRef]
39. Schneider, T.; Kruse, T.; Wimmer, R.; Wiedemann, I.; Sass, V.; Pag, U.; Jansen, A.; Nielsen, A.K.; Mygind, P.H.; Raventós, D.S.; et al. Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science* **2010**, *328*, 1168–1172. [CrossRef]
40. Turner, J.; Cho, Y.; Dinh, N.N.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I. Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2206–2214. [CrossRef]
41. Hanson, M.A.; Dostálová, A.; Ceroni, C.; Poidevin, M.; Kondo, S.; Lemaître, B. Synergy and Remarkable Specificity of Antimicrobial Peptides In Vivo Using a Systematic Knockout Approach (ELife (2019) 8 PII: E48778). *Elife* **2019**, *8*, e44341. [CrossRef] [PubMed]
42. Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Meng, E.C.; Pettersen, E.F.; Couch, G.S.; Morris, J.H.; Ferrin, T.E. UCSF ChimeraX: Meeting Modern Challenges in Visualization and Analysis. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 14–25. [CrossRef] [PubMed

43. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Meng, E.C.; Couch, G.S.; Croll, T.I.; Morris, J.H.; Ferrin, T.E. UCSF ChimeraX:Structure Visualization for Researchers, Educators, and Developers. *Protein Sci.* **2021**, *30*, 70–82. [CrossRef]
44. Saulnier, D.; Avarre, J.C.; Le Moullac, G.; Ansquer, D.; Levy, P.; Vonau, V. Rapid and Sensitive PCR Detection of Vibrio Penaeicida,the Putative Etiological Agent of Syndrome 93 in New Caledonia. *Dis. Aquat. Organ.* **2000**, *40*, 109–115. [CrossRef] [PubMed]
45. Kimura, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of NucleotideSequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120. [CrossRef]
46. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across ComputingPlatforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [CrossRef] [PubMed]
47. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (ITOL) v5: An Online Tool for Phylogenetic Tree Display and Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [CrossRef]
48. Moussa, M.; Cauvin, E.; Le Piouffle, A.; Lucas, O.; Bidault, A.; Paillard, C.; Benoit, F.; Thuillier, B.; Treilles, M.; Travers, M.A.; et al.A MALDI-TOF MS Database for Fast Identification of Vibrio Spp. Potentially Pathogenic to Marine Mollusks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 2527–2539. [CrossRef]
49. Da Silva, P.; Strzepa, A.; Jouvensal, L.; Rahioui, I.; Gressent, F.; Delmas, A.F. A Folded and Functional Synthetic PA1b: An Interlocked Entomotoxic Miniprotein. *Biopolymers* **2009**, *92*, 436–444. [CrossRef]
50. Kozlowski, L.P. IPC—Isoelectric Point Calculator. *Biol. Direct* **2016**, *11*, 55. [CrossRef]
51. Suquet, M.; De Kermoysan, G.; Araya, R.G.; Queau, I.; Lebrun, L.; Souchu, P.L.; Mingant, C. Anesthesia in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **2009**, *22*, 29–34. [CrossRef]
52. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e1.[CrossRef] [PubMed]
53. DI Tommaso, P.; Chatzou, M.; Floden, E.W.; Barja, P.P.; Palumbo, E.; Notredame, C. Nextflow Enables Reproducible Computational Workflows. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 316–319. [CrossRef] [PubMed]
54. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [CrossRef] [PubMed]
55. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inferencefrom Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef] [PubMed]
56. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of RRNA Sequences into the NewBacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [CrossRef] [PubMed]
57. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome CensusData. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [CrossRef]
58. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Kindt, R.; Legendre, P.; O'hara, R.; Simpson, G.L. Vegan: Community Ecology Package, R PackageVersion 1.17–18. 2011. Available online: http://CRAN.Rproject.org/package=vegan (accessed on 1 September 2022).
59. Parks, D.H.; Tyson, G.W.; Hugenholtz, P.; Beiko, R.G. STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3123–3124. [CrossRef] [PubMed]
60. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *GenomeBiol.* **2014**, *15*, 550. [CrossRef] [PubMed]
61. Pfaffl, M.W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45.[CrossRef] [PubMed]

Supplementary Materials

Functional Diversification of Oyster Big Defensins generates Antimicrobial Specificity and Synergy against members of the Microbiota

De San Nicolas N[1], Asokan A[2], Rosa RD[3], Voisin SN[4], Travers MA[1], Rocha G[3], Dantan L[1], Dorant Y[1], Mitta G[1,5], Petton B[6], Charrière GM[1], Escoubas JM[1], Boulo V[1], Pouzadoux J[1], Meudal H[2], Loth K[2,7], Aucagne V[2], Delmas AF[2], Bulet P[4,8], Montagnani C[1] and Destoumieux-Garzón D[1] *

[1] IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Montpellier, France
[2] Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS, Orléans, France
[3] Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, FederalUniversity of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil
[4] Plateforme BioPark d'Archamps, Archparc, Archamps, France
[5] Ifremer, IRD, ILM, Université de Polynésie Française, UMR EIO, Vairao, French Polynesia
[6] Ifremer, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR UMR 6539 Université de Bretagne Occidentale, Argenton-en-Landunvez F-29840, France
[7] UFR ST, Université d'Orléans, Orléans, France
[8] CR UGA, IAB, INSERM U1209, CNRS UMR5309, La Tronche -Archamps, France

*Correspondence: Delphine Destoumieux-Garzon

Tel.: +33 467144625

E-mail: Delphine.Destoumieux.Garzon@ifremer.fr

Table of Contents:

Table S1. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table ofoyster microbiota at ASV level for experimental anesthesia.	Page 3
Table S2. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table of oyster microbiota at ASV level comparing experimental injections (i.e. oysters injected with ASW/ with Cg-BigDef1).	Page 3
Table S3. Results of ad-hoc pairwise PERMANOVA testing for differences in oystermicrobiota at ASV level between experimental conditions (i.e. injected with ASW/ injected with Cg-BigDef1).	Page 3
Table S4. List of standard strains used as reference sequences in the 16S phylogenetic analysis.	Page 4
Figure. S1. Species richness rarefaction curves.	Page 6
Figure S2. Lack of effect of anesthesia on the oyster microbiome.	Page 7
Figure S3. No changes in oyster microbiota α-diversity after injection of Cg-BigDef1.	Page 8
Figure S4. Differences in oyster microbiota between ASW and Cg-BigDef1conditions for the top10 genera.	Page 9
Figure S5. ASVs differentially represented at T24 in oyster injected with CgBigDef-1 or ASW.	Page 10
Figure S6. No changes in total bacterial load in oysters injected with Cg-BigDef1.	Page 11
Figure S7. Chemical synthesis of Cg-BigDef5 used in this study.	Page 12
SM. References	Page 13

Table S1. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table of oyster microbiota at ASV level for experimental anesthesia. Significance was obtained from n= 1,000 permutations.

Source of variation	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F	Pvalue
Anesthesia	1	0.21	0.09	1.43	0.080
Residuals	14	2.05	0.90	-	-
Total	15	2.26	1	-	-

Table S2. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) table of oyster microbiota at ASV level comparing experimental injections (*i.e.* oysters injected with ASW/ with *Cg*-BigDef1). Significance obtained from n= 1,000 permutations.

Source of variation	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F	Pvalue
Injection	1	0.26	0.02	1.55	0.055
Time	2	2.58	0.23	7.43	0.001
Injection:Time	2	0.64	0.05	1.85	0.005
Residuals	42	7.29	0.67	-	-
Total	47	1.07	1	-	-

Table S3. Results of ad-hoc pairwise PERMANOVA testing for differences in oyster microbiota at ASV level between experimental conditions (i.e. injected with ASW/ injected with *Cg*-BigDef1). Statistical differences were tested for each kinetic time (i.e. T0, T6 and T24). Significance obtained from n= 1,000 permutations. Significant differences are bolded.

Source of variation	DF	Sum of Squares	R^2	F	Pvalue
T0 - injection	1	0.1722	0.057	0.849	0.754
T0 - Residual	14	2.8382	0.943	-	-
T0 - Total	15	3.0104	1.000	-	-
T6 - injection	**1**	**0.5169**	**0.143**	**2.331**	**$6.9e^{-4}$**
T6 - Residual	14	3.1039	0.857	-	-
T6 - Total	15	3.6208	1.000	-	-
T24 - injection	**1**	**0.2258**	**0.143**	**2.333**	**0.005**
T24 - Residual	14	1.3550	0.857	-	-
T24 - Total	15	1.5808	1.000	-	-

Table S4. List of standard strains used as reference sequences in the 16S phylogenetic analysis.

Genbank Accession	Taxon
CP003466	*Alcanivorax dieselolei*
CP008849	*Alteromonas australica*
CIP110805T	*Alteromonas mediterranea*
AY926460	*Alteromonas hispanica*
CIP103198T	*Alteromonas macleodii*
CP001999	*Arcobacter nitrofigilis*
FJ573217	*Arcobacter bivalviorum*
LCUH01000004	*Arcobacter porcinus*
ABQL01000001	*Bacillus subtilis*
KZ987423	*Bacillus fortis*
AF483625	*Bacillus aquimaris*
MACF01000036	*Bacillus mobilis*
AY651070	*Bizionia paragorgiae*
CP002534	*Cellulophaga lytica*
DQ007434	*Colwellia polaris*
JH393258	*Halomonas boliviensis*
JQ762286	*Halomonas zhaodongensis*
AM229314	*Halomonas gomseomensis*
AE017340	*Idiomarina loihiensis*
AJ440214	*Idiomarina baltica*
LGOW01000020	*Idiomarina abyssalis*
LTAV01000043	*Marinomonas aquimarina*
LTAW01000025	*Marinomonas atlantica*
LTAX01000041	*Marinomonas gallaica*
X67025	*Marinomonas vaga*
AQWH01000065	*Martelella mediterranea*
LELC01000058	*Photobacterium swingsii*
D25307	*Photobacterium angustum*
ADBS01000001	*Photobacterium damselae*
X67024	*Pseudoalteromonas haloplanktis*
AY563031	*Pseudoalteromonas marina*
CP013187	*Pseudoalteromonas phenolica*
CP011925	*Pseudoalteromonas piscicida*
LRRU01000009	*Pseudoalteromonas gelatinilytica*
X82140	*Pseudoalteromonas undina*
AB453700	*Psychrobacter piscatorii*
jgi.1058070	*Ruegeria marina*
LQBQ01000015	*Ruegeria marisrubri*
AP011177	*Shewanella violacea*
FR744784	*Shewanella electrodiphila*
AB081757	*Shewanella marinintestina*
MRZO01000018	*Staphylococcus xylosus*

ABID01000006	*Sulfitobacter indolifex*
jgi.1067976	*Sulfitobacter delicatus*
AM746476	*Tenacibaculum soleae*
RCCS01000002	*Tenacibaculum discolor*
KC261665	*Winogradskyella undariae*
U64013	*Winogradskyella rapida*
X74689	*Vibrio aestuarianus subsp aestuarianus*
CCJW01000022	*Vibrio crassostreae*
AJ514912	*Vibrio tasmaniensis*
BCUF01000119	*Vibrio harveyi*
CIP108868T	*Pseudoalteromonas spongiae*
AY563030	*Marinobacterium halophilum*
KT366925	*Marinobacterium aestuariivivens*

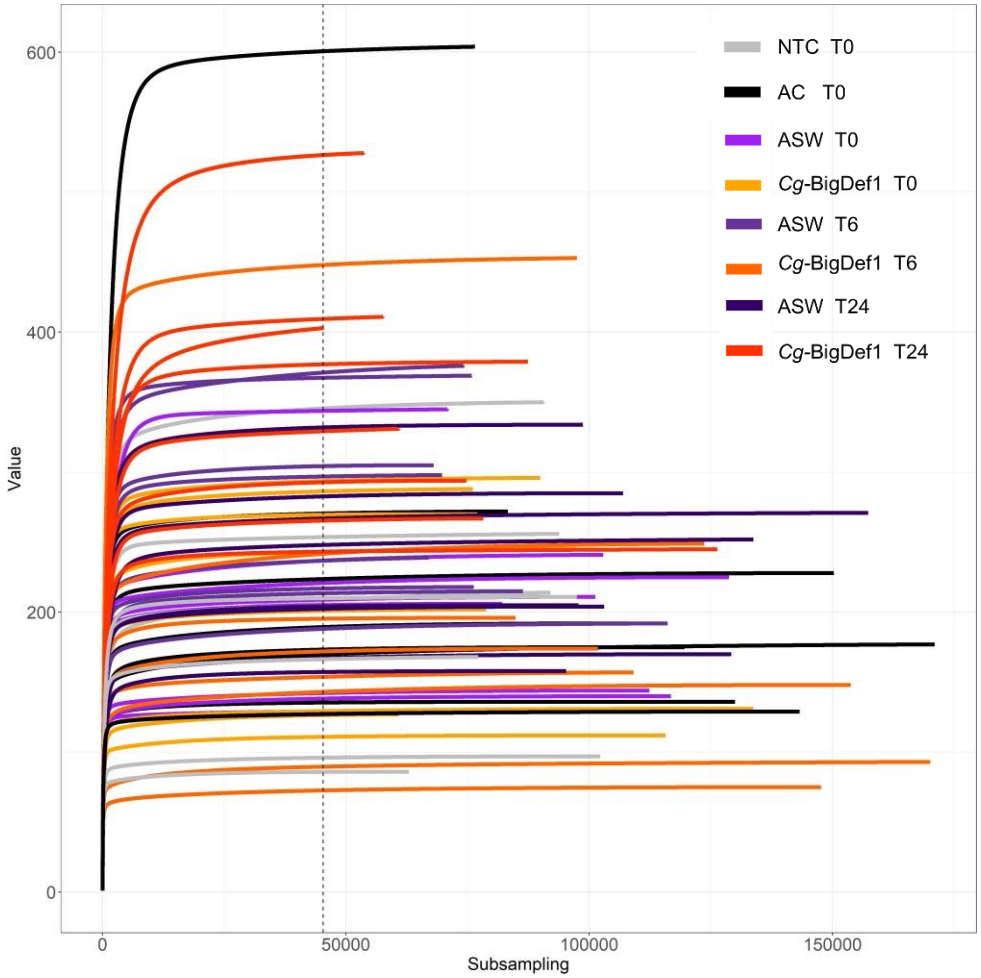


Figure S1. Species richness rarefaction curves.

Rarefaction curves are displayed for each sample (8 oysters per condition). Each color refers toa different condition. A subsampling was performed at 45.361 reads per sample (dashed line)for comparison of genera and ASV, as well as for β-diversity estimation.

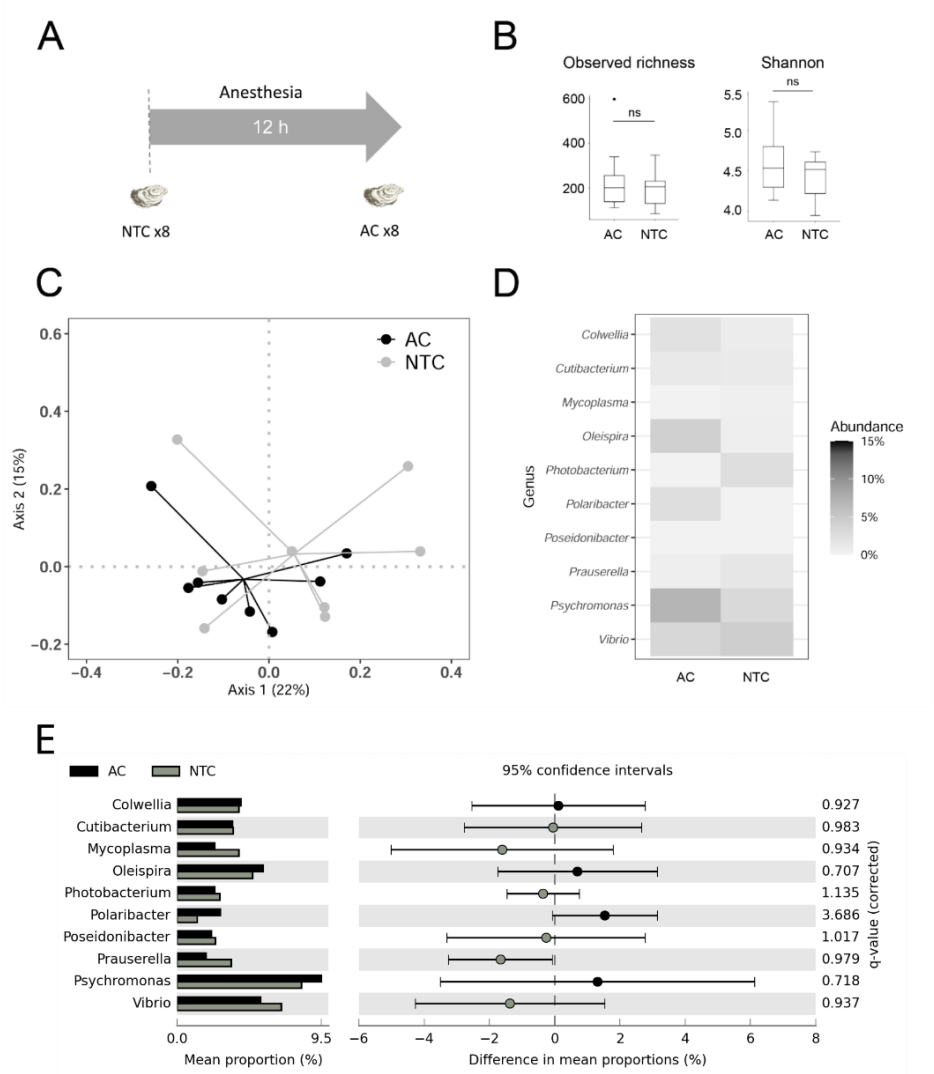


Figure S2. Lack of effect of anesthesia on the oyster microbiome.

A: Schematic representation of the experimental design used to test effect of anesthesia. From the same batch of oysters, 8 non-treated control oysters (NTC) and 8 anesthesia control oysters (AC) were collected. **B**: α-diversity of oyster microbiota, specific richness and Shannon indices (intraspecific diversity) in NTC and AC samples. **C**: β-diversity of oyster microbiota visualized by principal coordinate analysis (PCoA) biplot based on Bray-Curtis distances. Points colored in black and grey represents the microbiota for anesthetized oysters (AC) and non-treated oysters (NTC) respectively. **D**: Heatmap showing the relative abundance of the ten most common bacterial genera in AC and NTC samples. Each cell represents the mean proportion (based on relative abundance) carried by genera among samples associated with each condition considered (i.e. AC and NTC). **E**: Relative abundance of the ten most common genera observed in AC and NTC oysters**.** Results were analyzed by Welch's t-test with the Benjamini-Hochberg procedure, which controls the false discovery rate (FDR) using STAMPS software.

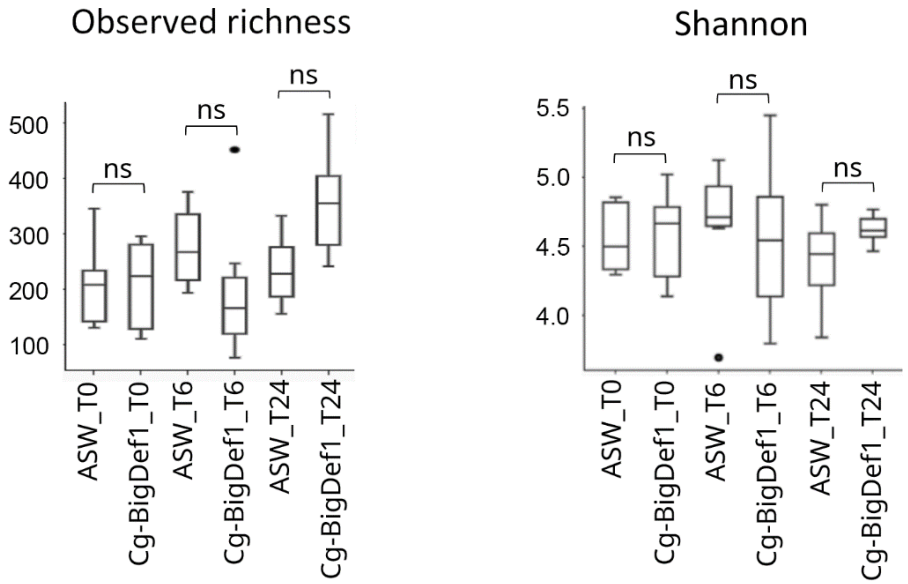


Figure S3. No changes in oyster microbiota α-diversity after injection of *Cg*-BigDef1.

α-diversity analyses of the oyster microbiota in 48 samples corresponding to oysters injected with *Cg*-BigDef1 or artificial seawater (ASW). Specific richness and Shannon (intraspecific diversity) indices were calculated in all samples. T0, T6 and T24 correspond to the time post-injection in hour.

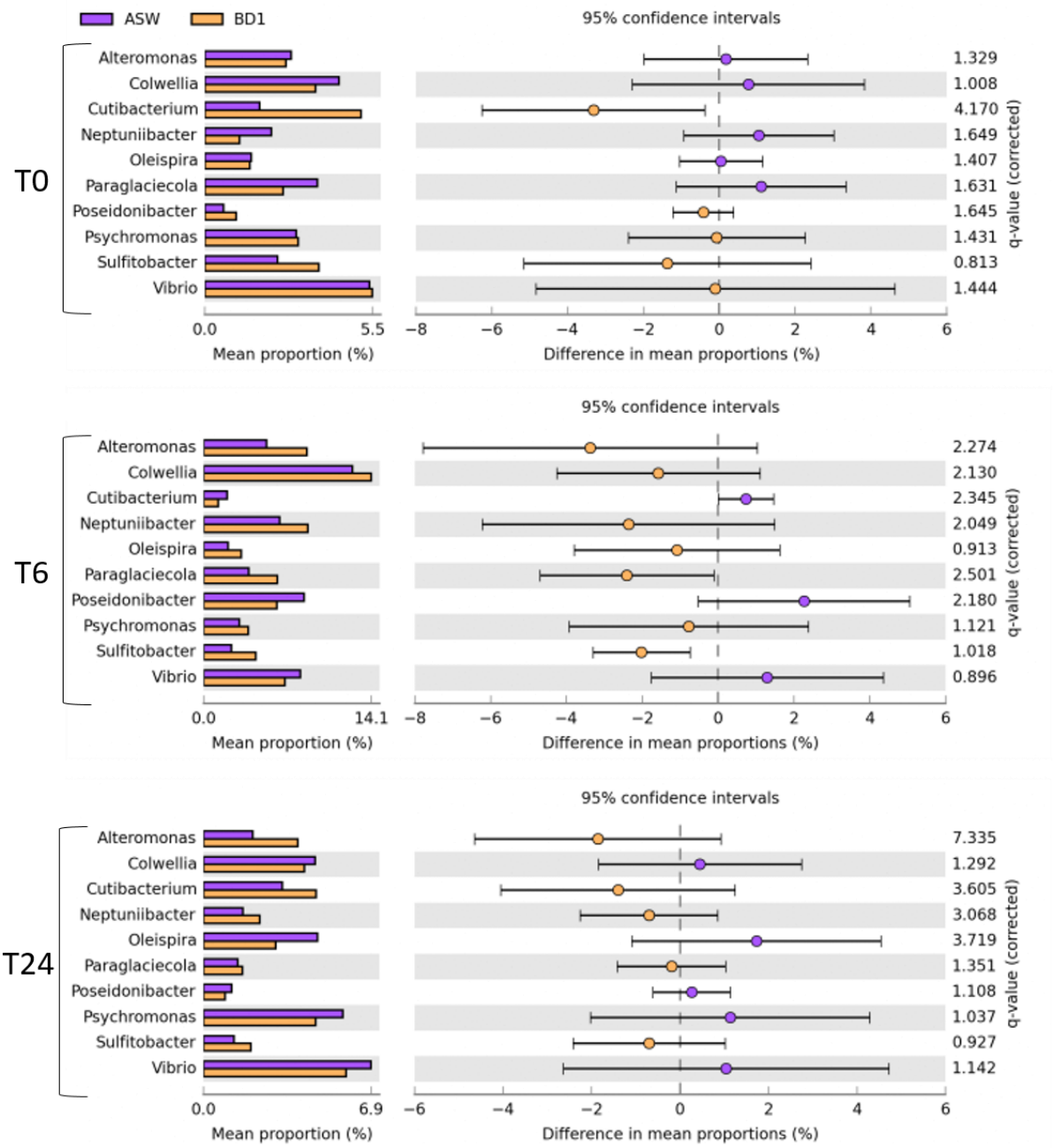


Figure S4. Differences in oyster microbiota between ASW and *Cg*-BigDef1 conditions for the top10 genera.

Relative abundance of the ten most common genera observed in ASW and *Cg*-BigDef1 injected oysters sampled at T0, T6 or T24**.** Results were analyzed by Welch's t-test using STAMPS software. The p-values were corrected with Benjamini–Hochberg FDR method.

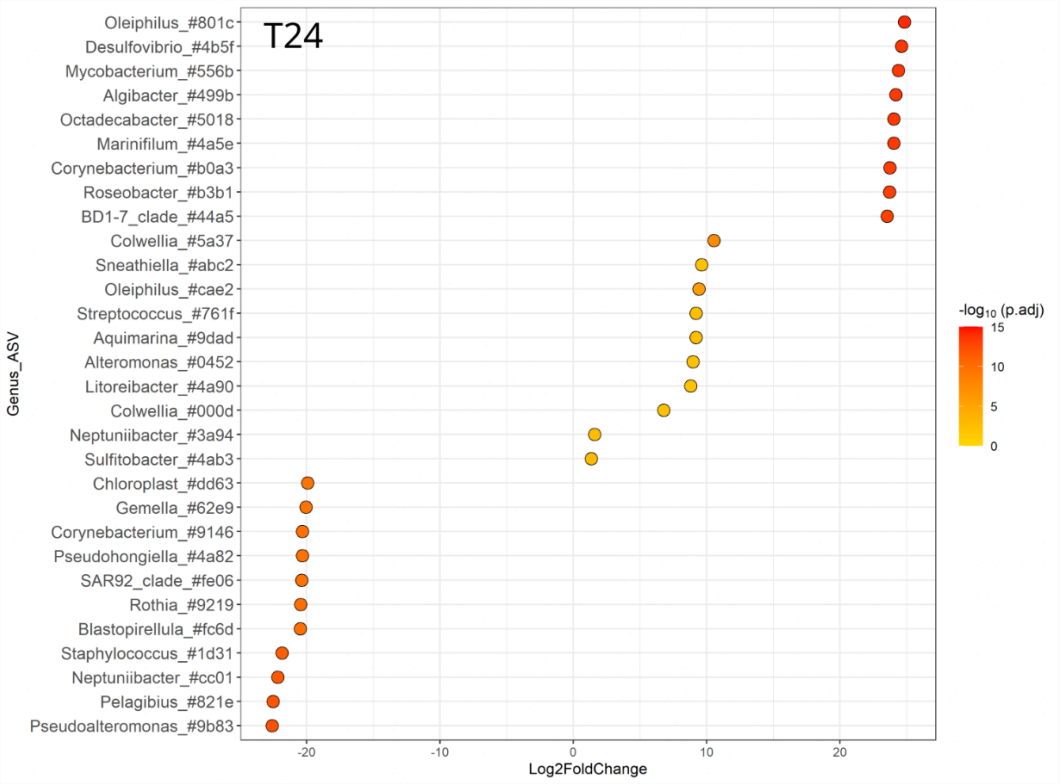


Figure S5. ASVs differentially represented at T24 in oyster injected with CgBigDef-1 or ASW.

Differential abundance analysis (DESeq2) at the ASV level between oysters injected with ASW and *Cg*-BigDef1 at T24. Each circle represents an ASV showing significant log2Foldchange (adjusted pvalue < 0.01) between experimental condition. Positive log_2FoldChange means enrichment in *Cg*-BigDef1-injected oysters and negative log_2FoldChange means enrichment in ASW-injected oysters. Taxa are denoted by their attributed genus followed by first four characters of the ASV barcode attributed by SAMBA. Note that ASVs without genera annotation were not represented in the figure. Differential abundance analysis identified 38 ASVs at T24 that were significantly enriched or impoverished in *Cg*-BigDef1-treated oysters. Among these, 30 ASVs were affiliated to 26 known genera.

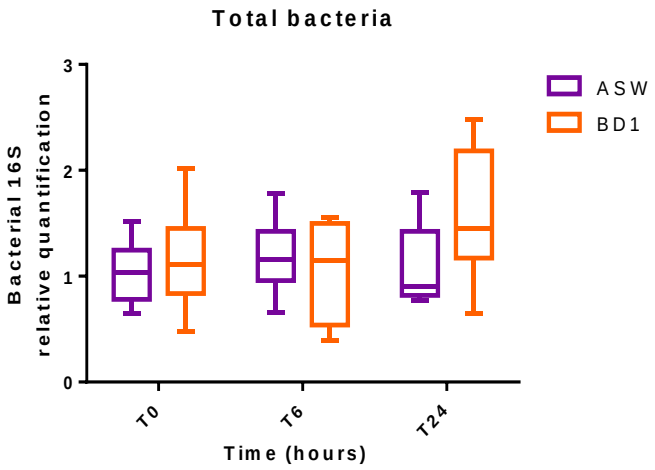


Figure S6. No changes in total bacterial load in oysters injected with *Cg*-BigDef1.

Relative quantification of total bacteria abundance were measured by qPCR. Boxplots represent the mean values and standard deviation for 8 oysters at various times (0, 6 and 24 h) post-injection with artificial sea water (purple) or *Cg*-BigDef1 (orange, 5µM final concentration). No significant differences were observed.

Chemical synthesis of *Cg*-BigDefs used in this study

Cg-BigDef1 was synthesized as already described in Terrier *et al.* [1] and Loth *et al.* [2]. Following a similar synthetic scheme, *Cg*-BigDef5 was obtained using a combination of solid phase chemical synthesis and native chemical ligation (NCL) followed by a step of oxidative folding under thermodynamical control (see Asokan manuscript in preparation for detail).

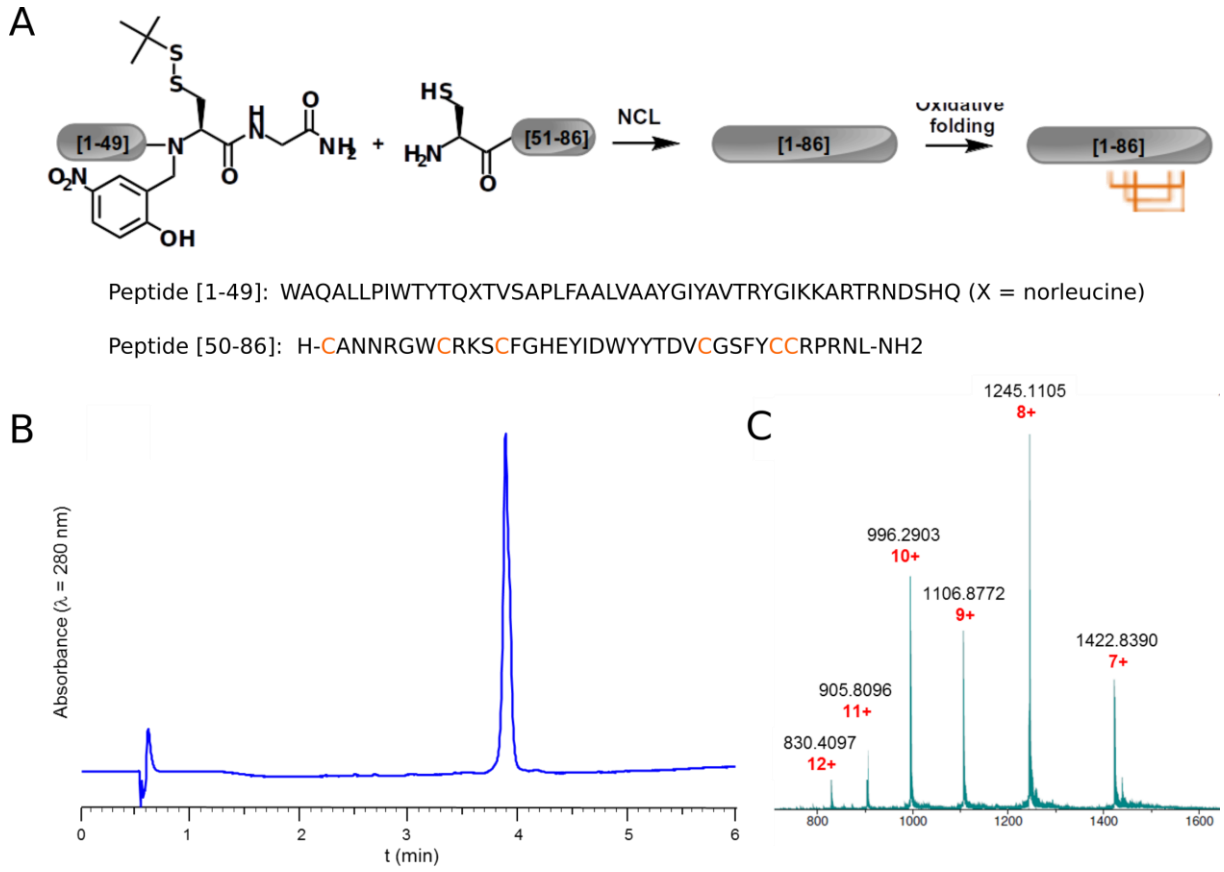


Figure S7. Chemical synthesis of *Cg*-BigDef5 used in this study

A. Synthetic scheme of *Cg*-BigDef5. **B.** High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of *Cg*-BigDef5. t_R = 3.8 min, (Chromolith C18, 20-90% methanol gradient in H_20 containing 0.1% TFA over 5 min). **C.** Electrospray ionization (ESI) - high resolution mass spectrometry (HRMS) of *Cg*-BigDef5. [M+H]+ calculated for C452H664N126O119S6: 9953.8178 Da, found: 9953.8343 Da (monoisotopic mass, deconvoluted) corresponding to a calculated molecular weight ([M]) of 9958.3 Da.

SM References

1. Terrier, V.P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. A StraightforwardMethod for Automated Fmoc-Based Synthesis of Bio-Inspired Peptide Crypto- Thioesters. *Chem. Sci.* **2015**, doi:10.1039/C5SC02630J.

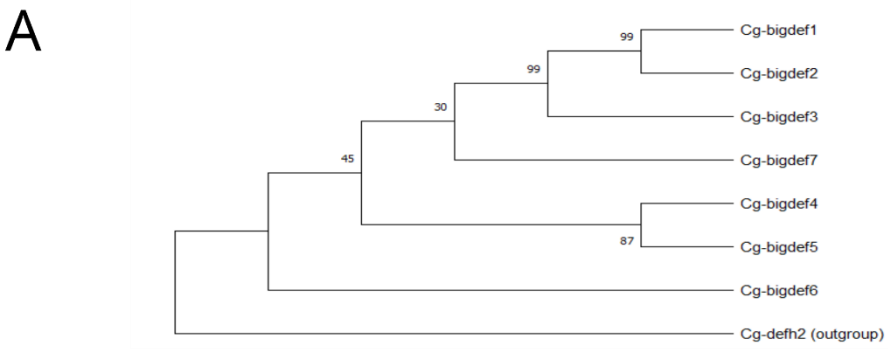
2. Loth, K.; Vergnes, A.; Barreto, C.; Voisin, S.N.; Meudal, H.; Silva, D.; Bressan, A.; Bulet, P.; Touqui, L.; Delmas, A.F.; et al. The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets Karine.*MBio* **2019**, 10:e01821-19, doi:10.1128/mBio.01821-19.

I.3 Résultats complémentaires 1. Etude de la variabilité présence-absence (PAV) des gènes codant pour les Big défensines de l'huître *Crassostrea gigas*.

Certaines familles de PAMs sont soumises à un phénomène extrême de variation du nombre de copies de gènes appelé PAV, ou Variation de Présence-Absence de gènes. C'est le cas notamment de la défensine humaine HNP-3 dont le gène est présent ou non selon les individus (Linzmeier & Ganz, 2005). En 2015, Rosa et al. ont identifié pour la première fois ce phénomène chez l'huître pour la famille des Big-défensines. Ils ont d'abord montré que *Cg-bigdef* 1, 2 et 3 présentaient une grande variabilité interindividuelle de leur expression génique à l'état basal. L'absence de transcription de certaines *Cg-bigdefs* a pu être associée à l'absence de gènes codants (Rosa et al., 2015). Toutefois, le phénomène de PAV des *Cg-bigdefs* dans le génome de l'huître n'a pu être associé à une meilleure capacité des huîtres à survivre à des infections expérimentales par une bactérie du genre *Vibrio*. Plus récemment, avec l'accumulation des données de génomique et de transcriptomique, Gerdol et al. (2020) ont rapporté l'existence de 7 gènes codant des Big défensines chez *C. gigas*. Parmi ces séquences, *cg-bigdef1*,*2* et *3* et *cg-bigdef5 et 6* se regroupent phylogénétiquement en deux groupes distincts (Gerdol et al., 2020a).

Nous avons étudié si le phénomène du PAV s'étend à toutes les Big-défensines connues de *C. gigas* ainsi que sa prévalence dans les populations naturelles d'huîtres en France. Une famille d'huître biparentale produite en élevage en France a également été analysée dans le cadre de notre étude. Grâce aux populations naturelles collectées le long des côtes françaises dans des zones ostréicoles (exposées au virus OsHV-1 µVar) ou non (*i.e.* des zones libres de cette pression de sélection), nous nous sommes également posés la question d'une corrélation potentielle entre la présence de certains gènes *Cg*-Bigdefs et la résistance au virus OsHV-1 µVar.

Les données de ce chapitre ont été acquises dans le cadre de notre collaboration avec Rafael Da Rosa, professeur à l'Université Sainta Catalina, Florianopolis (Bresil).



B

```
                    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Cg-bigdef1  ATGGAGAGAAAATCATTCTTGAGTGCTATCTTCATTGTTCTATTGGTTTCGCCTGCTTCCATAATGGCCAAAACTTTTGAAGAAGTAAATGGGACAAGAA
Cg-bigdef2  ATGGAGAGAAAATCATTCTTGAGTGCTATCTTTATTGTTCTTTTGGTTTCGCCTGCTTCCATAATGGCAAAAACTTTTGAAGAAGTAAATGATACAAGAA
Cg-bigdef3  ATGGAAAGAAAATCATTCTTGAGTGTTTTCTTCATTGTTCTTTTGGTTTCGCCTGCTTCCATACTGGCGAAAACTATTAAAGAAGAAGGTGAGACGAGAA
Cg-bigdef4  ATGAAAAGAAAATCAATCTTGAGTATTTTCTTCGTTATTCTTCTGTTCTCGCCCGCCCCGATTTTGGCCGAGACTCTGGAAGATATGAATGAGACAAGAA
Cg-bigdef5  ATGAACAGAAAATCTTGTTTCTGTATTTTCTTCATTGTTCTTTTGATATCTCCTGGTATCATTTTGGCAAAGACCATGAAGGATCTAAGAGAGTCAAAAA
Cg-bigdef6  ATGGCGAGGAAATTGTTCCAGTGTATTTTCTTCCTTGTTCTTTTAACATCGCCCGGTCTTATTCTGGCGAATACTATGAAGGATTTTAAAGAGACAGAAA
Cg-bigdef7  ATGAAGAGGAAATCATTTTTCTGCTTCTTCTTCATTGTCCTTTTGATCTCACCTGCACCGATCTTGGCCGAAACTTTGGAAGAAATGAAAGATACTAGAA

                   110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Cg-bigdef1  ACAAACGACAAGCCCAGGCTTTGTTGCCTATAGCATCTTATGCAGGGCTGACCGTATCAGCCCCAGTCTTTGCTGCTTTGGTGACCGTATACGGAGCCTA
Cg-bigdef2  ACAAACGACAAGCCCAGGCTTTGTTGCCTATAGCATCTTACGCAGGGCTGGCCGTATCACCCCCAGTCTTTGCTGCTTTGGTGACCGCATACGGAGTCTA
Cg-bigdef3  ACAAACGTCAAGCCCAGATTTTGTTACCCATAGCATCGTATGCAGGGCTGACCGTGACAGCTCCAGTCTTTGCTGCTTTGGTGGCAGCCTACGGAATCTA
Cg-bigdef4  ACAAACGGCAAGCTCAGGTTTTACTCCCCCTGGCGTCTTATCTAGGAATGACCGTAGCAGCCCCGGTATTTGCTGCTCTTGTTACGACATATGGAATCTA
Cg-bigdef5  ACAGGCGATGGGCTCAGGCTTTGTTACCCATTTGGACTTACACACAGATGACCGTGTCTGCCCCGCTATTTGCTGCTTTGGTGGCAGCCTACGGAATCTA
Cg-bigdef6  ACAAGCGACAAGTTCAGGCTCTGCTACCTGTAGCGGCTTATGCAGGACTGGCTGTGCCTGTCCCGCTATTTGCTGGTCTAGTTGCAGCCTATGGACTAGT
Cg-bigdef7  AGAAACGCCAAGCAGAAGCCCTACTGCCACTGGCGTCCTATGCTGGATTGACTGTGGGTGCTTCAGTGTTTCTAGCCCTTGTGGCAGCGTATGGTATTTA

                   210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Cg-bigdef1  CGCCCTTTACAGATACAACATAAGGAGGAGAGAAAATTCTTACCCACGAATAAGGAGTGACCATGACAGTCATTCGTGTGCTAACAACCGAGGGTGGTGC
Cg-bigdef2  CGCCCTTTACAGATACAACATAAGGA---GAGAAAATTCT-----------------GACCATGACAGTCATTCGTGTGCTAACAACCGAGGGTGGTGC
Cg-bigdef3  CGCTGTCACTAGATACGCCATAAGGA--AGAGAAGAATAGTA-------------ATGTATTCTGACAGTCATTCGTGTGCCAACAACAGAGGGTGGTGC
Cg-bigdef4  TGCTGTCACAAAATACGCAATCAAAAA-AGCTAAAT-----------------CAAACTCAGACAGTCATTCTTGTGCTAACAACAGAGGATGGTGC
Cg-bigdef5  TGCTGTCACTAGATACGGTATCAAGAA-AGCAAAAA-----------------CTCGACATGACAGCCATCAATGCACTAATAACAGGGGATGGTGT
Cg-bigdef6  CACCGTCACAACTTACGCCATCAAGGA-AGTTCAAAGCCATG-----------CTCAGCATGATAGCCATTCCTGTGCAAACAACAGAGGGTGGTGT
Cg-bigdef7  TGCTGTCACTAAGTATGCTATTAAGAA-AGCTGAAAGAGTGT-----------CTGACAAAGACAACCACGCCTGTGGGAGAGGTATCGGATGGTGT

                   310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Cg-bigdef1  AGACCGACCTGCTTTTCTCACGAATACACCGACTGGTTTAACAA---TGATGTGTGTGGATCATACAGGTGCTGCAGACCCGGACGGAGGGGATAA----
Cg-bigdef2  AGACCGACCTGCTATTCATATGAATACACCGGCTGGTTTAACAA---TGATGTGTGTGGATCATACAGGTGCTGCAGACCCGGACGGAGGGGATAA----
Cg-bigdef3  AGAGAAAGCTGCTTTTCTCACGAATACACCGACTGGGCAAACACGTTTGGTGTGTGCGGATCATACTTCTGCTGCAGACCCTATTAA------------
Cg-bigdef4  AGAAAAACATGTTTCTCCCATGAGTACATTGACTGGACGAACAA---TGCAGTGTGTGGATCATACAATTGCTGCAGACCCGGGAAGAGGGGGTAA----
Cg-bigdef5  AGAAAGTCTTGCTTCGGCCATGAATACATTGACGGGTATTATTC---TGATGTGTGTGGATCATTTGATTGCTGCAGACCTAGAAATCTAGGATAA----
Cg-bigdef6  AGAGAACATGTTTCTCTCGTGAATACATTGACGGGTATCATAG---TGATGTTTGTGGATCCTTTAAATGCTGCAGACCTAGTTAG------------
Cg-bigdef7  AGACCAAAATGTTTTCCAGGAGAGCACTTGGACTGGGATGACCC--CTTAT-TGTGTGGGTCGTATTATTGCTGTATGCCTGGGAGGGGAAGGGGAAGCA

                   410       420       430       440
                    ....|....|....|....|....|....|....|....
Cg-bigdef1  ----------------------------------------
Cg-bigdef2  ----------------------------------------
Cg-bigdef3  ----------------------------------------
Cg-bigdef4  ----------------------------------------
Cg-bigdef5  ----------------------------------------
Cg-bigdef6  ----------------------------------------
Cg-bigdef7  GAGGAGGATCCAAAGGAAAACAAGGGAGCAGGAGAAGAGGTTAA
```

C

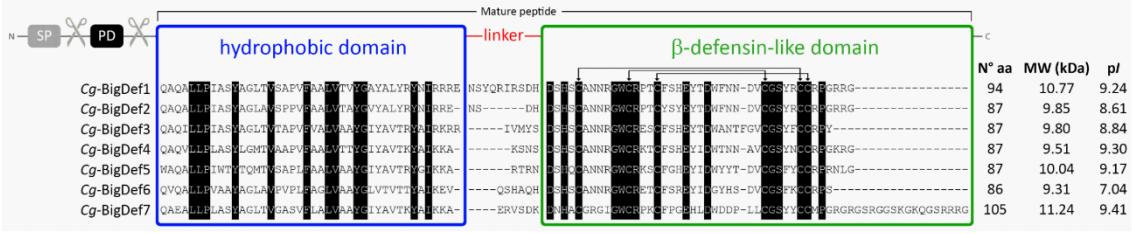


Figure 21. (A) Phylogénie de la famille des big défensines de l'huître. Les arbres phylogénétiques ont été construits sur la base des séquences génomiques allignées par Bioedit en utilisant la méthode Neighbor-Joining avec Kimura 2-parameter model dans MEGA-X. L'échantillonnage Bootstrap a été répété 1000 fois. Les séquences incluses dans ces analyses étaient les suivantes : les gènes *Cg-bigdefs*(GenBank : JN251125,

JN251126, JN251122, OP191675, OP191676, OP191677 et OP191678) et *Cg-defh2* (GenBank : DQ400102) en tant qu'outgroup. Les valeurs de soutien de la probabilité postérieure sont indiquées pour chaque nœud (B) Alignement multiple des ARNm des sept gènes Cg-bigdefs. (C) Alignement des séquences d'acides aminés des sept Cg-bigdefs matures. Les domaines hydrophobes (cadre bleu), β-defensine-like (cadre vert) et la zone flexible appelé linker (en rouge) sont indiqués. L'appariement des cystéines est indiqué par des flèches noires. Les acides aminés conservés entre les sept Cg-bigdefs sont indiqué par des lignes noires. Le nombre d'acide aminée, la masse molaire (MW) en KDa ainsi que le point isoélectrique estimé (pI) des différentes Big défensines de *C.gigas* sont indiqué à droite.

Matériels et méthodes

Matériel biologique : Les populations naturelles d'huîtres françaises ont été collectées dans le cadre de la thèse de Janan Gawra (Gawra, 2022). Grâce à l'échantillonnage réalisé au cours de cette thèse, nous avons disposé de 5 huîtres provenant de la baie de Brest (Finistère, France) de 4 zones différentes (zones # 4, # 5, #6 et #1) (Figure 22) , 5 huîtres naturelles provenant de Chaucre (Charente-Maritime, France) et Mimizan (Landes, France) et 1 huître provenant de l'estran du Vidourle (Hérault, France) (

Tableau ***3***). La résistance et la susceptibilité au virus OsHV-1 µVar ont été déterminées par suivi des mortalités après une infection expérimentale par le virus OsHV-1 µVar par cohabitation comme décrit précédemment (

Tableau ***3***) (Gawra et al., 2023). La localisation des prélèvements ainsi que le phénotype associé à chaque huître naturelle est indiqué dans le

Tableau ***3***.

Les populations naturelles d'huîtres brésiliennes ont été collectées grâce à la collaboration de notre unité avec le LIAA de l'Université Sante Catalina, dans la zone ostréicole de Florianopolis (Brésil), jusqu'à ce jour indemne du virus OsHV-1 µVar.

Des huîtres d'écloserie ont été obtenues grâce à notre collaboration avec Bruno Petton (Ifremer, unité PHYTNESS, Argenton). Il s'agit d'une famille d'huîtres hypersensible au virus OsHV-1 µVar issue de croisement biparentaux et nommée F14-V (famille du projet ANR Decicomp- ANR-19-CE20-0004). Les animaux ont été produits à la plateforme Ifremer d'Argenton, élevés sur la plateforme Ifremer de Bouin (Unité Ifremer EMMA) puis transportés et stabulés en eau de mer à 13°C à leur arrivée à Montpellier et traités comme décrit dans l'article 1.

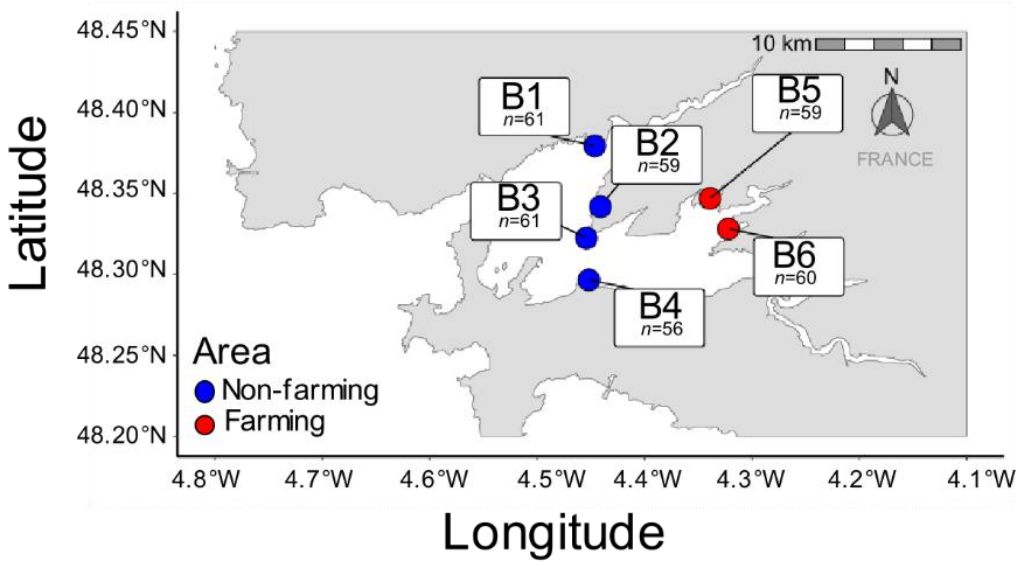


Figure 22. Positions géographiques des populations naturelles d'huîtres échantillonnées dans la baie de Brest. Extrait de (Gawra et al., 2023).

Tableau 3. Coordonnées géographiques et phénotypes des populations d'huîtres naturelles françaises. Adaptés de (Gawra, 2022).

Numéro	Localisation (code postal)	Population	Latitude	Longitude	Taux de survie (%)	Phénotype suite à une infection à OsHV1-µvar
1	Baie de Brest (29200)	Brest 4	48°17'47.67"N	4°27'6.40"W	50%	Sensible
2						Sensible
3						Sensible
4						Résistant
5						Résistant
6		Brest 5	48°20'49.02"N	4°20'20.35" W	30%	Sensible
7						Sensible
8						Sensible
9						Résistant
10						Résistant
11		Brest 6	48°19'41.34"N	4°19'19.01" W	50%	Résistant
12						Résistant
13						Résistant
14						Sensible
15						Sensible
16		Brest 1	48°22'45.71''N	4°26'46.63''W	30%	Résistant
17						Résistant
18						Résistant
19						Sensible
20						Sensible

21	baie de Marennes-Oléron (17190)	Chaucre	45°58’47.80N	1°24’0.93’’W	100%	Résistant
22						Résistant
23						Résistant
24						Résistant
25						Résistant
26	Baie d'Arcachon (40200)	Mimizan	44°12’39.18’’N	1°17’43.50’’W	75%	Résistant
27						Résistant
28						Résistant
29						Résistant
30						Sensible
31	Lagune de Thau (34280)	Vidourle	43°33’22.14’’N	4°06’05.55’’E	75%	Résistant

Extraction d’ADN : Les ADN génomiques (ADNg) des huîtres brésiliennes ont été extraits par précipitation à l’acétate de potassium. Les ADNg des huîtres françaises ont été extraits à l’aide du Nucleospin tissue kit (Macherey-Nagel) comme décrit dans l’article 1 (De San Nicolas et al., 2022a).

Clonage moléculaire : L’ADNg de 10 huîtres brésiliennes a été utilisé pour le clonage des gènes codants les Big-défensines. Les plasmides pCR II TOPO (Invitrogen) ou pGEM-T Easy (Promega) porteurs des gènes de *Cg-bigdef*1, *Cg-bigdef* 2, *Cg-bigdef* 3, *Cg-bigdef* 4, *Cg-bigdef*5, *Cg-bigdef* 6 ont été construits par notre collaborateur Rafael Rosa (LIAA université fédérale de Santa Catarina, Florianópolis Brésil) comme indiqué dans (Rosa et al., 2015) (Tableau 4) En plus de ces 5 gènes, le gène codant *Cg*-BigDef7 a été amplifié par PCR à partir de l’ADNg d’un pool de 10 huîtres provenant du Brésil. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume de réaction de 15 µl en utilisant comme matrice 30ng d'ADNg purifié. Les séquences des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 5. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 5 min à 95 °C, puis 30 cycles à 95 °C pendant 30 secondes, 55 °C pendant 30 secondes, 72 °C pendant 30 secondes et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 min. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % coloré au GelRed®. Les produits d'amplification ont ensuite été clonés dans un vecteur pCR 2.1-TOPO à l'aide du kit pCR TOPO TA Cloning (Invitrogen). Les clones recombinants positifs ont été identifiés par PCR sur colonie et ont été séquencés dans les deux sens à l’aide d’amorces universelles (M13R 5’-CAGGAAACAGCTATGAC-3’ ; M13F 5’-GTAAAACGACGGCCAG-3’) par la plateforme Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH.

Tableau 4. *Listes de plasmides contenants les gènes* Cg-bigdefs.

Gène	Provenance		Vecteur	Numéro Genbank	Amplicon (pb)	Référence
Cg-BigDef1	ADNg	France	pCR II TOPO (Invitrogen)	JN251125	946	(Rosa et al., 2011)
Cg-BigDef2	ADNg	France	pCR II TOPO (Invitrogen)	JN251126	845	(Rosa et al., 2011)
Cg-BigDef3	ADNg	France	pCR II TOPO (Invitrogen)	JN251122	1839	(Rosa et al., 2011)
Cg-BigDef4	ADNg	Brésil	pGEM-T Easy (Promega)	OP191675	640	(Rocha, 2020) Non publié
Cg-BigDef5	ADNg	Brésil	pGEM-T Easy (Promega)	OP191676	655	(Rocha, 2020) Non publié
Cg-BigDef6	ADNg	Brésil	pGEM-T Easy (Promega)	OP191677	928	(Rocha, 2020) Non publié
Cg-BigDef7	ADNg	Brésil	pCR 2.1 TOPO (Invitrogen)	OP191678	763	cette thèse

Amplification PCR et qPCR :Les amplifications par PCR pour tester l'efficacité et la spécificité des amorces de *Cg*-BigDefs ont été réalisées dans un volume de réaction de 15 µL contenant 7,5 µL Green Buffer; 0,4 mM dNTP; 2 mM MgCl; 0,4 µM amorces, 1 U GoTaqG2 FlexiDNA (Promega) et en utilisant comme matrice 1 ng d'ADN plasmidique (ADNp) contenant les gènes *Cg*-BigDefs. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 5 min à 95 °C, puis 30 cycles à 95 °C pendant 30 secondes, 57 °C pendant 30 secondes, 72 °C pendant 45 secondes et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % coloré au GelRed®.

Pour réaliser les qPCR pour le génotypage des différentes familles d'huîtres, nous avons utilisé le Robot pipetteur Labcyte et le LC 480 de Roche sur la plateforme MGX de l'Université de Montpellier. Le mix d'amorce est concentré à 0,2 µM pour chaque couple d'amorces. Le mastermix est composé 0.75 µL de mix de réaction de SYBR green et 0,25 µL de réaction de mix d'amorce. Les échantillons d'ADNg sont dilués à 20 ng/µL, ou 0.25 ng pour les l'ADNp contenant les gènes *Cg*-BigDefs utilisées ici comme contrôle positifs, 0.5 µL sont utilisés par réaction. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 10 min à 95 °C, puis 40 cycles à 95 °C pendant 10 secondes, 56 °C pendant 1 min, X °C pendant 3 min et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 25 secondes, avec X égales 57°C pour *Cg*-Bigdef1-2 et *Cg*-BigDef4 ou 62°C pour *Cg*-BigDef3,5,6 et 7 ou 60°C pour *Cg*-EF1α. Les résultats sont analysés sur le logiciel LightCycler 480 version 1.5.1.62. La signification statistique entre la détection des gènes de *Cg-bigdefs* et la capacité des huîtres à survivre au virus OsHV-1 µVar a été déterminée par un test ANOVA à $p < 0,05$ et un test de comparaisons multiples de Sidak.

Résultats

Afin d'étudier le phénomène de PAV sur les 7 gènes connus codant une *Cg*-BigDef, nous avons tout d'abord cloné le gène *Cg-bigdef7* dans un plasmide, comme cela a été fait pour les 6 autres Big défensines par notre collaborateur Rafael da Rosa (LIAA, Brésil). Ces clonages nous ont permis d'obtenir un témoin positif pour tester l'efficacité et la spécificité des amorces pour les 7 gènes de *cg-bigdefs*. Ceci nous a permis d'obtenir pour chaque Big-défensine un couple d'amorce spécifique pour le génotypage en PCR classique et qPCR des populations naturelles d'huîtres françaises et chez la famille F14-V. Cependant il est important de noter que les gènes c*g-bigdef1* et *cg-bigdef2* sont différenciables en PCR classique mais pas en qPCR. Les amorces retenues sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Liste des amorces fonctionnelles pour l'analyse du PAV des Cg-bigdefs en PCR et qPCR.

Gène cible	**Nom du couple d'amorce**	**Séquence Forward 5'-3'**	**Séquence Reverse 5'-3'**	**T°C qPCR**	**Tm attendu par qPCR (+/- 0,5°C)**	**Taille amplicon attendu par PCR (pb)**
Cg-bigdef1-2	CgB24 F/R (#289)	GGAGAGAAAATTCTGACCATGAC	CATAGTTTATCCCCTCCGTC	57°C	83	1=178 ; 2=153
Cg-bigdef3	P13-F/P14-R	GAACTGTTAGTGTGCTGTGG	ACTAGTATCATGGCTAACGC	62°C	80	511
Cg-bigdef4	P17-F/P22-R	CAAACTCAGACAGTCATT	CTGCTTGCATGGATTACCCC	57°C	82	150
Cg-bigdef5	P23-F/P26-R	AATCAAGTCAACATGAACAG	GATGGCTGTCATGTCGAG	62°C	84,5	536
Cg-bigdef6	P29-F/P30-R	TCAAGGAAGGTAATACACAC	CTGAGCATGGCTTTGAACTG	62°C	83	553
Cg-bigdef7	CgB35 F/R	AGAGTGTCTGACAAAGAC	ATATTAACCTCTTCTCCTGC	62°C	83,5	195
Cg-efF1-α	EFU	GAGCGTGAACGTGGTATCAC	ACAGCACAGTCAGCCTGTGA	60°C	74	x

Le génotypage des Big-défensines a été effectué de manière individuelle sur 31 huîtres appartenant à des populations naturelles provenant de différents sites (Brest #4, #5, #6 et #1, Chaucre, Mimizan et Vidourle). Expérimentalement, il a été montré que ces populations présentent une résistance différente au virus OsHV-1 µVar, dont les taux de survie sont respectivement de 50%, 30%, 50%, 30%, 100%, 75% et 75% (

Tableau ***3***) (Gawra et al., 2023). En outre, 51 huîtres appartenant à la famille F14-V hypersensibles au virus OsHV-1 µVar ont également été testées (J.M. Escoubas, pers.com.).

Figure 23. Génotypage pour les gènes *Cg-bigdefs* de manière individuelle des 82 huîtres testées provenant soit de populations naturelles soit de la famille F14-V. Pour chaque population d'huîtres naturelles, les pourcentages de résistance au virus OsHV-1 µVar sont indiqués entre parenthèses pour chaque site de prélèvement. Les individus résistants sont indiqués par un R bleu et les individus sensibles par un S rouge. Les numéros de chaque individu est inscrit. Les individus positifs pour la *Cg-bigdef* ciblée et le témoin positif de qPCR *Cg-ef1α* sont indiqués en vert.

Les résultats montrent que le gène *Cg-bigdef4* est le plus fréquente chez les populations naturelles françaises avec 100% d'individus positifs, suivi de *Cg-bigdef7* (96,8%) et *Cg-bigdef1-2* (41,9%) (Figure 23 ; Tableau 6). *Cg-bigdef3* a été identifié chez deux individus, l'un provenant du site Brest #4 et l'autre de Chaucre. *Cg-bigdef5* a été retrouvé chez deux individus, un du site Brest #1 et l'autre de Chaucre, tandis que *Cg-bigdef6* a été identifié chez un seul individu de Mimizan (Figure 23Il est intéressant de noter qu'un seul animal (individu trouvé à Chaucre) possède les quatre gènes de *Cg-bigdefs* (Figure 23). Aucune différence dans le génotypage n'a été trouvée dans la détection des *Cg-bigdefs* entre les phénotypes résistants (R) et sensibles (S) à l'infection au virus OsHV-1 µvar (P value = 0,1571). Ce résultat rappelle celui de l'étude de Rosa et al. en 2015, qui n'avait pas pu démontrer de lien entre le PAV affectant les *Cg-bigdefs* et la résistance à l'infection par une souche virulente de *Vibrio* (Rosa et al., 2015). Comme pour les populations naturelles, les individus de la famille F14-V hypersensible au virus présentent 100% de prévalence de *Cg-bigdef4*, 86,3% de *Cg-bigdef7* avec et 47,1% de *Cg-bigdef1-2* (Tableau 6). Aucun autre gène de *Cg-bigdef* n'a été détecté chez les individus appartenant à cette famille (Figure 23). Ceci indique que la résistance au virus OsHV-1 µvar est vraisemblablement indépendante du génotype lié aux *Cg-bigdef.*

Tableau 6. Présence des gènes de *Cg-bigdefs* sur l'ensemble des d'huîtres analysées.

Gène	**Nombre d'individus positifs**	**%**
cg-bigdef1-2	37	45,1
cg-bigdef3	2	2,4
cg-bigdef4	82	100,0
cg-bigdef5	2	2,4
cg-bigdef6	1	1,2
cg-bigdef7	75	91,5
Combinaison de genes		
cg-bigdef1-2 et *cg-bigdef4*	2	2,4
cg-bigdef4 et *cg-bigdef7*	34	41,5
cg-bigdef1-2 et *cg-bigdef4* et *cg-bigdef7*	36	43,9
cg-bigdef1-2 et *cg-bigdef5* et *cg-bigdef7*	2	2,4
cg-bigdef3 et *cg-bigdef5* et *cg-bigdef7*	1	1,2
cg-bigdef1-2 et *cg-bigdef4* et *cg-bigdef5* et *cg-bigdef7*	1	1,2
Une seule forme de c*g-bigdefs (cg-bigdef4)*	6	7,3
absence de *cg-bigdefs*	0	0,0
toutes les formes de *cg-bigdefs*	0	0,0
Nombre d'individus testés	**82**	

Conclusion

Chez l'ensemble des huîtres analysées (Tableau 6), Cg-Bigdef4 est présente dans 100% des individus, suivie de Cg-Bigdef7 (91,5%) et Cg-Bigdef1-2 (45,1%). Cg-BigDef3 et Cg-BigDef5 sont présentes chez seulement 2,4% des individus, et Cg-BigDef6 chez 1,2% des individus analysés. D'une manière générale, les individus possèdent 2, ou 3 formes de Cg-BigDefs. On retrouve ainsi le plus fréquemment les combinaisons suivantes : {Cg-BigDef4 et Cg-BigDef7}, ce qui correspond à la combinaison retrouvée dans le génome de l'huître publié par le Roslin Institute, Edinburgh (Peñaloza et al., 2021) mais aussi la combinaison {Cg-BigDef1-2, Cg-BigDef4 et Cg-BigDef7}. Il serait intéressant d'étudier le rôle fonctionnel de Cg-BigDef4 et Cg-BigDef7 chez l'huître *C. gigas* ainsi que leur activité antimicrobienne. On ignore à ce jour si la diversité des séquences de big-défensines est plutôt produite par des évènements de duplication dans le génome ou s'il s'agit d'une diversité allélique. Par ailleurs, sur la base de nos analyses en populations naturelles, nous n'avons aucune évidence que la diversité de big défensines puisse être associée au phénotype de résistance/ de sensibilité des huîtres au virus OsHV-1.

I.4. Résultats complémentaires 2. Essai d'invalidation des gènes codant *Cg*-BigDef1-2 par la méthode d'interférence par l'ARN (ARNi)……..

Contexte et objectifs :

Afin d'étudier le rôle des Big défensines dans le contrôle du microbiote de l'huître *C.gigas*, notre première stratégie a été de tenter d'inhiber l'expression *in vivo* de *Cg-bigdef1* et *2* par la technique d'interférence par l'ARN (ARNi) (Cullen, 2006).

L'interférence par l'ARN (ARNi) est un processus biologique naturel permettant d'inactiver spécifiquement la traduction d'un ARN messager, empêchant ainsi l'expression et la synthèse d'une protéine donnée. C'est un processus antiviral mais aussi un mécanisme permettant la régulation de l'expression de gènes présents chez une grande variété d'organismes eucaryotes, des plantes aux mammifères (Jeang, 2012). L'ARNi implique la production de petits ARN interférents de 21 à 25 nucléotides (small interfering RNA ; « siRNA ») à partir d'ARN double brins (double stranded RNA ou ARN double brin, ARNdb) découpés par l'enzyme Dicer. Ces petits ARNs sont ensuite incorporés dans un complexe ribonucléoprotéique dénommé RISC (RNA-induced silencing complex) via les protéines argonautes (AGO) où ils servent de guide pour la reconnaissance de l'ARNm cible (Figure 24). L'appariement avec l'ARNm cible active une activité de nucléase et la coupure endonucléolytique puis la dégradation de l'ARNm permettant ainsi l'extinction de l'expression d'un gène (Jeang, 2012). Ce mécanisme a été appliqué avec succès chez de nombreux organismes pour l'étude la fonction des gènes. L'ARNi peut être induit en introduisant de longs ARNdb complémentaires de l'ARNm cible à dégrader dans les cellules et les organismes de mammifères. Cependant, l'introduction d'ARNdb de plus de 30 pb active une puissante réponse antivirale via la voie des interferons. Pour contourner cela, l'utilisation de « siRNA » synthétiques a été développé et utilisé pour induire l'ARNi dans les cellules et les organismes de mammifères.

Chez l'huître creuse, injection d'ARNdb a permis de mettre en évidence la fonction de gènes impliqués dans le développement des gonades (Fabioux et al., 2009) ou dans l'immunité comme *Cg-mav* par injection de «siRNA»(Huang et al., 2017). De plus, l'invalidation du gène qui fait l'objet de cette étude, *Cg-bigdef1*, par injection de dsARN a déjà été publiée (Jee et al., 2014). Cette technique a aussi permis de révéler le rôle de la Big défensine de la coquille Saint-Jacques dans le contrôle de son microbiote (González et al., 2020).

L'objectif de cette étude préliminaire était de tester cette technique sur l'invalidation de l'expression des gènes codant les Big-défensines d'huître et de mesurer les effets de cette inhibition sur le microbiote cultivable et total associé aux huîtres. Dans ce but, en raison de l'existence de PAV, nous avons recherché la présence des gènes de Big défensines chez différentes familles d'huîtres.

Nous avons ensuite mis au point les conditions d'infection expérimentales favorables à l'observation de l'expression des gènes codant les Big défensines choisies, et leur invalidation. Enfin, différents tests ont été réalisés pour mettre au point les conditions optimales d'invalidation. Nous avons choisi de tester l'utilisation de « siRNA », des études antérieures ayant montré la présence d'une voie de type interféron chez l'huître (Green et al., 2015) qui peut être induite par l'injection d'ARN double brins (Lafont et al., 2017). Le suivi de l'invalidation et son impact sur l'expression de gènes immunitaires antiviraux (effets « off target ») ont été réalisés par RT-qPCR.

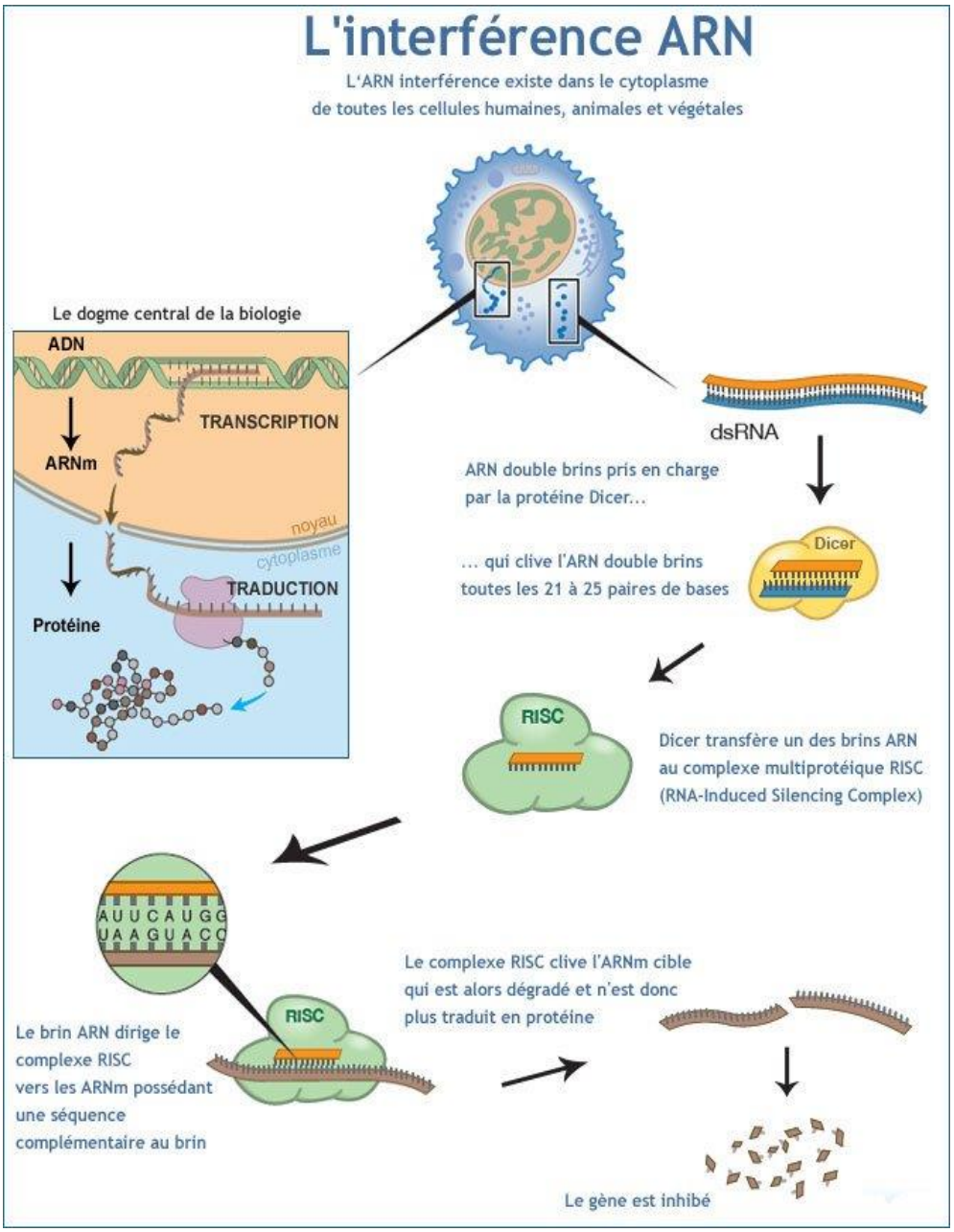


Figure 24. Représentation schématique regroupant les étapes principales du mécanisme de l'interférence ARN. Adaptation et traduction de *© Annika Röhl/The Nobel Committee for Physiology or Medicine.*

Matériels et méthodes

Matériel biologique : Grâce à notre collaboration avec Bruno Petton (Ifremer, unité PHYTNESS, Argenton), nous avons disposé de 7 familles d'huîtres issues de croisement multiparentaux (nommées F15 et F32 issue du projet ANR Decipher, ANR-14-CE19-0023) ou biparentaux (5 familles du projet ANR Decicomp- ANR-19-CE20-0004 nommées H2-D, F14-R, F14-V, F11-N, F11-O). Les animaux ont été produits par la plateforme Ifremer d'Argenton, élevés dans la plateforme Ifremer de Bouin (Unité Ifremer EMMA) puis transportés et stabulés en eau de mer à 13°C à leur arrivée à Montpellier.

Test de la présence/ absence de gènes : 20 animaux par famille (F15, F32, H2-D, F14-R, F14-V, F11-N et F11-O) ont été prélevés et congelés à -20°C. Dix individus par famille ont été utilisés pour observer le PAV des gènes. La présence des gènes a été suivie par qPCR, après extraction de l'ADN génomique.

Test de l'inductibilité des gènes de *Cg-bigdef1-2* : 45 huîtres de la famille F32 ont été utilisées pour observer le profil d'expression des gènes *Cg-bigdef1/2* suite à une stimulation bactérienne. Quinze huîtres n'ont subi aucun traitement (condition « NT » pour Non Traité). Quinze huîtres ont subi une infection a *Vibrio tasmaniensis* LGP32 par injection de 5.10^6 CFU/mL (Condition « BAC » pour bactérie). Quinze huîtres ont subi en tant que contrôle une injection d'eau de mer stérile (condition « FSW » pour Filtered SeaWater). Aux temps 0, 24h et 48h post-injection, 5 animaux par condition ont été prélevés. La coquille a été enlevée, les huîtres congelées de manière individuelle dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Chaque huître a été broyée et réduites en poudre dans de l'azote liquide et dans des bols en acier inoxydable de 50 mL avec des billes d'acier de 20 mm de diamètre (broyeur Retsch MM400). Les poudres obtenues (stockées à -80 °C) ont ensuite été utilisées pour l'extraction d'ARN.

ARN interférence : 383 huîtres naïves de la famille F32 ont été utilisées. 10 huîtres n'ont subi aucun traitement (condition « Super Non Traité » ; SNT). L'expérimentation a été réalisée en deux temps : une première injection des différents «siRNA» dessinés sur les gènes cibles (Tableau 7) ou un «siRNA» contrôle (scramble «siRNA»- «siRNA» comportant les mêmes nucléotides que le «siRNA» testé mais de séquence différente) ou une injection d'eau de mer filtrée comme contrôle (Figure 25). 103 huîtres ont reçu une première injection d'eau de mer stérile (condition « FSW ») ; 65 ont reçu une injection d'un mix de 3 «siRNA» ciblant le gène de *Cg-bigdef1-2* à diffèrent zones du gène (condition « siBD1 ») (42,22 µg/ huître soit 15,28 µg/huître de siBD-1, 13,48 µg/huître de siBD-2 et 13,46 µg/huître de siBD-3) ; 65 ont reçu comme première injection des «siRNA» scramble du gène de *Cg-bigdef3* (41,76 µg/huître) (condition « siBD scramble »); 70 ont reçu comme première injection

des «siRNA» ciblant le gène *Cg-mav* (13,46 µg/huître) (Condition « siMAV ») ; 70 ont reçu comme première injection des «siRNA» ciblant le gène *Cg-bpi* (13,47 µg/huître) (condition « siBPI »). Trois jours après la première injection, une infection expérimentale a été réalisée utilisant la bactérie *V. tasmaniensis* LGP32 ($5x10^6$ CFU/mL) ou le virus OsHV-1 ($1,5x10^6$ UG/g d'huître entière, avec coquille) en fonction du gène ciblé. Les huître « FSW » ont été séparées en 3 lots : 35 huîtres de ce lot ont reçu une seconde injection d'eau de mer stérile (condition « FSW/FSW ») ; 25 huîtres FSW ont été stimulés par l'injection de *Vibrio tasmaniensis* LGP32 (condition « FSW/BAC ») ; 28 huîtres FSW ont été stimulées par l'injection du virus OsHV-1 (condition « FSW/virus »). Les huîtres des conditions siBD1, et siBD scramble ont été séparées en 2 lots : En contrôle un premier lot d'huîtres a reçu une injection de 50 µL d'eau de mer stérile ; le deuxième lot d'huître a été stimulé avec *Vibrio tasmaniensis* LGP32. Les huîtres des conditions siMAV et siBPI ont été séparés en 2 lots : en contrôle un premier lot d'huîtres a reçu une injection de 50 µL d'eau de mer stérile ; le deuxième lot d'huître a été stimulé par l'injection du virus OsHV-1. Cinq huîtres/condition sont prélevées des temps J-2 à J+72h (Figure 25) pour les différentes conditions et congelées dans l'azote liquide avant d'être réduites en poudres pour être conservées à -80°C jusqu'à leur analyse.

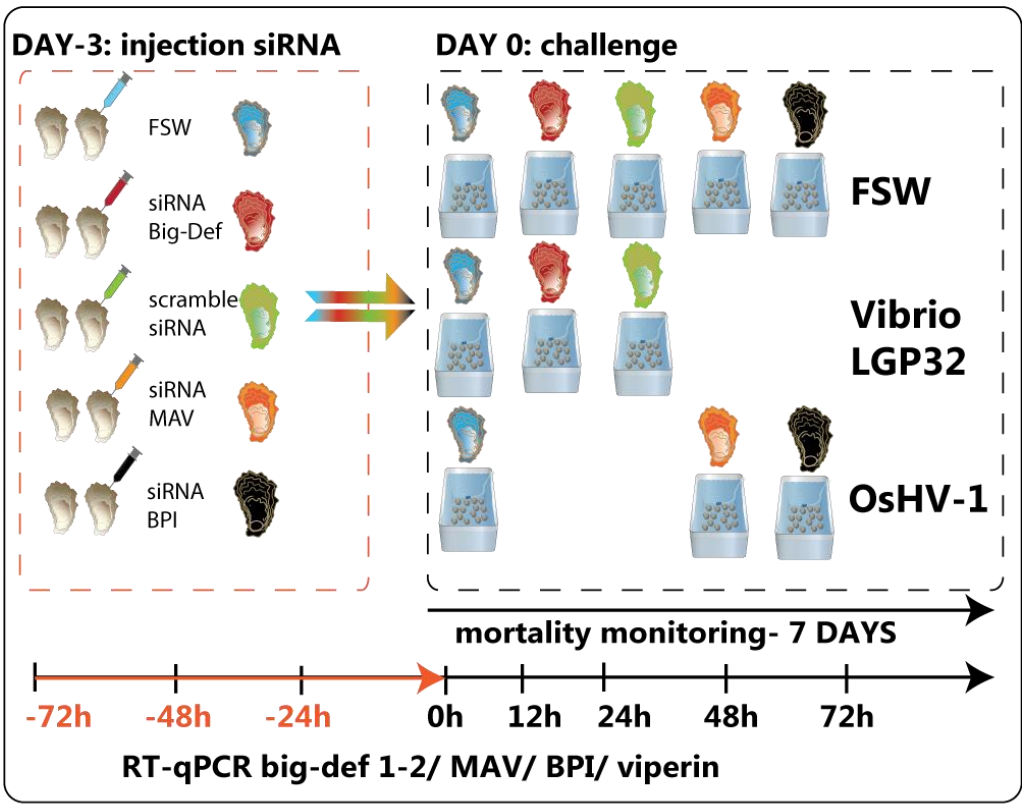


Figure 25. Plan expérimental du test de l'invalidation des gènes *Cg-bigdef1-2*. Les individus sont injectés soit avec de l'eau de mer stérile (FSW) en bleu, soit avec « siRNA » ciblant *Cg-bigdef1-2* en rouge, soit avec « siRNA » scramble en vert, soit avec « siRNA » ciblant *Cg-mav* en orange, soit avec « siRNA » ciblant *Cg-bpi* en noir. 72h après la première injection, les différents lots sont injectés avec de l'eau de mer stérile (FSW), la moitié des lots injectés par le « siRNA » ciblant *Cg-bigdef1-2* et le « siRNA » scramble sont stimulés par *Vibrio tasmaniensis* LGP32 à une dose de $5x10^6$ CFU/mL et la moitié des lots injectés par le « siRNA » ciblant *Cg-mav* et *Cg-bpi* sont

stimulés par le virus OsHV-1 à une dose de $1{,}5x10^6$ UG/g d'huître entière. La mortalité est suivie pendant une semaine après la deuxième injection. La cinétique de prélèvement est indiquée, pour chaque temps, cinq huîtres sont prélevées. Les huîtres prélevées sont ensuite réduites en poudre dans l'azote liquide, l'ARN est extrait pour réaliser un suivit de l'expression des gènes *Cg-bigdef1-2, Cg-mav, Cg-bpi* et *Cg-viperin* par RT-qPCR.

Tableau 7. Liste des séquences des « siRNA » utilisées pour l'invalidation.

gènes cibles		**« siRNA »**			
nom	**Genbank AN**	**nom »siRNA»**	**sens**	**anti sens**	**référence**
Cg-bigdef1-2	AN359465892	siBD-1	GAGCCUA*CG*CCCUUUACAGAU	AUCUGUAAAGGG*CG*UAGGCUC	
		siBD-2	GGUUU*CG*CCUGCUUCCAUAAU	AUUAUGGAAGCAGG*CG*AAACC	
		siBD-3	GCCCUUUACAGAUACAACAUA	UAUGUUGUAUCUGUAAAGGGC	
Cg-bigdef3	AN332692920	siBD-scramble	GUCUUU*CGCGUCG*CUCAUCUA	UAGAUGAG*CGACGCG*AAAGAC	
Cg-mav	KY630189	si-MAV	GUGAUGUUUCAAACAGAGAAG	CUUCUCUGUUUGAAACAUCAC	(Huang et al., 2017)
Cg-bpi	AY165040.1	si-BPI	GGCUUACAGACUAGAAUCACU	AGUGAUUCUAGUCUGUAAGCC	

Extraction d'ADNg : l'ADN génomique a été extrait des huîtres congelées après dilacération des tissus à l'aide d'un scalpel stérilisé en suivant le protocole du kit Wizard®SV Genomic DNA Purification System (Promega). L'ADNg purifié a ensuite été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop™).

Extraction d'ARN totaux : L'ARN a été extrait des huîtres réduites en poudres. La poudre d'huître congelée (20 mg) a été homogénéisée dans 1,5 mL de Trizol au vortex 90 min à 4 °C. Avant l'extraction, les matières insolubles ont été éliminées par centrifugation à 12 000 × g pendant 10 min à 4 ° C. L'ARN a ensuite été purifié à partir de 500 µL de Trizol, à l'aide du kit Proteigene Direct-zol (ref R2052) en suivant le protocole du fournisseur. L'ARN a ensuite été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop™).

Reverse Transcription (synthèse d'ADN complémentaire- ADNc) : Les concentrations d'ARNs ont été préalablement ajustées à 125 ng/µL avec de l'eau DNase/RNase-free (ou nuclease-free). Les réactions ont été effectuées à partir de 500 ng d'ARN totaux (4µL) auxquels ont été ajoutés dans un premier temps 8 µL d'un mélange de 1 µl de random primers (250 ng/µL- Invitrogen®#48190-011), 1 µl de dNTPs (10 mM -Invitrogen®#10297-018) et 6 µL d'eau nuclease-free. Ce mélange a ensuite été incubé 5 min à 65°C dans un thermocycleur. Après cette incubation, les échantillons sont placés immédiatement sur glace puis 8 µL d'un mélange de 4 µL de tampon 5x first strand buffer, 2 µL de DTT (0.1M) 1 µL de RNase Out (Invitrogen®#10777-019) et 1 µL M-MLV-RT (Invitrogen®#28025-013),

est ajouté et incuber aux températures suivantes dans un thermocycleur : 25°C 10 min, 37°C 50 min, 70°C 15 min et pause à 4°C. Les ADNc ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Quantification relative par qPCR:

- La présence ou l'absence des gènes a été observée par amplification de l'ADNg par qPCR à partir d'échantillons individuels avec des paires d'amorces spécifiques des gènes *Cg-bigdef*1-2, *Cg-bigdef3, Cg-bpi, Cg-mav* et du gène *Cg-ef1-*α (Tableau 8). Pour réaliser les qPCR, nous avons utilisé le Robot pipetteur Labcyte et le thermocycleur LC 480 de Roche sur la plateforme MGX de l'Université de Montpellier. Le mélange d'amorce est concentré à 0,4 µM pour chaque couple. Le mastermix est composé 0,75 µL de mélange de réactionnel SYBR green et 0,25 µL de réaction de mix d'amorce. Les échantillons d'ADNg sont dilués à 20 ng/µL, 0.5 µL sont utilisés par réaction. Programme d'amplification : 3 min à 95°C (activation de la polymérase), puis 40 cycles composés de 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 60°C et 25 secondes à 72°C. Les résultats sont analysés sur le logiciel LightCycler 480 version 1.5.1.62.

- Le suivi de l'expression de gènes au cours des tests d'invalidation a été observé par amplification de l'ADNc produit par RT-PCR à partir d'échantillons individuels (décrit au-dessus) avec des paires d'amorces spécifiques des gènes *Cg-bigdef1-2, Cg-bigdef3*, *Cg-bpi Cg-mav* et du gène *Cg-ef1-*α (Tableau 8). Pour réaliser les qPCR, nous avons utilisé le Robot pipetteur Labcyte et le thermocycleur LC 480 de Roche sur la plateforme MGX de l'Université de Montpellier. Le mix d'amorce est concentré à 0,4 µM pour chaque couple de primers. Le mastermix est composé 0.75 µL de mix de réaction de SYBR green et 0,25 µL de réaction de mix d'amorce. Les échantillons d'ADNc sont dilués au 1/8ème, 0.5 µL sont utilisés par réaction. Programme d'amplification : 3 min à 95°C (activation de la polymérase), puis 40 cycles composés de 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 60°C et 25 secondes à 72°C. Les résultats sont analysés sur LightCycler 480 version 1.5.1.62.

Tableau 8. Liste des amorces de qPCR.

nom amorce	gène cible	séquence 5'>3' - Forward	séquence 5'>3'- Reverse	genbank ID	référence
EFU	*cg-ef1-α*	GAG*CG*TGAA*CG*TGGTATCAC	ACAGCACAGTCAGCCTGTGA	AB122066	(de Lorgeril et al., 2018)
BPI	*cg-bpi*	GAGAGAAAATCATTCTTGAG	CACCAAAGCAGCAAAGACTG	AY165040.1	(Gonzalez, Gueguen, Destoumieux-Garzon, et al., 2007)
BigDef1-2	*cg-bigdef1-2*	*CG*ATTGATTACAGG*CG*TTGA	TACCTGTGGTGTCTGGCAAT	AN359465892	(Rosa et al., 2011)
BigDef3	*cg-bigdef3*	GCTTTATGTCATCCTGCTGTTGG	CTTCTCATTCTGTGGTGCTCCTTTA	AN332692920	(Rosa et al., 2011)
MAV	*cg-mav*	GATAGAAATAGGAATGGA*CG*G	GTTATAGATCCA*CG*CTGCTCC	KY630189	(Huang et al., 2017)

Viperin	*cg-viperin*	TAAATG*CG*GCTTCTGTTTCC	CAGCTGAAGGTCCTCTTTGC	*CGI*_10018396	(Lafont et al., 2020)

Calcul des taux d'expression (fold change) : la méthode utilisée pour le calcul de l'expression relative des gènes lors des tests d'invalidation est celle du « $2^{-deta\ delta\ Ct}$ » (Pfaffl, 2001) en utilisant les formules suivantes :

- Delta Ct (ΔCt)= moyenne réplicats Ct échantillon 1 (gène cible) - moyenne réplicats Ct échantillon 1 (gène de ménage). Ici le gène de ménage utilisé est le gène codant le facteur d'élongation EF-1α (primers EFU), qui est exprimé de manière constitutive et ubiquitaire dans les tissus d'huître.
- Delta delta Ct (ΔΔCt)= ΔCt échantillon – ΔCt de l'ensemble des 10 individus non traités (SNT).
- Fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Résultats

Identification d'une famille d'huître exprimant *Cg-bigdef1-2*

Avant de réaliser l'invalidation des gènes de *big défensines*, il a fallu vérifier au préalable la présence ou l'absence des gènes au sein du matériel biologique utilisé. Comme Rosa et al. l'ont démontré en 2015, il y a une grande variation de la présence-absence (PAV) de ces gènes chez *C. gigas* (Rosa et al., 2015). Ceci impose de choisir une famille d'huîtres qui possède les gènes *big défensines* mais aussi qui présente une variation de présence/absence faible entre les individus. Nous avons ainsi testé la présence des gènes codant la Big défensine 1-2 (ces gènes étant difficiles à distinguer par PCR) et la Big défensine 3 au sein de 7 familles d'huîtres de fonds génétiques différents. Le suivi a été effectué par qPCR sur l'ADNg extrait de 10 individus par famille. Un premier contrôle a été réalisé en suivant l'amplification du gène de référence c*g-ef1-α*, et des gènes c*g-bpi* et *cg-mav* codant des protéines de l'immunité qui seront suivis dans la suite des expérimentations. Ce premier test montre la présence de ces gènes chez 100% des individus testés, attestant de l'efficacité des extractions d'ADNg et de la réaction de qPCR (Tableau 9). Le suivi des gènes de *big défensines* montrent la présence du gène *cg-bigdef1-2* dans 50, 70, 40, 90 et 60% des individus de la famille F15, F14-V, F14-R, F11-N et F11-O, respectivement. Au sein de la famille H2-D, aucun individu ne possède le gène *cg-bigdef1-2* (Tableau 9). Le gène *cg-bigdef3* est quant à lui présent chez tous les individus testés des familles H2-D, F14-V, F15 et F32, et présent pour 50%, 40% et 40% chez les individus testés de la famille F11-N, F11-0 et F14-R (Tableau 9). On observe ainsi une variation dans la présence/absence des gènes *cg-bigdefs* entre les familles et au sein d'une même famille. Seulement une famille, la famille F32, possède les 2 gènes *cg-bigdef* 1-2 recherchés dans tous les individus (Tableau 9). C'est donc cette famille qui a été retenue pour la suite de notre étude du rôle des Big défensines chez l'huître par ARN interférence et observer le profil d'expression des gènes *cg-bigdef1-2* et *cg-bigdef3*. Cependant, un second préalable

nécessaire était de connaitre les conditions d'induction de ces gènes, dans le but de suivre leur invalidation. Pour le gène *cg-bigdef3*, la moyenne des Ct obtenue était proche de 35, indiquant que ce gène est peu ou pas exprimé suite à une infection bactérienne (injection de *V. tasmaniensis* LGP32) chez la famille F32 (données non présentées). En revanche, l'inductibilité de l'expression de *cg-bigdef1-2* a pu être confirmée avec un pic majoritaire à 24h post-infection (Figure 26 ; Tableau 9). On observe cependant une grande variabilité interindividuelle dans l'expression de ce gène au sein de la même famille (Figure 26). Nous avons donc fait le choix de tester l'invalidation du gène *cg-bigdef1-2* dans la famille F32.

Tableau 9. Présence des gènes *Cg-bigdefs*, du facteur élongation *Cg-ef1α*, de *Cg-mav* et de *Cg-bpi* dans 7 différentes famille d'huîtres (H2-D, F11-N, F11-O, F14-V, F14-R, F15 et F32).

		Présence de l'expression basale des gênes (%)				
		Cg-bigdef1-2	*Cg-bigdef3*	*Cg-ef1*	*Cg-bpi*	*Cg-mav*
Famille d'huître *C.gigas*	H2-D	0%	100%	100%	100%	100%
	F11-N	90%	50%	100%	100%	100%
	F11-O	60%	40%	100%	100%	100%
	F14-V	70%	100%	100%	100%	100%
	F14-R	40%	40%	100%	100%	100%
	F15	50%	100%	100%	100%	100%
	F32	100%	100%	100%	100%	100%

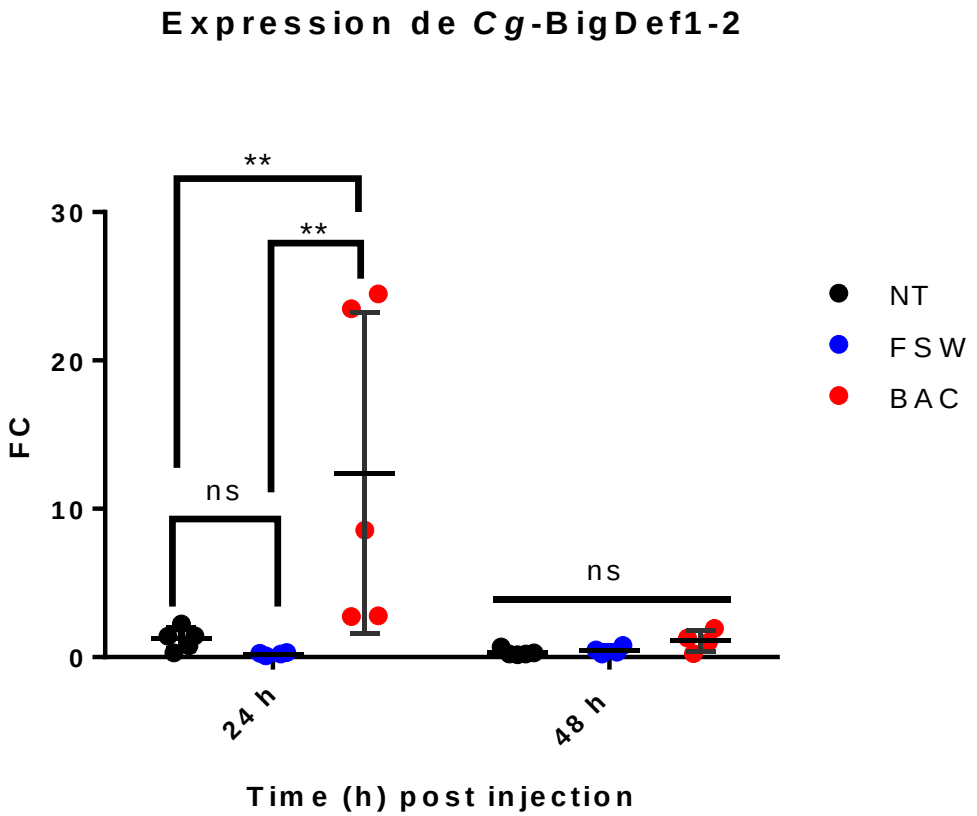


Figure 26. *Suivi de l'induction des gènes Cg-bigdef1-2 par V. tasmaniensis LGP32. Le* taux d'expression (Fold Change) du gène *Cg-bigdef1-2* à 24h et 48h post injection de *Vibrio tasmeniensis* LGP32 à une dose de $5x10^6$ CFU/mL est indiqué en rouge (BAC), le taux d'expression de *Cg-bigdef1-2* des individus non traités (NT) en noir et en bleu le taux d'expression de *Cg-bigdef1-2* chez les individus stimulés avec une injection d'eau de mer stérile (FSW). Chaque point représente un individu. Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparaisons test non paramétrique, ns : non significatif, ** P value < 0,005.

Test d'invalidation des gènes *Cg-bigdef1-2* et *Cg-mav*

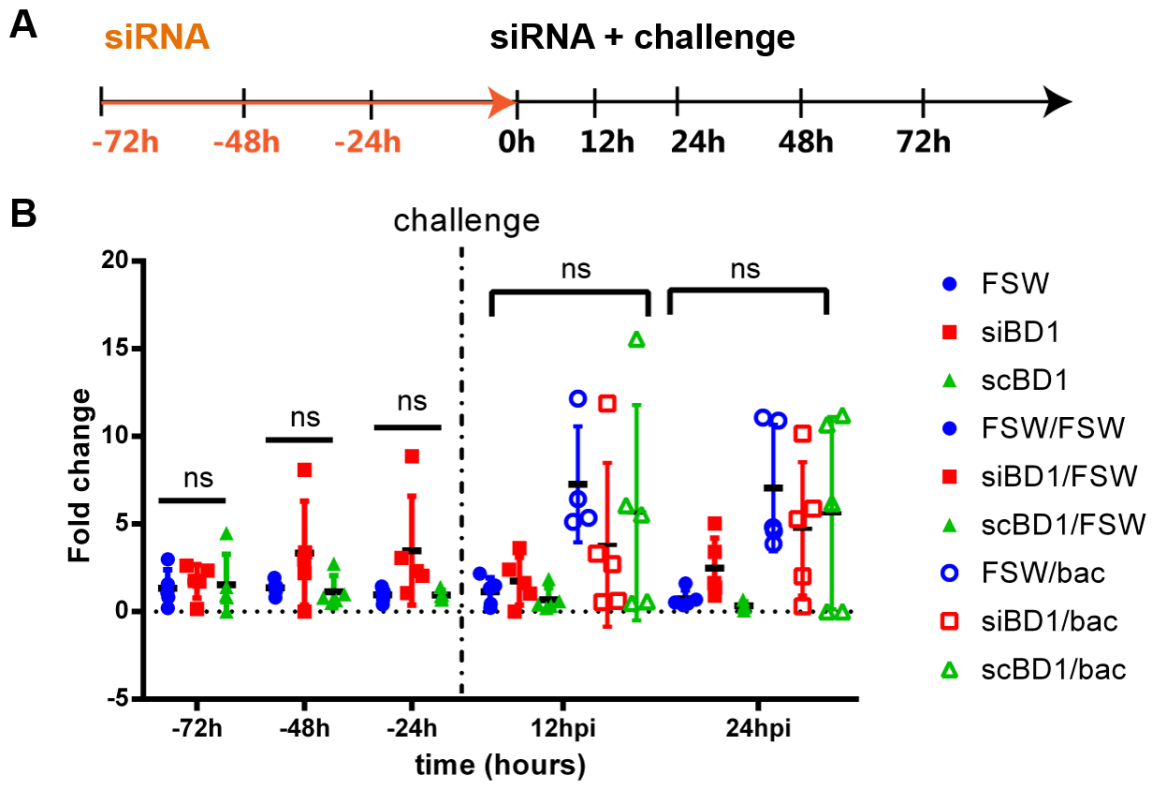
Pour effectuer l'invalidation par ARNi des Big défensines, nous avons injecté dans le muscle adducteur différents lots d'huître de la famille F32 avec des «siRNA» ciblant le gène *cg-bigdef1* (siBD1) (Figure 25). Nous avons également utilisé différents contrôles : des animaux injectés soit avec de l'eau de mer filtrée stérile (FSW), soit un « siRNA » scramble du ciblant la *big défensine* (scBD), comme contrôle « négatif » ; des animaux injectés avec « siRNA » ciblant les gènes *cg-mav* et *cg-bpi,* comme contrôles « positifs ». En théorie, les « siRNA » scramble sont des « siRNA » comportant les mêmes nucléotides que le « siRNA » testé mais de séquence différente. Dans cette expérience, un « siRNA » scramble dessiné sur le gène de la *big défensine* 3 mais ne comportant aucune homologie avec les gènes de *big défensine* 1 et 2 a été utilisé (Tableau 7).

Le gène de référence est *ef1-α*, un facteur l'élongation qui est exprimé de manière constitutive et présent en une seule copie. Le gène *bpi* code une protéine antimicrobienne et le gène *mav* codant un élément de la voie des interférons sont ici des témoins. Le gène *mav* est un gène dont l'invalidation a

été mise en œuvre par l'équipe de Huang en 2017 et qui nous servira de contrôle expérimental lors de nos expériences d'invalidation.

Trois jours après cette injection, les différents lots ont été soit stimulés avec une suspension bactérienne de *V. tasmaniensis* LGP32 à une concentration sub-létale pour induire l'expression des gènes codant les *big défensines* 1 et 2, soit avec de l'eau de mer filtrée (FSW) comme contrôle négatif. La mortalité a été suivie pendant 7 jours après l'infection et des échantillons ont été prélevés tout au long de la cinétique pour suivre l'expression des gènes cibles avant et après invalidation et stimulation.

Nos résultats indiquent que l'expression du gène *cg-bigdef1-2* n'est pas modifiée de façon significative à 24, 48 et 72h après l'injection de « siRNA » ciblant ce gène (Figure 27). Par ailleurs, l'expression du gène *cg-bigdef1-2* n'est réprimée ni à 12h, ni à 24h après stimulation par les bactéries (Figure 27). L'invalidation du gène *cg-bigdef1-2* par ARN interférence n'a donc pas fonctionné. De plus, il est important de noter que l'on observe une forte variation inter-individuelle dans l'expression de *cg-bigdef1-2.*



Tukey's multiple comparaisons no paramétrique,test ns : no significatif

Figure 27. Test de l'invalidation du gène *Cg-bidgdef-1 et 2* par ARN interférence. A) Cinétique d'injection et prélèvement pour suivre l'invalidation du gène avant et après challenge bactérien. B) Taux d'expression (Fold change ; FC) du gène *Cg-bigdef1-2* au cours de la cinétique d'invalidation par ARN interférence. En bleu le taux d'expression de *Cg-bigdef1-2* chez les individus injectés avec de l'eau de mer stérile (FSW) et en rouge le taux

d'expression de *Cg-bigdef1-2* chez les individus injectés avec le « siRNA » ciblant le gène *Cg-bigdef1-2* (siBD1) et en vert le taux d'expression de *Cg-bigdef1-2* chez les individus injectés avec le scramble (scBD1). Challenge avec FSW en symbole plein. Challenge avec LGP32 en symbole vide. Chaque point représente un individu. Test non paramétrique à multiple comparaisons Tukey's, ns = non significatif.

Nous avons effectué des expériences parallèles comme contrôle expérimental sur un autre gène cibles *cg-mav,* dont l'invalidation a été mise en œuvre par Huang et al. 2017 et qui observe un pic d'invalidation entre 72h et 120h après injection « siRNA ». Dans le cadre de notre expérience, le contrôle de l'injection des « siRNA » ciblant le gène *cg-mav* est l'injection de « siRNA » ciblant le gène *cg-bpi,* une protéine antimicrobienne. Nos résultats indiquent que l'expression du gène *cg-mav* n'est pas réprimée 72h après l'injection de « siRNA » ciblant ce gène (Figure 28). Par ailleurs, l'expression du gène *cg-bpi* n'est pas non plus réprimée à 48h après stimulation par le virus (Figure 28). Après stimulation par injection du virus OsHV1 , une induction signification du gène *cg-mav* est observée à 24hpi (Figure 28). L'invalidation du gène *cg-mav* par ARN interférence n'a donc pas fonctionné.

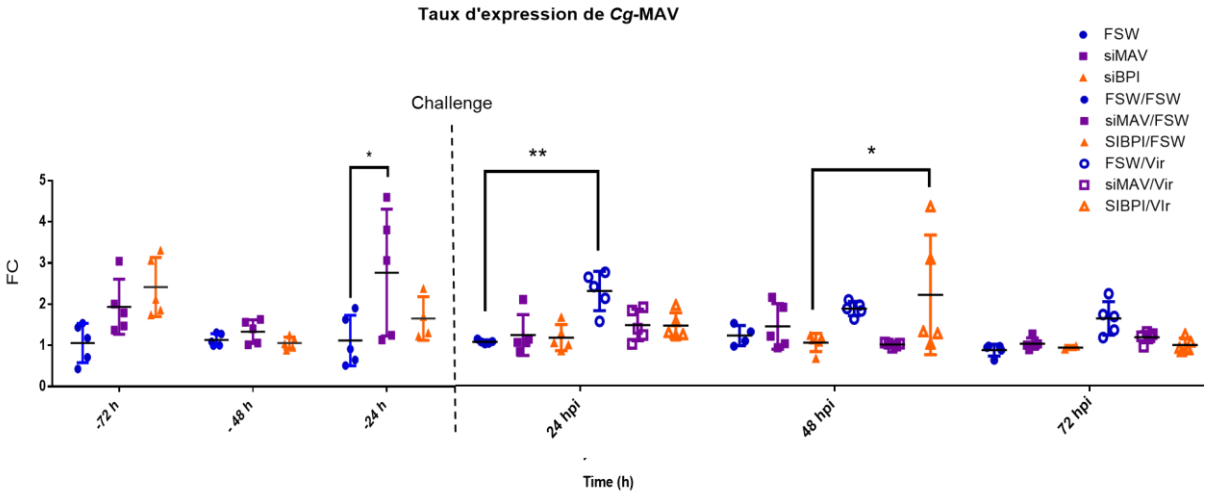


Figure 28. Test de l'invalidation de *Cg-mav* et *Cg-bpi* par ARN interférence. En bleu le taux d'expression (FC pour fold change) de *Cg*-MAV chez les individus injectés avec de l'eau de mer stérile (FSW) et en violet le taux d'expression de *Cg*-MAV chez les individus injectés avec le « siRNA » ciblant le gène *Cg*-MAV (siMAV) et en orange le taux d'expression de *Cg*-MAV chez les individus contrôle injectés avec le « siRNA » ciblant *Cg*-BPI (siBPI). Challenge avec FSW en symbole plein (FSW). Challenge avec le virus en symbole vide (Vir). Test non paramétrique à multiple comparaisons Tukey's, ns = non significatif.

En ce qui concerne le suivi des mortalités, l'injection de « siRNA » ciblant le gène de la *big défensine* 1 et 2 ou si-scramble n'ont pas induit de mortalités significatives. Comme prévu la dose sub-létale de bactéries n'a pas induit de mortalités (Figure 29). Lors de l'expérience réalisée en parallèle sur le gènes cible *Cg-mav*, où le challenge a été induit par l'injection du virus OsHV1, on peut observer sur

le suivi de mortalités que les huîtres injectées avec des « siRNA » (ciblant les gènes *mav* et *bpi*) ont un taux de mortalité significativement moins élevé que le contrôle positif (FSW/Vir)(Figure 29).

Au vu de ces résultats, nous avons fait le choix d'observer l'expression de la *vipérine*, une protéine antivirale induite par la voie de l'interféron. L'expression de *Cg-viperine* est régulée positivement suite à l'injection « siRNA » ciblant les gènes *Cg-bigdef1-2*, *Cg-mav* et *Cg-bpi*, 24h post injection des « siRNA » de manière significative (Figure 30).

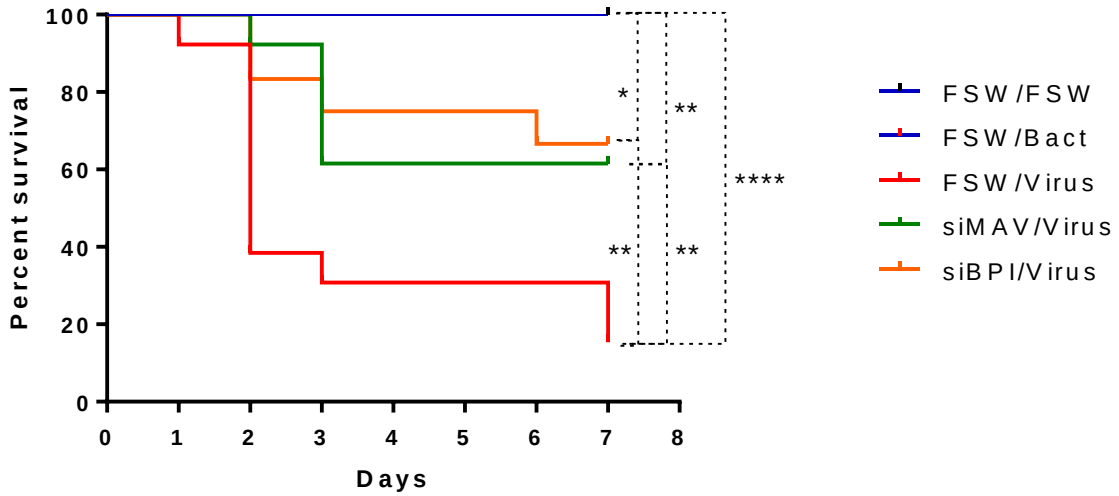


Figure 29. Suivie des mortalités au cours des tests d'ARNi. Les courbes de survie de Kaplan-Meier des huîtres injectées avec de l'eau de mer (FSW) puis injectées après 72h avec de l'eau de mer stérile (FSW/FSW, en bleu et noir) ou *Vibrio tasmaniensis* LGP32 à une dose de $5x10^6$ CFU/mL (FSW/Bact, en bleu et rouge), ou par le virus OsHV-1 à une dose de $1,5x10^6$ UG/g d'huître entière (FSW/Virus, en rouge) sont représentées. Les survies des huîtres injectées avec le « siRNA » ciblant *Cg-mav* et *Cg-bpi* puis stimulées après 72h par le virus OsHV-1 à une dose de $1,5x10^6$ UG/g d'huître entière sont représentées (siMAV/Virus en vert; siBPI/Virus en orange). (n = 15 pour chaque conditions). Log-rank (Mantel-Coc) test ; * P value <0.05 ; ** P value <0.01, **** P value <0.0001.

.

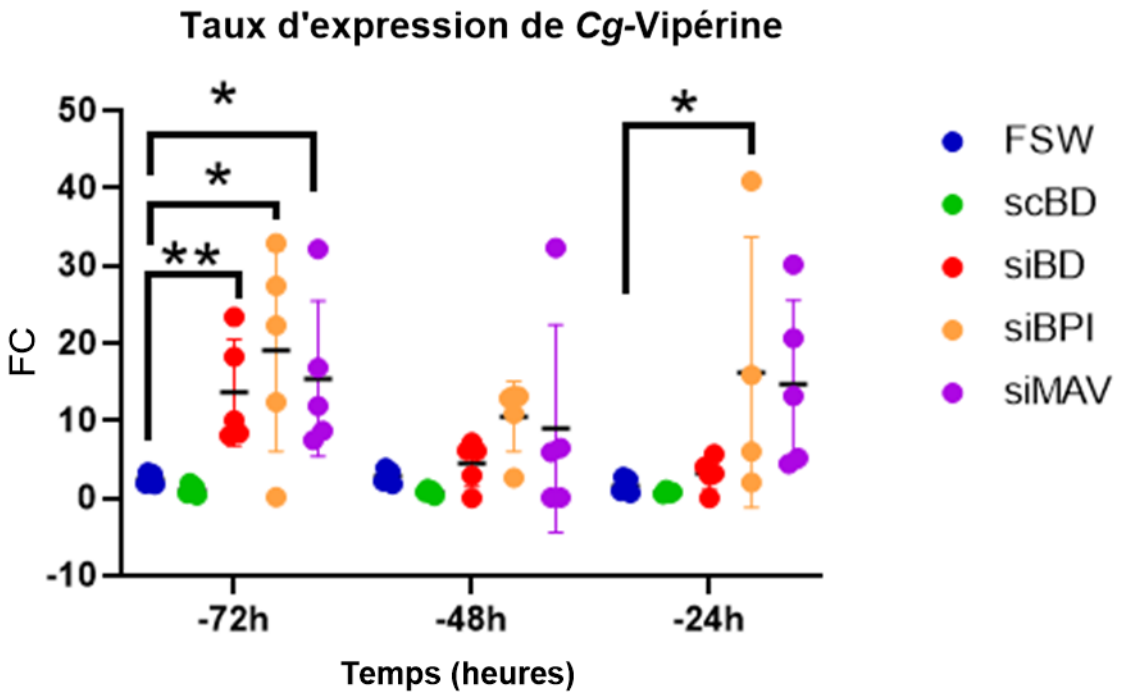


Figure 30. Taux expression de *Cg-vipérine* dans les premiers temps de la cinétique. Le taux d'expression (FC) a été déterminé 24, 48 et 72h après injection d'eau de mer stérile en bleu (FSW) comme témoin négatif, ou l'injection de « siRNA » ciblant les gènes *Cg-bigdef1-2* (siBD) en rouge, ou le scramble (scBD) en vert, ou *Cg-mav* en violet (siMAV) et *Cg-bpi* en orange (siBPI). Test non paramétrique à multiple comparaisons Tukey's, * P value <0,05, ** P value < 0,01.

Conclusion –Discussion

L'utilisation de l'ARN interférence (ARNi) pour l'invalidation de gènes est une méthode couramment utilisée pour étudier la fonction des gènes chez les organismes. Cependant, cette technique n'a pas encore été largement utilisée chez l'huître *Crassostrea gigas* pour étudier la fonction des gènes de l'immunité. Dans cette étude, nous avons évalué l'utilisation de l'ARNi pour l'invalidation de deux gènes de Big défensine, *cg-bigdef1 et cg-bigdef2*.

Pour valider la technique, nous avons en parallèle testé l'invalidation d'un gène, *cg-mav*, impliqué dans la réponse immunitaire antivirale chez l'huître en se basant sur les travaux de Huang et al. 2017. Ces travaux montraient que l'invalidation de ce gène influait sur la réponse antivirale de l'huître face à une infection au virus OsHV-1. Lorsque le gène était invalidé, la réponse antivirale était enrayée et le taux de mortalité augmenté face à OsHV-1. Les résultats de nos tests montrent que nous n'avons pas réussi à reproduire les travaux d'invalidation du gène *cg-mav* : aucune variation significative de l'expression du gène n'a pu être observée. En fait, le phénotype obtenu était opposé aux résultats de Huang et al. avec une augmentation de la survie des animaux face à OsHV-1. Les analyses du taux d'expression du gène de la Vipérine ont par ailleurs montré une augmentation de son expression en présence de «siRNA» suggérant une activation de la réponse antivirale. Des résultats qui font écho

aux travaux menés au laboratoire sur le priming immunitaire antiviral qui ont montré que l'injection d'ARN double brin de différentes tailles était capable d'induire une protection antivirale chez l'huître tout comme l'expression de gènes de voies immunitaires conservées impliqués dans la réponse antimicrobienne (voie NF-κB) (Lafont, 2017). Nos résultats montrent donc que comme pour les ARNdb, l'injection de «siRNA» induit une réponse immunitaire notamment antivirale. Cependant, une des différences entre notre étude et celle de Huang et al. était la dose de «siRNA» utilisée (42µg dans notre étude versus 100mg). Cette dose est cependant supérieure aux doses employées dans les démonstrations d'invalidation par RNAi publiées dans la littérature chez l'huître et ne peuvent à elles seules expliquer la différence de phénotype observée (Fabioux et al., 2009; Huang et al., 2017; Jee et al., 2014).

Pour les gènes *Cg-bigdef1-2,* aucune invalidation n'a pu être observée au cours de nos expériences. Ces résultats sont en désaccord avec la seule étude déjà publiée dont l'objectif était la démonstration de l'invalidation de ces gènes chez *C. gigas* à l'aide d'ARNdb (Jee et al., 2014). Ces résultats ont été obtenus sur un très petit nombre d'animaux (3 par condition) pour lesquels les potentielles variations de PAV n'ont pas été considérées. Par ailleurs, le suivi de l'expression des gènes cibles, observée par la technique de Northern-blot non quantitative, montre des niveaux d'expression très hétérogènes aussi bien dans les conditions « invalidées » que dans les conditions contrôles (injection d'ARNdb ciblant la GFP) permettant de mettre en doute cette démonstration. Dans notre étude, l'importante variabilité inter-individuelle des taux d'expression de *Cg-bigdef* 1-2 observée, associée à l'important polymorphisme de séquence de ces gènes ne permet pas d'exclure que nos résultats soient attribuables à la sélection de « siRNA » pas assez spécifiques des séquences des gènes cibles présents dans la famille d'huître testée. Le séquençage de ces gènes dans la famille F32 permettrait de répondre à cette question. Cependant, les même résultats négatifs ont été obtenus pour les gènes *Cg-mav* et *Cg-bpi*, présentant peu de polymorphisme (Huang et al., 2017; Schmitt, Gueguen, et al., 2010).

En conclusion, si cette méthode a permis de mettre en évidence le rôle des Big défensines dans la régulation du microbiote chez la coquille Saint-Jacques (González et al., 2020), l'ensemble de ces résultats posent la question de la fonctionnalité de la voie endogène du RNAi chez l'huître et suggèrent que cette méthode est difficilement transposable dans notre modèle et s'avérera complexe à mettre en place pour l'étude des gènes de l'immunité. De nouveaux outils de génomique fonctionnelle telle que la technologie CRISPR-Cas9 pourront être un apport important pour l'étude de la fonction des gènes chez cette espèce (Yu et al., 2019) . Ces résultats nous ont conduit à utiliser une méthode alternative pour étudier le rôle des Big-Défensines dans le contrôle du microbiote de l'huître, présenté dans l'article 1, en utilisant les protéines synthétiques à notre disposition.

SECTION II : Etude du mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1.

II.1 Contexte et objectifs de l'étude

Ce chapitre de thèse se base sur des travaux précédemment réalisés par Loth et al. en 2019, dans lesquels la synthèse par ligation chimique de *Cg*-BigDef1 a permis d'effectuer des tests d'activité antimicrobienne *in vitro.* Ces tests ont révélé que ce peptide présentait une forte activité sur un large spectre de microorganismes, incluant des bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif ainsi que des champignons. Parmi les bactéries sensibles à *Cg*-BigDef1, on compte des bactéries qui menacent la santé humaine, notamment des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistantes aux antibiotiques isolées du milieu clinique (Loth et al., 2019). En effet, *S. aureus* est un agent pathogène opportuniste chez l'homme responsable de nombreuses infections nosocomiales et qui développe fréquemment une résistance à la méticilline (SARM) et à la vancomycine (SARV). L'étude de l'activité de *Cg*-BigDef1 sur la souche modèle *S. aureus* SG511 (Dietrich et al., 2021) et sur des souches SARM a démontré une action bactéricide.

Ces observations nous ont naturellement conduit à une investigation des mécanismes d'action de *Cg*-BigDef1. L'utilisation de la microscopie électronique a permis d'observer l'interaction du peptide avec *S. aureus* SG511, révélant la formation d'agrégats peptidiques au contact des bactéries, appelés nanonets, qui sont capables de piéger *S. aureus* SG511 sans induire de perméabilisation de la membrane (Loth et al., 2019). De manière remarquable, il a été constaté que le domaine N-terminal de *Cg*-BigDef1 était le domaine responsable de la formation de ces nanonets. Ce mécanisme a également été récemment observé chez l'unique Big défensine produite par la coquille Saint-Jacques, ce qui souligne la conservation de la formation de nanonets chez les Big défensines et renforce l'hypothèse d'un rôle clé du domaine N-terminal dans ce processus conservé chez des big défensines de deux espèces de mollusques (Stambuk et al., 2020). Cependant, jusqu'à présent, aucune autre donnée concernant le mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1 n'avait été recueillie.

Nous avons ainsi entrepris dans le cadre de ma thèse d'étudier de manière plus approfondie les mécanismes d'action du peptide Cg-BigDef1 sur *S. aureus* en utilisant notamment des approches de microscopie à fluorescence. Afin d'éviter les interférences et les biais potentiels que peuvent introduire les fluorochromes dans les propriétés biochimiques du peptide, nous avons utilisé la chimie click - un procédé qui a obtenu le prix Nobel de chimie en 2023 décerné à Karl Barry Sharpless, Morten Meldal et à Carolyn Bertozzi (Mourot, 2023) - par la cycloaddition catalysée par le cuivre (CuAAc), afin de marquer le peptide a posteriori du contact avec les bactéries par la greffe de fluorochromes. Les composants clés de réaction de chimie click sont une molécule modifiée avec un

groupement azide (ici le peptide Cg-BigDef1 ou ses domaines N et C-terminaux) et un fluorochrome porteur d'un groupement Alcyne (Figure 31). En présence de cuivre, il se forme une conjugaison stable entre les deux composants donnant naissance à un cycle triazole qui relie les deux molécules. Ceci permet donc de marquer nos peptides de manière spécifique et stable avec un fluorochrome (Figure 31). Ainsi le peptide entier et les domaines N- et C-terminaux séparés ont été synthétisés et modifiés lors de leur synthèse pour devenir « cliquables » par CuAAC.

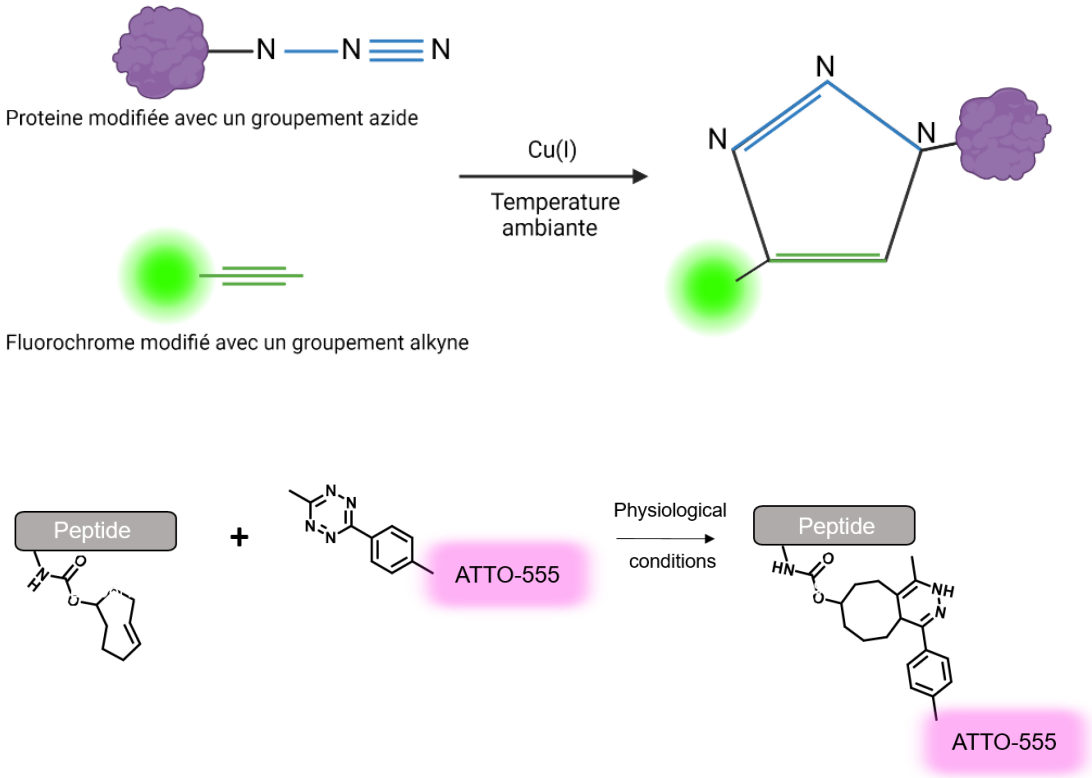


Figure 31. Réaction de chimie click par la cycloaddition catalysée par le cuivre (CuAAc) et Diels-Alder (IEDDA).

Pour suivre l'interaction concomitante des deux domaines de *Cg*-BigDef1 séparés en contact avec les bactéries. Le domaine C-terminal de la *Cg*-BigDef1 a aussi été synthétisé avec comme modification l'ajout d'un groupement trans-cyclooctène (TCO) permettant son marquage par un fluorochrome porteur d'un groupement tétrazine grace à une réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse (IEDDA). Ce processus de chimie click offre une cinétique rapide pour les réactions bioorthogonales et ne nécessite pas de catalyseur à base de Cuivre ou de températures élevées (Beliu et al., 2019). Ainsi, nous avons pour suivre l'interaction concomitante des deux domaines de *Cg*-BigDef1 séparés en contact avec les bactéries, en marquant successivement le domaine N-terminal modifié avec un groupement azide avec un le fluorochrome Alexa-488 porteur d'un groupement alcyne par CuAAC et le domaine C-terminal modifié avec un groupement TCO avec le fluorochrome ATTO-550 porteur d'un groupement tétrazine par une réaction de Diels-Alder. Les peptides ont été synthétisés par Asokan, Agnès Delmas et Vincent Aucagne au centre de Biochimie Structurale (CBM) d'Orléans en utilisant le méthode de synthèse en phase solide (SPPS), suivie d'une ligature chimique native pour assembler le peptide entier *Cg*-BigDef1, et d'un repliement oxydatif pour *Cg*-BigDef1 entier et le domaine C-terminal.

Nous avons choisi la microscopie à super résolution - prix Nobel de chimie 2014 décerné à Eric Betzig, William Moerner et Stefan Hell (M. Moreau & Cochard, 2014) - pour l'observation des interactions *S. aureus* et *Cg*-BigDef1. En effet, la résolution spatiale de la microscopie à fluorescence est limitée par la limite de diffraction de la lumière incidente à ~250 nm, ce qui rend très difficile l'étude détaillée des structures bactérienne comme le peptidoglycane (PG) ~80 nm et le comportement de protéines et peptides (Radkov et al., 2018). Pour résoudre ce problème, la microscopie à super-résolution a été développée et appliquée au domaine de la microbiologie. La technique de Microscopie super-résolution à illumination structurée (SIM, Structured Illumination Microscopy) utilisée dans cette étude permet de reconstruire une structure moléculaire avec une résolution allant jusqu'à environ 100 nm (Radkov et al., 2018). Cette technique a notamment été appliquée dans de nombreuses études sur la biosynthèse du peptidoglycane (PG) chez *S. aureus* (Monteiro et al., 2015; Wheeler et al., 2011) et la dynamique des protéines de la cytokinèse FtsZ, DivIVA et MinJ de *Bacillus subtilis* (Eswaramoorthy et al., 2011). Par l'utilisation de la microscopie à super-résolution et de la microscopie quantitative, nous avons pu montrer que *Cg*-BigDef1 interagissait avec la paroi de *S. aureus*, et que cette interaction était médiée par le domaine N-terminal de *Cg*-BigDef1 qui, par ailleurs, permet le contact entre le domaine C-terminal (de type défensine) et la paroi de *S. aureus*.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des interactions moléculaires qui se produisent à la paroi de *S. aureus,* nous avons collaboré avec Albane Jouault et Lhousseine Touqui de l'Institut Pasteur et de l'Hôpital Cochin de Paris. Nous avons d'abord confirmé que *Cg*-BigDef1 exerçait bien une action bactéricide sans nécessité de provoquer de dommages membranaires sur une autre souche de *S. aureus* nommée SA113 (choisie pour les études de cibles moléculaires car on possédait des mutants de la paroi dans ce fond génétique là). Nous avons alors étudié l'action de *Cg*-BigDef1 en utilisant des mutants de *S. aureus* SA113 possédant des délétions spécifiques de composants de la paroi cellulaire. Un mutant appelé *tagO* (Figure 32) dépourvu d'acides teichoïques de paroi (WTA) (Figure 33) a montré une interaction plus faible avec *Cg*-BigDef1 et une résistance accrue à ce peptide. Un mutant appelé *dltA* (Figure 32) incapable de transférer la D-Alanine sur l'acide lipotéichoïque (LTA) (Figure 33) qui a quant à lui montré une sensibilité accrue a *Cg*-BigDef1. Par ailleurs, nos observations en microscopie ont mis en évidence que la liaison de *Cg*-BigDef1 se produit principalement à proximité du septum bactérien, lieu de synthèse du LTA. Enfin, par ajout de LTA exogène, nous avons observé une inhibition de l'activité antimicrobienne de *Cg*-BigDef1 sur *S. aureus* SA113. Ces résultats mettent en évidence que les acides teichoïques (TAs) jouent un rôle essentiel dans l'interaction et l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1 contre *S. aureus.* Ces observations fournissent un aperçu important des premières étapes des mécanismes d'action de *Cg*-BigDef1, qui peuvent initier la formation des nanonets.

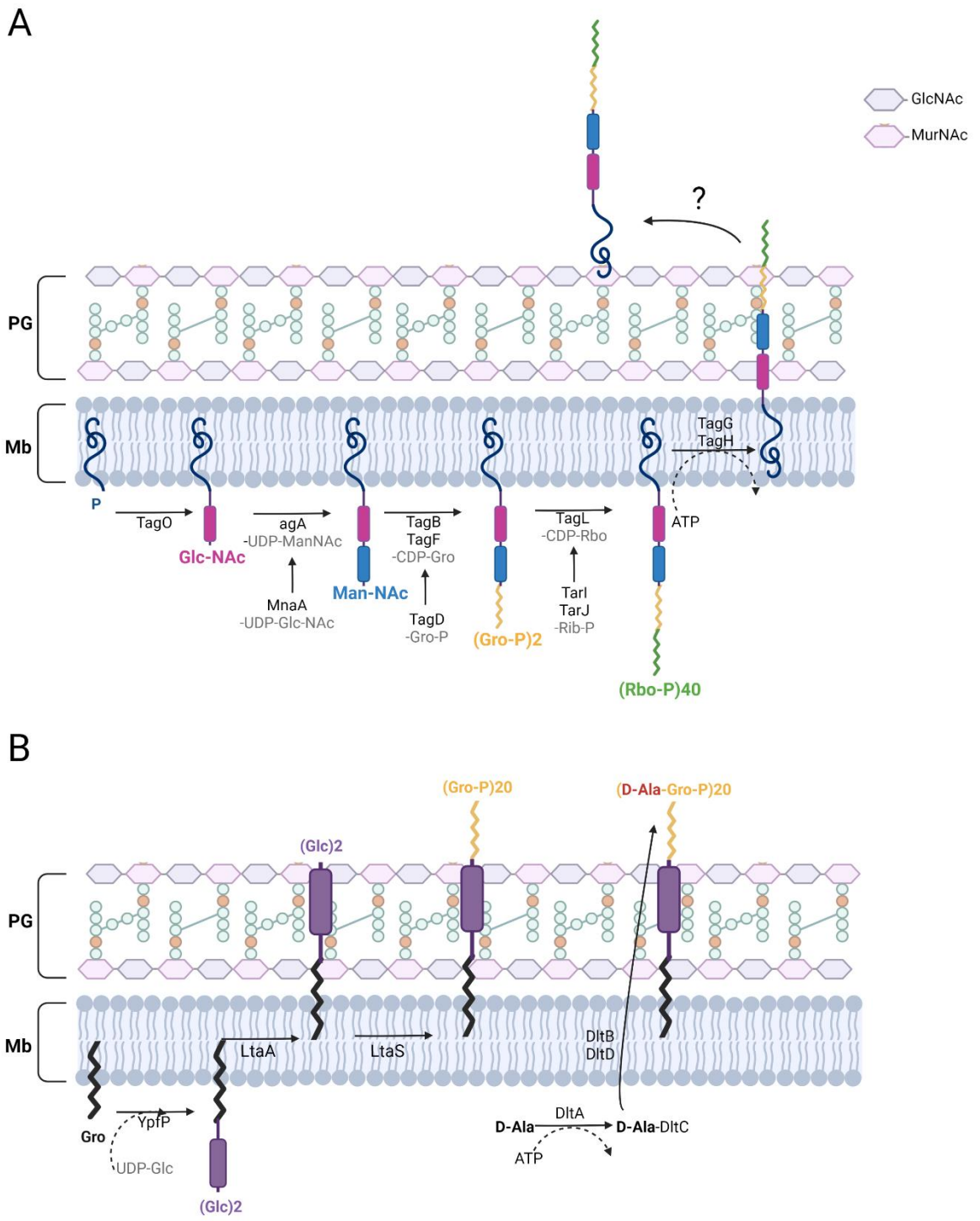


Figure 32. Voies de biosynthèse des acides teichoïques de *S. aureus* (D'après Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014; Xia et al., 2010).
(A) Acide teichoïque de paroi (WTA) de *S. aureus.* Le WTA est un polymère de ribitol-phosphate synthétisé à partir de précurseurs liés à la membrane plasmique par une ancre appelée undécaprénol-phosphate (C55-P). L'enzyme TagO catalyse l'attachement initial du précurseur WTA au C55-P en utilisant un GlcNAc. Une fois

transloqué à travers la membrane, le WTA est détaché de l'ancre C55-P et lié de manière covalente au MurNAc du peptidoglycane par un mécanisme inconnu (?).
(B) Acide lipotéichoïque (LTA) et incorporation de la D-Alanine sur le LTA.Le LTA est un polymère de glycérol phosphate synthétisé au niveau de la membrane septale qui reste ancré à la membrane grâce à une ancre de glycérol (Gro). Le transfert de D-Alanine (D-Ala) sur les composants du LTA (et du WTA) réduit la charge négative apportée par les phosphate. L'opéron dltABCD est responsable de la D-Alanylation de la LTA, mais le mécanisme exact du transfert de D-Ala du LTA vers le WTA reste à caractériser.
P, undecaprenylphosphate (C55-p) ; Glc-NAc, N-acétylglucosamine ; UDP-GlcNAc, uridine-5-diphosphate-N-acétyl-glucosamine ; UDP-ManNAc, uridine-5-diphosphate-N-acétylmannosamine ; ManNAc, N-acétylmannosamine ; Gro-P, glycérolphosphate ; CDP-Gro, cytidyldiphosphate-glycérol ; CDP-Rbo, cytidyldiphosphate-ribitol ; Rib-P, ribulose5-phosphate ; Rbo-P, phosphate de ribitol ; MurNAc, N-acétylacide muramique ; ?, mécanisme inconnu ; Gro, glycérol ; UDP-Glc, uridine-5-diphosphate-glucose ; Glc, glucose ; D-Ala, D-Alanine.

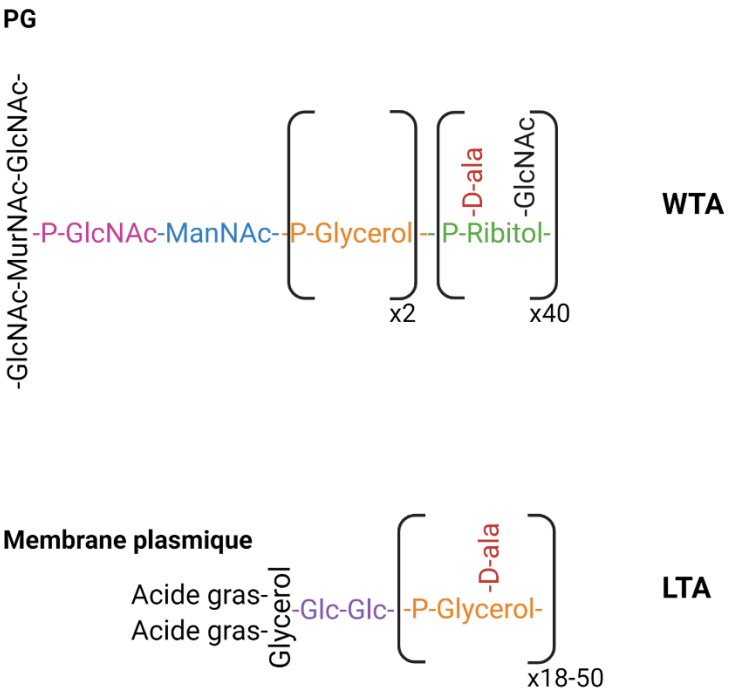


Figure 33. Acide téichoïque de paroi (WTA) et acide lipotéichoïque (LTA) de *S. aureus.* D'après (Xia et al., 2010a).
P, phosphate ; D-Ala, D-alanine ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; ManNAc, N-acétylmannosamine ; MurNAc, acide N-acétylmuramique ; Glc, Glucose.

II.2 Article N°2. Teichoic acids play a key role in the antibacterial activity of big defensins against Staphylococcus aureus.

Teichoic acids play a key role in the antibacterial activity of big defensins against *Staphylococcus aureus*

Noémie de San Nicolas[1, #], Albane Jouault[2,3 #], Aromal Asokan[4], Lhousseine Touqui[2,3], Imane El Fannassi[1], Océane Romatif[1], Karine Loth[4,5], Vincent Aucagne[4], Agnès F. Delmas[4], Philippe Bulet[6] Caroline Montagnani[1], Guillaume Charrière[1,*], Delphine Destoumieux-Garzón[1,*]

[1] IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier, France
[2] Mucoviscidose et Bronchopathies Chroniques, Institut Pasteur, Université de Paris Cité, Paris, France.
[3] Sorbonne Université, INSERM UMR S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), Paris, France
[4] Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301 CNRS, 45071 Orléans, France
[5] UFR ST, Université d'Orléans, 45067 Orléans, France 8 CR UGA, IAB, INSERM U1209, CNRS UMR5309,
[6] CR University Grenoble Alpes, Institute for Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, 38000 Grenoble, France

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

#Equal contribution

*Corresponding authors

ABSTRACT

Crassostrea gigas big defensins (*Cg*-BigDefs) are a family of two-domain antimicrobial peptides with a broad range antibacterial activity. The C-terminal domain of *Cg*-BigDefs harbors a β-defensin-like structure whereas the ancestral N-terminal domain adopts a globular structure. Here we developed molecular tools to track the fine interactions of these domains with *Staphylococcus aureus* and to gain insight into *Cg*-BigDef1 mechanisms of action. By using super resolution microscopy and *S. aureus* mutants with specific deletions of cell wall components, we found that teichoic acids (TAs) play a key role in *Cg*-BigDef1 interaction with *S. aureus*. A *Δtago S. aureus* mutant lacking cell wall teichoic acids (WTA) exhibited increased resistance to *Cg*-BigDef1. In contrast, a *ΔdltA S. aureus* mutant, unabled to transfer D-Alanine onto Lipoteichoic acid (LTA), showed increased susceptibility to *Cg*-BigDef1. *Cg*-BigDef1 bound to *S. aureus* cell wall close to the bacterial septum, where LTA is synthesized. Remarkably, binding of *Cg*-BigDef1 to *S. aureus* cell wall was reduced in both the *Δtago* and *ΔdltA* mutants. In addition, competitive binding with exogenously added LTA was sufficient to impair *Cg*-BigDef1 interaction with *S. aureus* and subsequent antimicrobial activity. These data suggest that D-Alanylated TA are conserved molecular motifs recognized by *Cg*-BigDef1. Finally, we found that *Cg*-BigDef1 interaction with *S. aureus* was mediated by its N-terminal domain, which enables the C-terminal β-defensin-like domain to come in contact with the bacterial cell wall. Altogether, our results identify teichoic acids as important targets for *Cg*-BigDef1. This interaction appears to be mediated by the N-terminal domain characteristic for this peptide family.

INTRODUCTION

Big defensins are a family of antimicrobial peptides (AMPs), which have expanded in mollusks and other lophotrochozoans; they are otherwise encountered in a limited number of phyla across the animal kingdom, mainly merostomes (where they were originally discovered) and cephalochordates (Gerdol et al., 2020b). Big defensins are composed of a C-terminal β-defensin-like domain preceded by an ancestral N-terminal domain (De San Nicolas et al., 2022b; Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). Until now, only two oyster big-defensins from *Crassostrea gigas* (*Cg*-BigDef1 and 5) have been explored for their antimicrobial properties. These two peptides showed broad spectrum and complementary antibacterial activities against members of the oyster microbiota (De San Nicolas et al., 2022b). *Cg*-BigDef1 also exhibited antimicrobial activities against multidrug resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). The mechanism of action of *Cg*-BigDef1 against *S. aureus* involves the trapping and killing of the bacteria into antimicrobial peptide nanonets that assemble spontaneously in with the presence of the bacteria. *Cg*-BigDef1 nanonets formation is driven by its N-terminal domain (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019).

The cell wall of *S. aureus* is composed of several polymers (reviewed in (Schneewind & Missiakas, 2014, 2019; Xia et al., 2010b), which include the peptidoglycan (a polymer of *N*-acetyl glucosamine, GlcNAc, and *N*-acetyl muramic acid, MurNAc, derivatized with peptide chains which can be cross-linked as well as teichoic acids, a term that encompasses a diverse family of cell surface biopolymers containing phosphodiester-linked polyol repeat units. Similar to peptidoglycan, the wall teichoic acid (WTA, a polymer composed mainly of ribitol-phosphate) is synthesized as precursors attached to the plasma membrane through an undecaprenol-phosphate anchor (C55-P). The TagO enzyme catalyzes the initial attachment of the GlcNAc-P to C55-P . This precursor is then elongated through an enzymatic cascade yielding C55-P-WTA. Once translocated across the membrane, WTA is transferred from the C55-P anchor onto a MurNAc of the peptidoglycan, through a mechanism that remains unclear. Another key polymer composing *S. aureus* cell wall is the lipoteichoic acid (LTA, a polymer of glycerol phosphate), which is synthesized at the septal membrane and remains anchored to the membrane through a diglucosyl-diacylglycerol (Glc_2DAG) glycolipid anchor. Thus, WTA and LTA are unevenly distributed at the cell wall surface. The highly negative net charge of the cell envelope is decreased by the esterification of hydroxyl groups of ribitol-phosphate and glycerol phosphate, by a D-alanine (D-Ala). The operon *dltXABCD* is responsible for the D-alanylation of LTA in *S. aureus* (Peschel et al., 1999).

The mechanism of WTA alanylation is still unclear but it has been proposed that the DltABCD system is also involved and that D-alanine may be transferred from LTA to WTA (Schneewind and D. Missiakas 2014).

The cell wall of Gram-positive bacteria is a well-known target for AMPs and antibiotics, which interact with essential cell wall components, thereby blocking cell wall synthesis and/or triggering autolytic processes. A number of AMPs interact with the membrane-anchored precursor of peptidoglycan called lipid II. Thus, lipid II is a target for AMP defensins harboring the cysteine-stabilized αβ motif , such as the mantle and hemocyte defensins from *Crassostrea gigas* (Schmitt et al., 2010) or plectasin from the fungus *Pseudoplectania nigrella* (T. Schneider et al., 2010). Lipid II is also a molecular target of human β-defensin 3 (Sass et al., 2010) and vancomycin (Breukink and de Kruijff, 2006). Moreover, WTA or its precursors has been proposed as a target for human β-defensin 3 and the type-IIA secreted phospholipase A2. In such examples a direct interaction between AMPs and cell wall components or their precursor are responsible for AMP activity. In addition, a large number of studies have shown that the negative charges carried by LTA and WTA are critical for cationic AMPs activity, which interact with Gram-positive bacteria through electrostatic interactions. A mechanism by which bacteria resist to cationic AMPs occurs through the *dltXABCD*-mediated D-alanylation of their teichoic acids (Peschel et al., 1999).

While it is established that the incubation with *S. aureus* drives the formation of *Cg*-BigDef1 nanonets, the exact mechanisms by which *Cg*-BigDef1 interacts with *S. aureus* has remained unclear. The aim of the present study was to identify the *Cg*-BigDef1 and *S. aureus* molecular determinants involved in the antimicrobial activity.

to track the fine interactions of *Cg*-BigDef1 and its separate N-terminal and C-terminal domains with *S. aureus* cell wall, we synthesized chemical tools and we used super resolution microscopy observations. Mutants of *S. aureus* lacking teichoic acids or harboring teichoic acids with a modified net charge were used to identify the molecular determinants of the interaction. Quantitative microscopy was used to measure the effect of the mutation on the interaction. Finally, competition assays using exogenous D-Alanylated LTA were were a further evidence to support this interaction. Overall, our data indicate that *Cg*-BigDef1 binds to teichoic acids from *S. aureus* cell wall, which is required for antimicrobial activity. This interaction is mediated by the N-terminal domain of *Cg*-BigDef1 which brings the C-terminal β-defensin-like domain in contact with *S. aureus.*

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media

The *Staphylococcus aureus* strains are listed in Table 1. For antimicrobial assays, strains were grown at 37 °C in liquid Poor broth (PB: 1% bactotryptone, 0.5% NaCl w/v, pH 7.5) medium. Luria-Bertani (LB) agar plates were used as solid media.

Table 1: Bacterial strains

Strain	Phenotype	Reference
S. aureus SA113	Wild type (WT)	ATCC 355556
S. aureus SA113 *ΔtagO*	WTA-deficient	(Weidenmaier et al., 2005)
S. aureus SA113 *ΔdltA* (AG1)	D-alanylation pathway desactivated	(Peschel et al., 1999)

Synthetic Peptides

Full-length Cg-BigDef1 [1-93] and its two separate domains, N-terminal [1-42] and C-terminal [44-93] were synthetized as already reported (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019; Terrier et al., 2015). Briefly, peptides were produced by solid-phase synthesis on a Prelude peptide synthesizer (Gyros-Protein Technologies) using standard Fmoc/*t*Bu chemistry, followed by native chemical ligation to assemble the full-length peptide, and oxidative folding for both full-length and C-terminal domain. We also synthesized azide- and *trans*-cyclooctene (TCO)-containing derivatives to enable their labelling with fluorophores post-incubation with the bacteria. See supporting information file for detailed synthesis and physicochemical characterization.

Antimicrobial assays

Peptides were serially diluted in sterile water (or 10% DMSO for the hydrophobic N-terminal domain) and placed in contact with the strains of *S. aureus* (wildtype SA113 and its *ΔtagO* and *ΔdltA* isogenic mutants) grown to exponential phase and diluted in PB medium at a theoretical OD_{600} = 0.001. After 18 h of incubation at 37 °C, the OD_{600} was measured to determine bacterial growth. Determination of minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) against wild type *S. aureus* SA113 and its isogenic mutants were determined as previously (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). MIC and MBC values were determined in duplicates.

Bactericidal assays and kinetics of killing

An overnight culture of *S. aureus* SA113 was washed and resuspended at 10^7 CFU/ml in killing buffer (KB; 0.1 M Tris at pH 8.1 mM $CaCl_2$) supplemented with 150 mM NaCl. It was incubated at 37 °C in the presence of *Cg*-BigDef1 or an equivalent volume of sterile water (negative control). CFU counts were performed by plating on LB agar at 0, 0.5, 2 and 6h. Data were compared to untreated samples and expressed either as CFU/mL for kinetics of killing and as a percentage for membrane permeabilization. Tests were performed in triplicates, and mean values were calculated. Statistically significant differences were calculated by T-test.

$DiSC_3(5)$ assay

Membrane potential was measured using the voltage-sensitive dye $DiSC_3(5)$ (Invitrogen) according to the method of te Winkel (te Winkel et al., 2016). Midlogarithmic phase bacteria cultured in fresh LB were washed with KB and suspended in KB supplemented with 0.5 mg/mL BSA to a final OD_{600} of 0.3. It was incubated at 37 °C during 2 h in the presence of *Cg*-BigDef1 or an equivalent volume of sterile water (control). After addition of $DiSC_3(5)$ at final concentration of 1 μM, the measurement was performed on Tecan fluorometer with 610 nm excitation and 660 nm emission filters.

Cytochrome C binding assay

The cytochrome C binding assay was performed according to a previously described method (Peschel et al., 1999). Bacteria were grown overnight, washed twice with 20 mM MOPS buffer (morpholinepropanesulfonic acid, pH 7) (Sigma) and concentrated in MOPS buffer to a final OD_{600} of 7. The bacterial suspension was incubated with 0.5 mg/ml cytochrome *c* (Sigma) during 10 min and then centrifuged. The percentage of cytochrome C bound to the bacterial cell pellet was determined by subtracting the OD_{405} of supernatant from the OD_{405} of cytochrome C content in solution before bacterial exposure. Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Statistically significant differences were calculated by one-way ANOVA and Tukey HSD test.

Fluorescent labeling of peptide-bacteria interactions

S. aureus (10^7 CFU/mL) were incubated in KB with 1.25 μM peptide at 37°C. After a 2 h-contact, cells were washed with 1 mL of PBS. A volume of 100 μL of the mixture were deposited on a

Zeiss type 1.5 high performance glass coverslip using a Cytospin centrifuge. The permeabilization of cells was performed with 0.01% Triton X-100 in PBS. Peptides were labeled by Click Chemistry using the Click-it cell reaction buffer Kit (Invitrogen) with 1 µM Alexa FLUOR 488 Alkyne (green). The bacterial cell wall was stained in red with WGA-Alexa555 (2 µg/mL) or far-red with WGA-Alexa647 (2 µg/mL) diluted at 1:500 in PBS 1X. After the labeling step of peptide, the cells were washed overnight with PBS. The coverslips were then mounted on a glass slide in fluorescence mounting liquid (DAKO, REF S3023).

Super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM)

3D-SIM super-resolution imaging was performed with a DeltaVision V4 OMX microscope (Leica Microssystems) equipped with a ×100/1.4 NA Plan Super Apochromat oil immersion objective (Olympus) and electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD; Evolve 512B, Photometrics) cameras. LASERs at 488, 561 and 642 nm were used with the standard corresponding emission filters at 528, 608, 683 nm respectively. Imaging was performed according to manufacturer's instructions using five phases and three angles per image plane. Raw images were reconstructed using SoftWorx (version 6.5, GE Healthcare) using channel-specific optical transfer functions (pixel size of reconstructed images = 40 nm). Quality of reconstructed images was assessed using the SIMcheck plugin for ImageJ (https://github.com/MicronOxford/SIMcheck).

Quantitative microscopy

Imaging was performed using a Zeiss Z2 microscope equipped with a 100X/1.46 PLAN-APO Oil objective, an Apotome device, and a CMOS Orca Flash 4.0 camera (Hammamatsu). For each picture, five raw images were acquired and deconvoluted using the Apotome device in each channel (DAPI λex G365, FT395, λem BP445/50 ; Alexa 488 λex BP475/40, FT500, λem BP530/50; WGA-Alexa 555 λex BP560/40, FT585, λem BP630/75). Deconvoluted images were used to quantify the fraction of peptides physically associated to bacteria by coding a macro in ImageJ. Briefly, the WGA-Alexa 555 positive pixels were used to define the region of interest (ROI) corresponding to the area occupied by bacteria using an automatic Yen threshold to binarize images. The Alexa 488 positive pixels were used to define the ROI corresponding to the topographical distribution of the peptides over the entire field using an automatic Yen threshold to binarize the images. Then intersection of the Alexa 555 ROI and Alexa 488 ROI was measured and divided by the total area of Alexa555 ROI to calculate the peptide binding score

corresponding to the fraction of peptide associated to bacteria. Statistically significant differences were calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiples comparisons test.

RESULTS

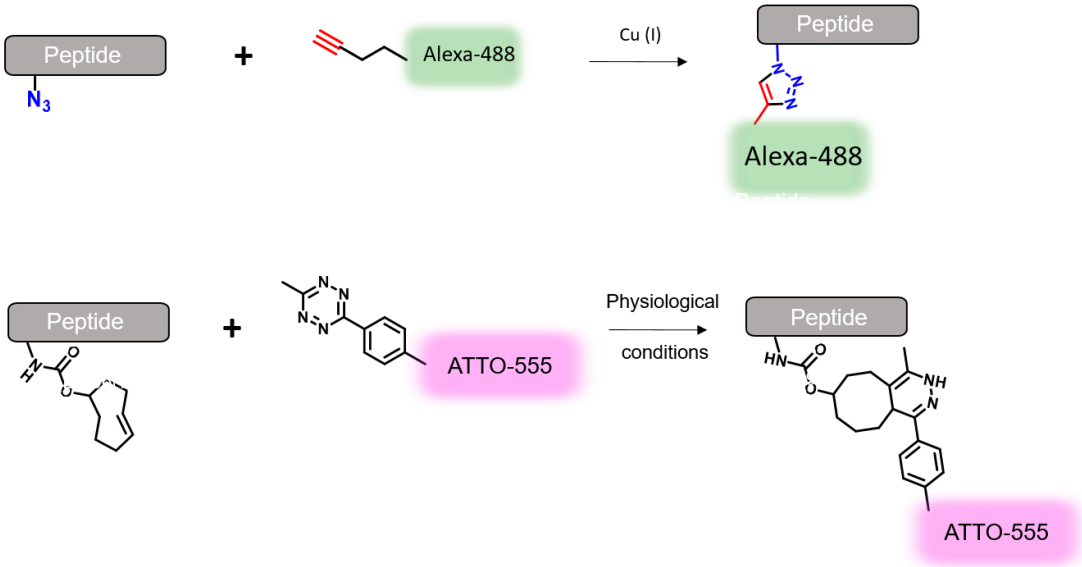
Because peptide/bacteria interaction can be altered by labelling moieties, which typically modify peptide size, net charge and hydrophobicity and may interfere with the natural interaction process, we synthesized here clickable peptides that can be labelled after interaction with bacteria and further permeabilization.

The set of peptides synthesized for the present study is presented in Fig. 1C. Peptides were synthezised by solid-phase synthesis (SPPS) followed by native chemical ligation to assemble the full-length peptide, and oxidative folding for both full-length and C-terminal domain (Cter).. When a single clickable peptide was incubated with bacteria, peptides harbored an azide moiety; it was next labelled with Alexa-488 alkyne through copper-catalyzed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) (Fig. 1A). When two clickable peptides were co-incubated with bacteria, one peptide harbored an azide moiety and another peptide harbored a trans-cyclooctene (TCO), allowing two orthogonal selective reactions (Fig. 1A & 1B). Peptides were successively labelled with a Alexa-488 alkyne through CuAAC, and a tetrazine-modified ATTO-550 dye through an inverse electronic demand Diels-Alder reaction (IEDDA), respectively (Fig. 1B).

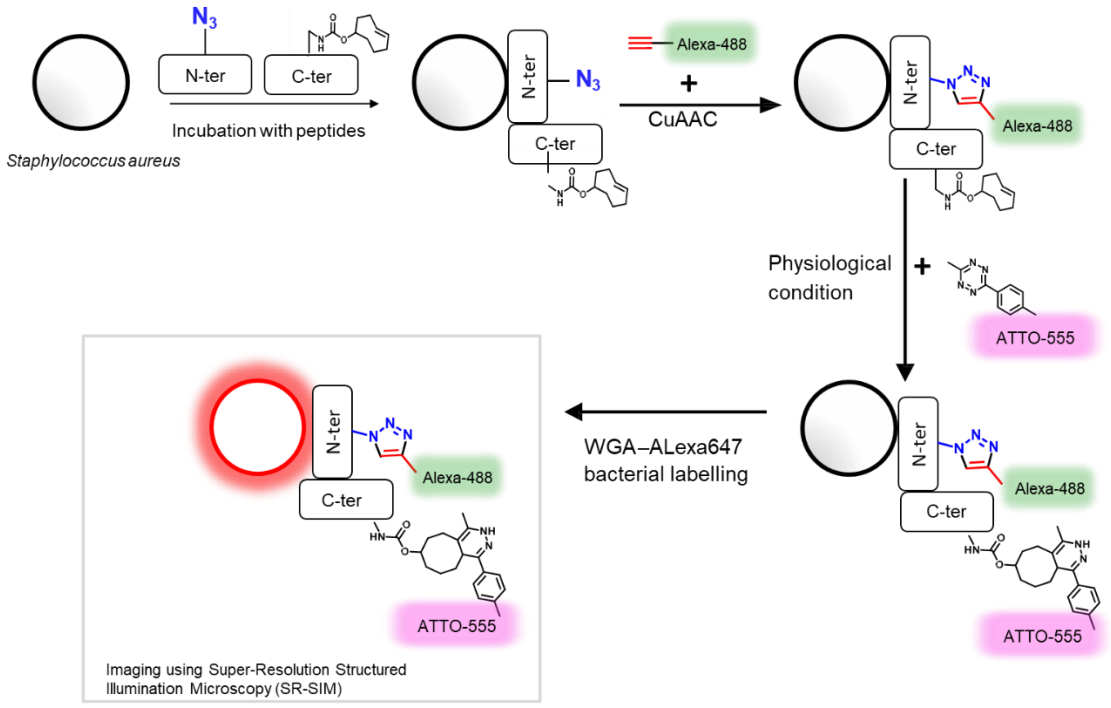
The azido moiety is not compatible under the reducing condition of the oxidative folding required for the formation of the disulfide bonds. The azido moiety was thus introduced after oxidative folding on the N terminal amine for Cter-azide. As *Cg*-BigDef1 does not contained any amine (Lys or N terminal amine), we decided to substituted an exposed residue (Loth 2019, Fig S1A) with Lys for subsequent functionalization via an amide bond. To obtain Nter-azide, the azido group was introduced at the C terminus of the *Cg*-BigDef1[1-42] as an azido norleucine residue (Anl) during SPPS.

A

Post-incubation labelling reactions: orthogonal chemical ligations to selectively introduce a given fluorochrome.



B



C

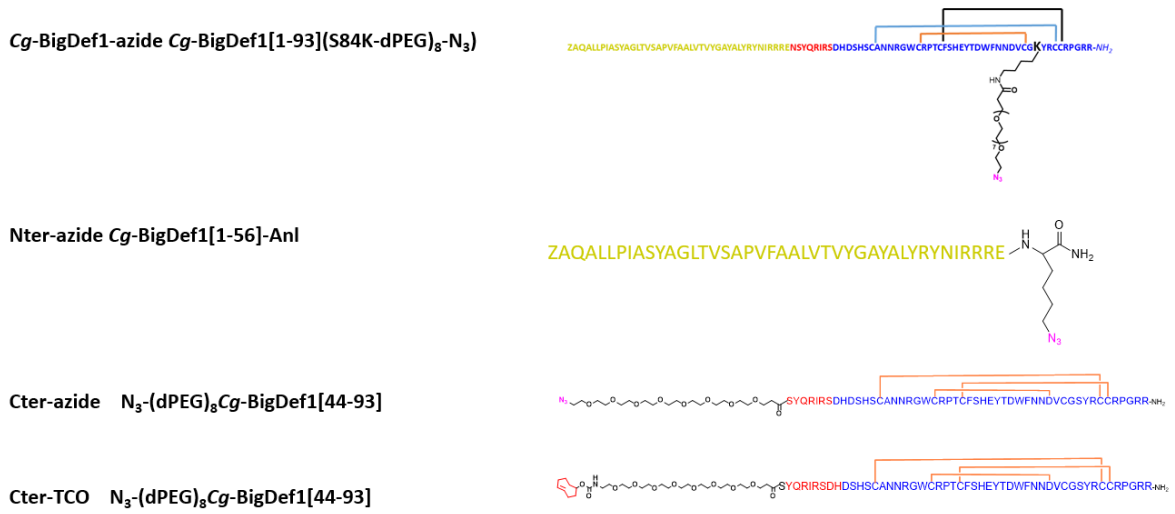


Figure 1. Clickclick chemistry labelling. (A) CuAAC and IEDDA reactions (C) Clickable peptides used in this study. Z = pyroglutamate. Anl = ω-azido-norleucine. Disulfide bonds are symbolized by orange lines.

Cg-BigDef1 mechanism of killing

In order to investigate the cellular and molecular interactions underpinning *Cg*-BigDef1 activity, we first analyzed its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The strain SA113 was chosen in this study given that isogenic derivatives are available to test the effects of *S. aureus* cell components on the peptide-bacteria interaction. We first determined *Cg*-BigDef1 MIC/MBC values in Poor Broth (PB) culture medium. The results showed that *Cg*-BigDef1 [1-93] inhibited the growth of *S. aureus* SA113 at MIC = 2.5 µM, with a MBC above 10 µM (table 2). In a non-nutritive medium (killing buffer), a significant bactericidal effect was observed with *Cg*-BigDef1 [1-93] at 1.25 µM with a 2 log-reduction in CFU/mL after a 2h-contact (Fig. 2A). In the same conditions, *Cg*-BigDef1 [1-93] exhibited no significant effect on *S. aureus* SA113 membrane permeability (Fig. 2B). Thus, the bactericidal effect observed a 2 h2h-contact with 1.25 µM *Cg*-BigDef1 seems not to result from the peptide membrane activity. Lack of membrane damages in these conditions was confirmed by the $DiSC_3(5)$ assay, which showed no significant membrane depolarization of *S. aureus* SA113 (Fig 2C). DiSC3(5) is a cationic membrane-permeable fluorescent dye that accumulates in polarized cells, leading to a quenching of the overall fluorescence of the cell suspension. Upon depolarization, the dye is rapidly released into the medium resulting in an increase in fluorescence. After the 2 h2h-contact with *Cg*-BigDef1, the

fluorescence quenching of $DiSC_3(5)$ was similar to control indicating that the dye integrates into the membrane and there is no depolarization.

Table 2. MIC and MBC values of *Cg*-BigDef1 *against S. aureus* SA113.

	MIC (μM)	MBC (μM)
Cg-BigDef1 [1-93]	2.5	>10
Cg-BigDef1 [1-42]	10	>10
Cg-BigDef1 [44-93]	>10	>10

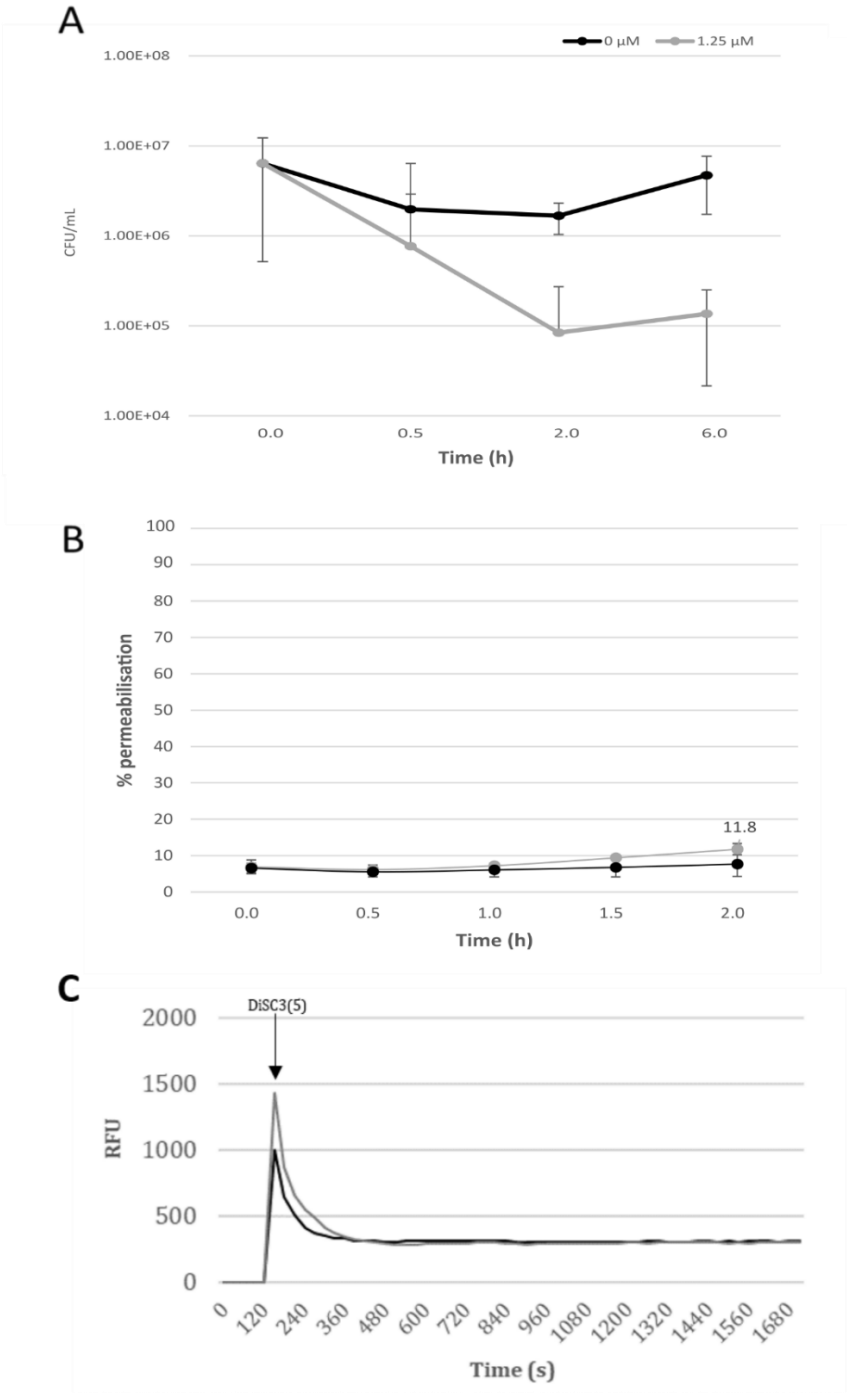


Figure 2. *Cg*-BigDef1 kills *S. aureus* SA113 without inducing membrane damages.
(A) The time course of *Cg*-BigDef1 killing of *S. aureus* SA113 was measured over 2 hours in the presence of 1.25 µM Cg-BigDef1 [gray symbols]. In a control experiment, *Cg*-BigDef1 was replaced by an equal volume of sterile water [black symbols]. At time zero, cultures were adjusted to 10^7 CFU/mL. CFU were then counted by plating at 0, 30 min, and 2 h. *** $p<0.001$, T-test. **(B)** Membrane permeabilization of *S. aureus* SA113 was measured by the Sytox green assay. Bacteria were exposed to 1.25 µM *Cg*-BigDef1 [gray symbols] or an equal volume of strerile water (control) [black symbols]. Data are represented as percentages of permeabilized bacterial cells relative to complete cell lysis with Triton X-100 as a positive control. In killing and membrane permeabilization assays, standard deviations were calculated using results from three and five independent experiments, respectively. **(C)** Membrane potential was measured using the voltage-sensitive dye $DiSC_3(5)$ after 30 min of incubation in the presence of *Cg*-BigDef1

[gray symbols] or sterile water (control) [black symbols]. Data are representative of three independent experiments, each of which showed reproducible trends. The time point of $DiSC_3(5)$ addition is highlighted with an arrow. Fluorescence is measured in relative fluorescence units (RFU).

Cg-BigDef1 interacts with *S. aureus* cell wall

In order to gain insight into *Cg*-BigDef1 mechanisms of action and identify its potential bacterial targets, we used super resolution microscopy and design specific probes derived from *Cg*-BigDef1 to minimize the interference of fluorophore with the peptide/bacteria interaction.

We first designed *Cg*-BigDef1 derivatives as precursors for fluorophore labelling. The full-length *Cg*-BigDef1 and its N-terminal and domains contained an Azide moiety that can react with Alkyne for CuAAC. The C-terminal domain was synthesized either with a Alkyne moiety for CuAAC, or with a trans-cyclooctene (TCO) for tetrazine ligation. This last process provides fast kinetics for bioorthogonal reactions and does not require Cu catalyst or elevated temperatures (Beliu et al., 2019). Next, we verified that the MIC and MBC of the clickable peptide were not altered by its chemical modification (supplementary table 1). As previously observed against other strains of *S. aureus*, the separate domains showed almost no antibacterial activity in the 0-10 µM range (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). Only the N-terminal domain showed a MIC at 10 µM, as opposed to 2.5 µM for the full-length *Cg*-BigDef1 (supplementary table 1).

We incubated *S. aureus* SA113 with clickable *Cg*-BigDef1-azide (1.25 µM) in the killing buffer. After a 2 h-contact, the bacteria were engaged in the CuAAC with the alkyne-labelled fluorophore Alexa 488, (green) to reveal the peptide and Alexa 555-conjugated wheat germ agglutinin that recignized GlcNAc of the *S. aureus* SA113 cell wall (red). *Cg*-BigDef1 localized within *S. aureus* SA113 cell wall. *Cg*-BigDef1 green labelling was focal and scattered around the cell, suggesting the existence of anchoring points within the cell wall. *Cg*-BigDef1 was often observed close to the septum, the new cell wall that forms between two daughter *S. aureus* cells as a result of cell division. Sometimes, the green labelling extended outside the cell wall, suggesting nascent nanonet formation (Fig 3).

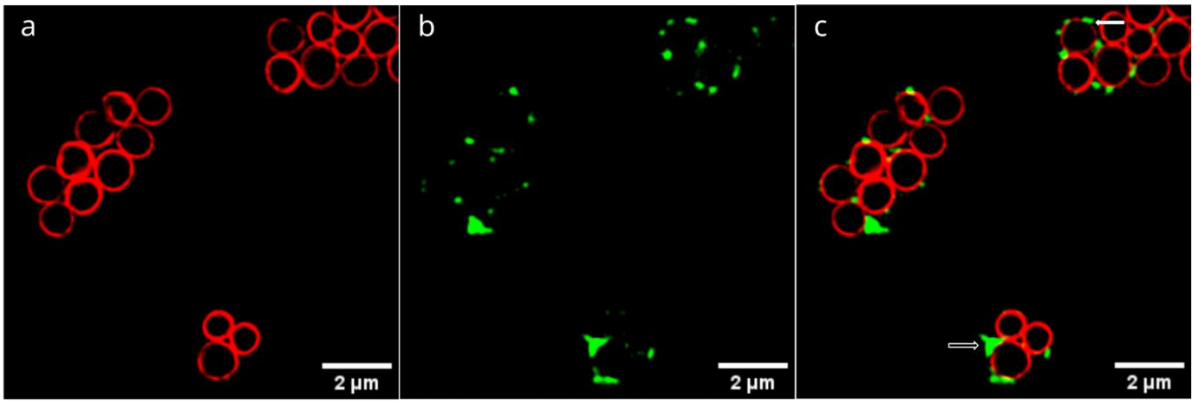


Figure 3. *Cg*-BigDef1 inserts into *S. aureus* SA113 cell wall and extends extracellularly. SIM super-resolution microscopy photographs, objective x100. Photographs are shown from the middle image of a z-stack from *S. aureus* SA113 wild-type cells incubated with *Cg*-BigDef1-azide at a concentration of 1.25 µM for 2 h. (a) Red channel showing the cell wall labelled with Alexa555-coupled wheat germ agglutinin. (b) Green channel showing *Cg*-BigDef1 labelled by click chemistry CuAAC with Alexa FLUOR 488. (c) Merged red and green channels: *Cg*-BigDef1 is observed outside the cell in close contact with the cell wall, sometimes in aggregates (white outline arrow, black fill); it is also observed side inside the cell wall (white arrow). Scale bar is 2 µm.

Cg-BigDef1 N-terminal domain drives the peptide interaction with *S. aureus* cell wall

Using the clickable Nter-azide and Cter-azide peptides (see fig. 1), we asked what molecular determinants of *Cg*-BigDef1 may be responsible for the peptide interaction with *S. aureus* SA113 cell wall. As above, *S. aureus* SA113 was placed in contact for 2 h with 1.25 µM clickable Nter-azide or Cter-azide. Contacts were observed by SR-SIM (Fig 4A). To quantify the association of each domain with *S. aureus* SA113 cells, we defined a region of interest (ROI) as the surface area delimited by the Alexa 555 labelling of the cell wall with WGA. Pixels corresponding to Alexa 488 labelling found inside the *S. aureus* ROI were considered indicative of peptide physical interaction with bacteria. Pixel counts were normalized by referring to the number of green pixels counted in the *S. aureus* interaction with full-length *Cg*-BigDef1.

We found that the N-terminal domain associates with *S. aureus* SA113 cells about two times less efficiently than the full-length *Cg*-BigDef1 (Fig 4A-B). The association of the C-terminal domain was 4-5 times lower than that of the full-length *Cg*-BigDef1 (Fig 4A-B). *Cg*-BigDef1 and its N-terminal domain showed similar localization: both peptides were either inserted into the cell wall (pixels counted in the ROI) or attached to the cell wall (pixels not counted in the ROI). In contrast, the C-terminal domain was never observed in the cell wall, but rather inside the area delimited by the cell wall in dead cells identified by the lack of intracellular DAPI staining (supplemental figure S1C). Remarkably, when the unlabeled N-domain was co-incubated with the clickable Cter-azide after 1h pre-incubation and *S. aureus,* the C-terminal was observed in

contact with bacterial cells (supplemental figure S1B). That was confirmed when we co-incubated *S; aureus* with Nter-azide and Cter-TCO to further labelelled each domain with two different fluorochrome. The N- and C-terminal domains were actually found to colocalize at the cell wall when different fluorochromes were used to label each domain (Fig. 4C). The colocalisation as judged by the yellow color indicates the presence of both domains on the cell wall. The presence of labelling outside of cell was reminiscent of earlier microscopic evidence of *Cg*-BigDef1 nanonets (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). These data indicate (i) that *Cg*-BigDef1 binds to the cell wall of *S. aureus* through its N-terminal domain, and (ii) that the N-terminal domain brings the C-terminal defensin-like domain in contact with the cell wall of *S. aureus,* even in the absence of covalent link between the two domains.

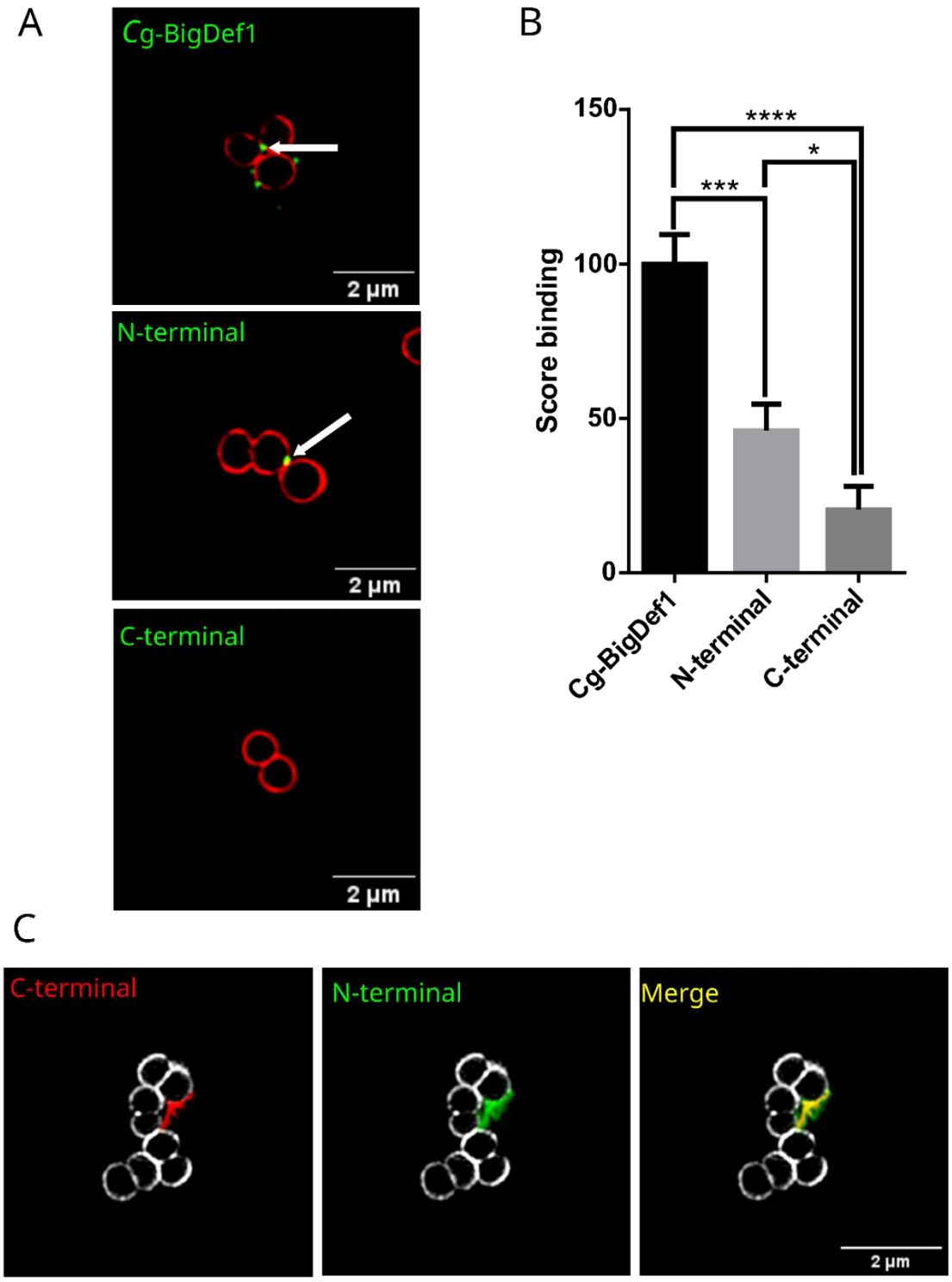


Figure 4. *Cg*-BigDef1 N-terminal domains drives the binding to *S. aureus* SA113 cell wall. **(A)** SIM super-resolution microscopy photographs, objective x100 of wild-type *S. aureus* SA113 treated with *Cg*-BigDef1 or Nter-azide or Cter-azide at a concentration of 1,25 µM for 2 h. The bacterial cell wall is labelled with Alexa555-WGA (red), *Cg*-BigDef1, and Nter-azide and Cter-azideareabelled with Alexa488 (green). Images are shown from the middle image of a z-stack. Scale bar is 2 µm. *Cg*-BigDef1 and its N-terminal domain are localized on the cell wall near the septum (white arrow). **(B)** Binding score of the N- and C-terminal domains of *Cg*-Bigdef1 compared to full-length *Cg*-BigDef1. Standard deviations were calculated on three independent experiments. Tukey's multiple comparisons test, ns: no significant, * Pvalue < 0.05, **Pvalue <

0.005. **(C)** SIM super-resolution microscopy images, objective x100 of *S. aureus* SA113 treated with the N-ter-azide and C-ter-TCO of *Cg*-BigDef1 pre-incubated for 1 h before contact with bacteria at a concentration of 1.25 µM. The cell wall is labelled with Alexa647-WGA (grey). The Cter-TCO is labelled with ATTO FLUOR 550 tetrazine (red). The Nter-azidel domain is labelled with Alexa FLUOR 488 Alkyne (green). Merged channels show that both domains co-localize (yellow);. Scale bar is 2 µm.

Teichoic acids play a key role in *Cg*-BigDef1 antibacterial activity

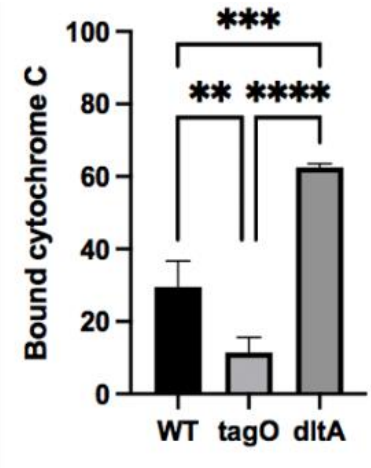
The TA glycopolymers are major components of the Gram-positive bacterial cell wall, representing up to 60% of the total cell wall mass. Therefore, we next tested the role of teichoic acids (TA) in *Cg*-BigDef1 interaction with *S. aureus* cell wall. To this aim, we used a *Δtago* mutant of *S. aureus* SA113, which is devoid of wall teichoic acid (WTA), as well as a *ΔdltA* mutant, in which WTA and lipoteichoic acid (LTA) are not decorated with D-Ala residues. Because teichoic acids are key polymers conferring a negative charge to the cell wall of Gram-positive bacteria, we measured the effects of each mutation on the charge of *S. aureus* SA113. To this aim, we used the binding extent of the cationic cytochrome C as a proxy of the negative charge of the bacterial cell wall. As expected, we observed a decrease in the percentage of cytochrome C binding to the *S. aureus Δtago* mutant, indicating a decrease of negative charges at the bacterial surface in this mutant devoid of the anionic polymer WTA (Fig 5B). In contrast, cytochrome C binding was increased in the *ΔdltA S. aureus* mutant indicating an increase of the negative charge of the bacterial cell wall. This is likely due to the absence of cationic charges through D-alanylation that partially neutralisethe negative charge of WTA. We then tested the antimicrobial activity of *Cg*-BigDef1 against *S. aureus* SA113 and the two isogenic mutants. We found that D-alanylation deficiency makes *S. aureus* 4-fold more sensitive to *Cg*-BigDef1 with a MIC at 0.625 µM and a MBC at 10µM for the *ΔdltA* mutant as opposed to 2.5 µM and >10µM respectively for wild-type SA113 (Fig 5A). Interestingly, *S. aureus* was 4-fold more resistant to *Cg*-BigDef1 upon WTA deletion, as indicated by a MIC=10 µM for the *S. aureus Δtago* mutant (Fig 5A). These results may indicate a key role of electrostatic interactions in the binding of *Cg*-BigDef1 to *S. aureus* SA113 cell wall, or alternatively, that *Cg*-BigDef-1 binds directly to teichoic acids, which are conserved molecular patterns recognized by some AMPs (Koprivnjak et al., 2008). The first hypothesis seems unlikely because the antimicrobial activity of *Cg*-BigDef1 was retained at high salt concentrations, as demonstrated by our previous studies (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). To test the second hypothesis, we examined the growth curves of *S. aureus* SA113 in the presence of 2.5 µM *Cg*-BigDef1 preincubated or not with exogeneous *S. aureus* LTA. No growth was observed in the absence of LTA, as expected from the MIC of *Cg*-BigDef1. Remarkably, preincubation with LTA was sufficient to restore the growth of *S. aureus*

SA113 in the presence of *Cg*-BigDef1 (Fig 5C). This indicates that exogeneous LTA prevents interaction of *Cg*-BigDef1 with the cell wall suggesting a role of endogenous LTA in this process.

A

Strain	MIC (µM)	MBC (µM)
S. aureus SA113 (wild-type)	2.5	>10
S. aureus SA113 *Δtago*	10	>10
S. aureus SA113 *ΔdltA*	0.62	10

B



C

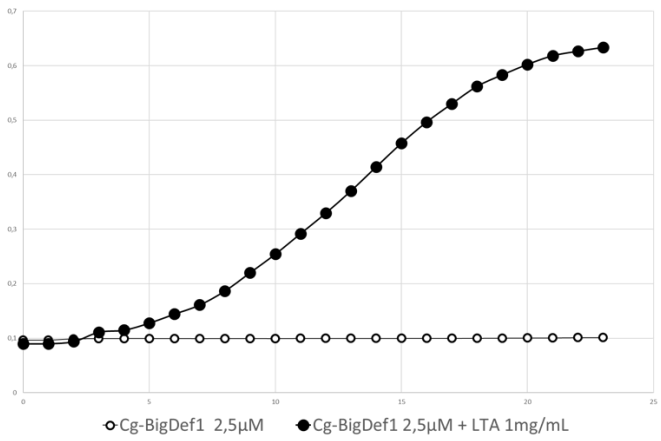


Figure 5. Effect of teichoic acids on *Cg*-BigDef1 antimicrobial activity

(A) MIC values of *Cg*-BigDef1 against *S. aureus* SA113 mutants. **(B)** *S. aureus* SA113 surface charge varies in TA mutants. The figure shows the bound concentrations of cytochrome C after 10 min of incubation with *S. aureus* SA113 or teichoic acid mutants. Data shown are the data from a representative experiment of 3 independent experiments. Statistically significant differences were calculated by one-way ANOVA. ** p <0.01 *** p<0.001 **** p <0.0001. **(C)** Growth of *S. aureus* SA113 treated with *Cg*-BigDef1 at a concentration of 2.5µM pre-incubated with the presence of exogeneous LTA at 1 mg/mL for 1 hour (black symbols) and without exogeneous LTA as control (white symbols). Results are representative of three independent experiments.

Teichoic acids play a key role in *Cg*-BigDef1 interaction with *S. aureus*

Super-resolution microscopy was used to explore the effects of teichoic acid mutations on interactions between *Cg*-BigDef1 and the *S. aureus* SA113 cell wall. Loss of WTA did not affect the localization of *Cg*-BigDef1 in our experimental conditions (2 h contact with 1.25 µM *Cg*-BigDef1). Indeed, as with the wild-type strain, *Cg*-BigDef1 only interacted with the cell wall of the SA113 *Δtago* mutant. In contrast, loss of D-alanylation tended to affect *Cg*-BigDef1 localization. *Cg*-BigDef1 was observed in the cell wall of the *S. aureus* SA113 *ΔdltA* mutant, but it was also visible inside the bacterial cells in dead cells (Fig. 6A). This phenomenon of peptide

internalization in dead cells is observed more frequently in the *S. aureus ΔdltA* mutant which is more sensitive to *Cg*-BigDef1 and the bacteria therefore die more quickly. Remarkably, *Cg*-BigDef1 bound less efficiently to both mutants, with no significant difference between them. The binding was reduced to 30% in with the *S. aureus Δtago* mutant and 28% in the *S. aureus ΔdltA* mutant (Fig. 6B).

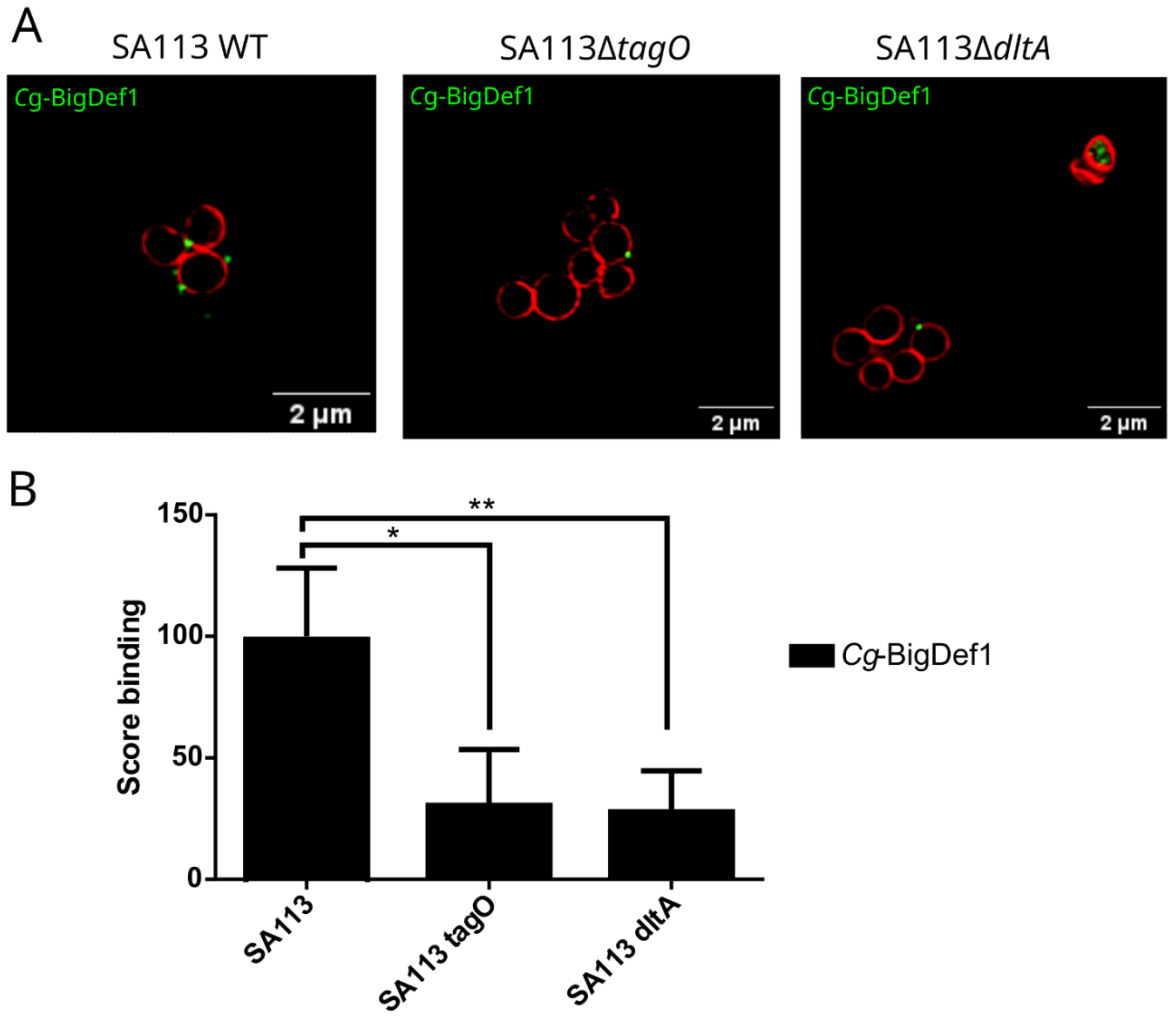


Figure 6. *Cg*-BigDef1 / *S. aureus* interactions in strains harboring different TA background. (A) SIM super-resolution microscopy pictures, objective x100 of *S. aureus* SA113 Wild-type (WT), SA113*Δtago* and SA113*ΔdltA* treated with *Cg*-BigDef1 at a concentration of 1.25 µM during 2 hours. The bacterial cell wall is labelled by WGA-Alexa555 (red) and *Cg*-BigDef1-azide by Alexa FLUOR 488 Alkyne (green). Images are shown from the middle image of a z-stack. Scale bar is 2µm. *Cg*-BigDef1 binds to the cell wall of *S. aureus* SA113 WT and both *S. aureus Δtago* and *ΔdltA* mutants. (B) Score binding of N-terminal and C-terminal domains of *Cg*-BigDef1 in fold change with reference to the binding score of *Cg*-BigDef1 on *S. aureus* SA113 WT. Results and standard deviations were representative of one experiment. Tukey's multiple comparisons test, * Pvalue < 0.05, **Pvalue < 0.005.

Discussion

Our results showed that teichoic acids (TAs) play a key role in the interaction of *Cg*-BigDef1 with *Staphylococcus aureus* and the resulting antibacterial activity. This provides an important insight into the early steps of *Cg*-BigDef1 mechanisms of action, which probably initiates the process of bacteria trapping into peptide nanonets.

To characterize the fine interactions of *Cg*-BigDef1 with *S. aureus* cell wall, we coupled the design of novel probes with molecular localization microscopy. Visualizing peptide/bacteria interactions remains limited by resolution issues and localization biases. This is due to the use of fluorescent dyes such as anionic fluorescein or the fluorescent proteins whose biochemical properties (size, charge, hydrophobicity) may interfere with the natural interaction process, and particularly here with negatively charged cell wall. In the present studies, the design of clickable chemically-synthesized peptides, which allows post-interaction labeling of the peptides, was a major advantage in studying the fine interactions that take place between *Cg*-BigDef1 and *S. aureus* cell wall. In the case of big defensins, which are composed of two structural domains, orthogonal clickable moieties were used to investigate the specific role of each domain and the possible interactions with the bacteria. In addition to these instrumental peptide tools, we used Super-Resolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM), which gives access to the observation of structures in the 50-100 nm range (Heintzmann & Huser, 2017). This technique has been applied in the recent years to the study of peptidoglycan biosynthesis (Lund et al., 2022) as well as to the study of the interaction of nisin, a cationic AMP that binds to lipid II and causes membrane damages (Scherer et al., 2015), with *S. aureus* (Jensen et al., 2020). *Cg*-BigDef1 interactions, with *S. aureus* were characterized here in the wild-type strain SA113 and in isogenic mutants altered either in the production or in D-alanylation of TAs.

Our results showed a clear role of TAs in the activity of *Cg*-BigDef1 against *S. aureus*. Indeed, both a WTA-deficient mutant and a D-alanylation deficient mutant showed an altered susceptibility to *Cg*-BigDef1. D-alanylation of TAs, because of the positive charge this reaction brings to the bacterial surface, plays a role in the decreased affinity of bacteria to many cationic AMPs (Peschel et al., 1999). Similarly, lack of WTA (due to *Δtago* mutation) reduces the negative charge of the cell wall with possible effects on the interaction with cationic AMPs. We observed in the present work a significant reduction in the peptide/bacteria interaction in both the *Δtago* and *ΔdltA* mutants, whereas the binding of the cationic cytochrome C varied according to the cell wall charge (increased in the *ΔdltA* mutant, decreased in the *Δtago* mutant). For comparison, in the Group A *Streptococcus* (GAS), despite major difference in surface charge between the wild-type and the *ΔdltA* mutant, there was no significant increase in the binding of the cationic AMPs (LL37, magainin) to the *ΔdltA* strain (Saar-Dover et al., 2012a). This indicates that electrostatic

interactions are not essential in the mechanism of action of *Cg*-BigDef1. This is actually consistent with (i) the remarkably stable antimicrobial activity of *Cg*-BigDef1 at high ionic strength (400 mM NaCl) (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019), i.e. salt concentrations at which electrostatic charges are masked, and (ii) its broad range of activity against marine bacteria at such environmentally-realistic salt concentrations (De San Nicolas et al., 2022b). In GAS, it was proposed that D-alanylation of LTAs confers protection against cationic AMPs by decreasing the flexibility and permeability of the cell wall, rather than by reducing the electrostatic interactions of the peptides with the cell surface (Saar-Dover et al., 2012a).

An alternative hypothesis is that *Cg*-BigDef1 directly interacts with D-Alanylated TAs, independently from the electrostatic charges. This is supported in this study by the inhibition of *Cg*-BigDef1 activity with the exogenously added D-alanylated LTA, which suggests that LTA competitively binds *Cg*-BigDef1 and prevents interaction with its cellular target(s). Super resolution microscopy observations provide further support to this hypothesis. First, we observed *Cg*-BigDef1 (1.25 µM) localization at the cell wall of *S. aureus* after 2 h of contact, a duration sufficient to reduce *S. aureus* viability by ~10 fold. *Cg*-BigDef1 labelling was focal, dense and sometimes extended outside the cell wall. Recent studies have improved our knowledge on TA localization in Gram-positive bacteria. In *S. aureus,* LTA is synthesized at the septal membrane during cell division (Schneewind & Missiakas, 2019). Moreover, in *Bacillus subtilis,* WTA occurs in a patch-like manner at the peptidoglycan synthesis sites on the cytoplasmic membrane, before it reaches the outermost layer of the cell wall (Koyano et al., 2023). Still, in *S. aureus,* peptidoglycan is synthesized at the septum and around the peripheral wall and does not occur in discrete foci (Lund et al., 2018). In our present study, *Cg*-BigDef1 labelling was often observed next to the bacterial septum, a region where the septum is incomplete, uncovered by peptidoglycan (Lund et al., 2018), which may make TAs more accessible to the *Cg*-BigDef1. Otherwise, *Cg*-BigDef1 was observed on very focal points around the cell wall. Such a patchy labelling may be consistent with a direct interaction with TAs, from where a nanonet can assemble and extend, thereby entrapping neighboring cells. Like *Cg*-BigDef1, human β-defensin 3 and group IIA secreted phospholipase A2 are more active against wild-type than WTA-deficient *S. aureus* mutants (Koprivnjak et al., 2008). Thus, a number of AMPs and proteins participating in the defense of metazoan against infections seem to have evolved the capacity to target TAs at the cell wall of Gram-positive bacteria. From a co-evolutionary perspective, recognition of such conserved and abundant microbial polymers by host defense peptides appears a likely hypothesis. Interestingly, interaction with TAs can trigger nanonet formation in peptides able to auto-assemble (Tram et al., 2023), as observed on our SIM images.

Interaction of antibiotics with TAs is known to trigger the release of autolysins, which degrade the peptidoglycan (Flores-Kim et al., 2019). In most of the SR-SIM images, we observed that *Cg*-BigDef1 insertion into the cell wall (green pixels) corresponds to black areas unlabeled with wheat germ agglutinin (red pixels) (Fig.3C, white arrow). One possible reason for this lack of staining is that autolysins are activated locally at the peptide insertion site. In support of this hypothesis, we observed that extended exposure to *Cg*-BigDef1 (> 6 h) created membrane damages to bacterial cells as determined by the Sytox green assay (supplemental figure S1C). Such observations are consistent with the peptidoglycan degradation by autolysins, leading to loss of cell wall integrity and subsequent cell lysis (Yamada et al., 1996a) . We could not obtain autolysin-deficient mutants to demonstrate the activation of autolysins in our studies. However, we are planning to test the peptidoglycan-degrading activity of *Cg*-BigDef1-treated *S. aureus* to test this hypothesis.

The role of the two *Cg*-BigDef1 domains in the interaction with *S. aureus* cell wall was tested by super resolution microscopy. Quantitative imaging showed that the separate domains interacted with *S. aureus* SA113 much less efficiently than the full length *Cg*-BigDef1, as previously shown by HPLC-quantification of *S. aureus* SG511-bound peptides (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Silva, et al., 2019). In both experiments, the N-terminal domain was the most efficient in binding to *S. aureus* strains. Remarkably, only the N-terminal domain showed the capacity to insert into the cell wall of *S. aureus* SA113. The interaction was dense and focal, as observed with the full-length peptide. In contrast, when the C-terminal was associated to *S. aureus* SA113, it was intracellular, but it localized in ghost cells devoid of DNA. We have currently no indication on how the C-terminal may enter *S. aureus* cells. However, we could clearly demonstrate by co-localization experiments that the N-terminal domain is sufficient to localize the C-terminal domain at the cell wall and in the nascent nanonet.

Overall, our present article shows a key role of TAs in recruiting *Cg*-BigDef1 at the cell wall of *S. aureus*. This recruitment is mediated by the N-terminal domain specific of this peptide family. From the focal interactions, where *Cg*-BigDef1 interacts with TAs and other key polymers such as peptidoglycan, a peptide nanonet assembles and entraps neighboring cells. The precise mechanisms by which *S. aureus* are killed within the nanonet remains to be explored. We hypothesize this may involve the activation of autolysins bound to WTA.

Acknowledgements

We thank Prof. Andreas Peschel (University of Tübingen, Germany) for his generous gift of the *S. aureus Δtago* and *ΔdltA* strains. We thank Julio Mateos Langerak (The Institute of Human Genetics, Montpellier France) for his assistance on the SR-SIM super resolution microscopy. We are grateful to the MRI facility of Biocampus, Montpellier.

References

Beliu, G., Kurz, A.J., Kuhlemann, A.C., Behringer-Pliess, L., Meub, M., Wolf, N., Seibel, J., Shi, Z.-D., Schnermann, M., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Doose, S., Sauer, M., 2019. Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. Commun Biol 2, 261. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0518-z

Breukink, E., de Kruijff, B., 2006. Lipid II as a target for antibiotics. Nat Rev Drug Discov 5, 321–323. https://doi.org/10.1038/nrd2004

De San Nicolas, N., Asokan, A., Rosa, R.D., Voisin, S.N., Travers, M.-A., Rocha, G., Dantan, L., Dorant, Y., Mitta, G., Petton, B., Charrière, G.M., Escoubas, J.-M., Boulo, V., Pouzadoux, J., Meudal, H., Loth, K., Aucagne, V., Delmas, A.F., Bulet, P., Montagnani, C., Destoumieux-Garzón, D., 2022. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. Marine Drugs 20, 745–745. https://doi.org/10.3390/md20120745

Flores-Kim, J., Dobihal, G.S., Fenton, A., Rudner, D.Z., Bernhardt, T.G., 2019. A switch in surface polymer biogenesis triggers growth-phase-dependent and antibiotic-induced bacteriolysis. eLife 8, e44912. https://doi.org/10.7554/eLife.44912

Gerdol, M., Schmitt, P., Venier, P., Rocha, G., Rosa, R.D., Destoumieux-Garzón, D., 2020. Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. Frontiers in Immunology 11, 1–16. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758

Heintzmann, R., Huser, T., 2017. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. Chem. Rev. 117, 13890–13908. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218

Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., Leisner, J.J., 2020. Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Front. Microbiol. 11, 1007. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007

Koprivnjak, T., Weidenmaier, C., Peschel, A., Weiss, J.P., 2008. Wall Teichoic Acid Deficiency in *Staphylococcus aureus* Confers Selective Resistance to Mammalian Group IIA Phospholipase A_2 and Human β-Defensin 3. Infect Immun 76, 2169–2176. https://doi.org/10.1128/IAI.01705-07

Koyano, Y., Okajima, K., Mihara, M., Yamamoto, H., 2023. Visualization of Wall Teichoic Acid Decoration in Bacillus subtilis. J Bacteriol 205, e00066-23. https://doi.org/10.1128/jb.00066-23

Loth, K., Vergnes, A., Barreto, C., Voisin, S.N., Meudal, H., Silva, D., Bressan, A., Bulet, P., Touqui, L., Delmas, A.F., Destoumieux-Garzón, D., 2019. The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets Karine. mBio 10:e01821-19. https://doi.org/10.1128/mBio.01821-19

Lund, V.A., Gangotra, H., Zhao, Z., Sutton, J.A.F., Wacnik, K., DeMeester, K., Liang, H., Santiago, C., Leimkuhler Grimes, C., Jones, S., Foster, S.J., 2022. Coupling Novel Probes with Molecular Localization Microscopy Reveals Cell Wall Homeostatic Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. ACS Chem. Biol. 17, 3298–3305. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00741

Lund, V.A., Wacnik, K., Turner, R.D., Cotterell, B.E., Walther, C.G., Fenn, S.J., Grein, F., Wollman, A.J., Leake, M.C., Olivier, N., Cadby, A., Mesnage, S., Jones, S., Foster, S.J., 2018. Molecular coordination of Staphylococcus aureus cell division. eLife 7, e32057. https://doi.org/10.7554/eLife.32057

Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Götz, F., 1999. Inactivation of the dlt Operon in Staphylococcus aureus Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. Journal of Biological Chemistry 274, 8405–8410. https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405

Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., Shai, Y., 2012. D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B Streptococcus by Increasing the Cell Wall Density. PLoS Pathogens 8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891

Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., Sahl, H.G., 2010. Human β-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci. Infection and Immunity 78, 2793–2800. https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09

Scherer, K.M., Spille, J.-H., Sahl, H.-G., Grein, F., Kubitscheck, U., 2015. The Lantibiotic Nisin Induces Lipid II Aggregation, Causing Membrane Instability and Vesicle Budding. Biophysical Journal 108, 1114–1124. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.020

Schmitt, P., Wilmes, M., Pugniere, M., Bachere, E., Sahl, H., Schneider, T., Destoumieux-Garzon, D., 2010. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action. J. Biol. Chem. 285, 29208–29216. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143388

Schneewind, O., Missiakas, D., 2014. Lipoteichoic Acids, Phosphate-Containing Polymers in the Envelope of Gram-Positive Bacteria. J Bacteriol 196, 1133–1142. https://doi.org/10.1128/JB.01155-13

Schneewind, O., Missiakas, D.M., 2019. Staphylococcal Protein Secretion and Envelope Assembly. Microbiol Spectr 7, 7.4.5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0070-2019

Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A.K., Mygind, P.H., Raventós, D.S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A.M.J.J., De Maria, L., Andersen, A.S., Gammelgaard, L.K., Sahl, H.G., Kristensen, H.H., 2010. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. Science 328, 1168–1172. https://doi.org/10.1126/science.1185723

te Winkel, J.D., Gray, D.A., Seistrup, K.H., Hamoen, L.W., Strahl, H., 2016. Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes. Front Cell Dev Biol 4, 29. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00029

Terrier, V.P., Adihou, H., Arnould, M., Delmas, A.F., Aucagne, V., 2015. A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. Chem. Sci. https://doi.org/10.1039/C5SC02630J

Tram, N.D.T., Xu, J., Mukherjee, D., Obanel, A.E., Mayandi, V., Selvarajan, V., Zhu, X., Teo, J., Barathi, V.A., Lakshminarayanan, R., Ee, P.L.R., 2023. Bacteria-Responsive Self-Assembly of Antimicrobial Peptide Nanonets for Trap-and-Kill of Antibiotic-Resistant Strains. Adv Funct Materials 33, 2210858. https://doi.org/10.1002/adfm.202210858

Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y., Kristian, S.A., Dietz, K., Yeaman, M.R., Bayer, A.S., 2005. Lack of Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus* Leads to Reduced Interactions with Endothelial Cells and to Attenuated Virulence in a Rabbit Model of Endocarditis. J INFECT DIS 191, 1771–1777. https://doi.org/10.1086/429692

Xia, G., Kohler, T., Peschel, A., 2010. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of Staphylococcus aureus. International Journal of Medical Microbiology 300, 148–154. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001

Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T., Matsumoto, A., Suginaka, H., 1996. An autolysin ring associated with cell separation of Staphylococcus aureus. J Bacteriol 178, 1565–1571. https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1565-1571.1996

SUPPLEMENTARY DATA

Teichoic acids play a key role in the antibacterial activity of big defensins against *Staphylococcus aureus*

Noémie de San Nicolas[#], Albane Jouault[#], Aromal Asokan, Lhousseine Touqui, Imane El Fannassi, Océane Romatif, Karine Loth, Vincent Aucagne, Agnès F. Delmas, Philippe Bulet, Caroline Montagnani, Guillaume Charrière*, Delphine Destoumieux-Garzón*

Table of contents:

Table S1. MIC and MBC values of clickable peptides against S. aureus SA113 and mutants 161

Fig S1A. 3-D structure of Cg-BigDef1 (PBD 6QBL).....161

Figure S1B. SIM super-resolution microscopy images of wild-type S. aureus SA113 treated with Cg-BigDef1 C-terminal domain (labelled with ATTO FLUOR 550 tetrazines, red) and Cg-BigDef1 N-domain (unlabeled).....161

Figure S1C. Apotome image of wild-type S. aureus SA113 treated with C-terminal domain a concentration of 1,25µM during 2 h..... 162

Figure S1D. Membrane permeabilization of S. aureus SA113 was measured by the Sytox green assay for 6 h. Bacteria were exposed to 1.25 µM Cg-BigDef1 or an equal volume of water (control).....162

General information..... 163

General procedures for solid phase peptide synthesis and NCL..... 164

Protocol PS1 – Peptide elongation: 164

Protocol PS2 – Reductive amination: introduction of the hydroxyl nitrobenzyl group (Hnb): 164

Protocol PS3 – Peptide cleavage:..... 164

Protocol PS4 – Procedure for selective (Hnb) ester cleavage to allow UV titration of Fmoc deprotection through piperidine treatment: 164

Protocol PS5 – Preparation of the hydrazide resin:..... 164

Protocol PS6 – One pot thioesterification and cleavage of peptide hydrazides:..... 165

Protocol PS7 – General procedure for native chemical ligation:..... 165

Protocol PS8 – Native chemical ligation involving peptide hydrazides: 165

Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K-dPEG)$_8$-N$_3$) 166

Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)G-NH$_2$ 166

Ligation between *Cg*-BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)G-NH$_2$ + *Cg*-BigDef1[57-93](S84K) 169

Oxidative folding of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K) 170

Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K-dPEG)$_8$-N$_3$) 171

Synthesis of N$_3$-(dPEG)$_8$-BigDef1[44-93] 172

Synthesis of TCO-(PEG)$_8$- *Cg*-BigDef1[44-93] 173

Table S1. MIC and MBC values of clickable peptides against *S. aureus* SA113 and mutants.

	SA113 WT		SA113Δ*Δtago*		SA113Δ*ΔdltA*	
	MIC (µM)	MBC (µM)	MIC (µM)	MBC (µM)	MIC (µM)	MBC (µM)
Cg-BigDef1 [1-93] (S84K-dPEG)8-N3	2.5	>10	10	>10	0.62	10
Cg-BigDef1 [1-42]-Anl	10	>10	>10	>10	1 .25	10
N3-(dPEG)8-*Cg*-BigDef1 [44-93]	>10	>10	>10	>10	2.5	10

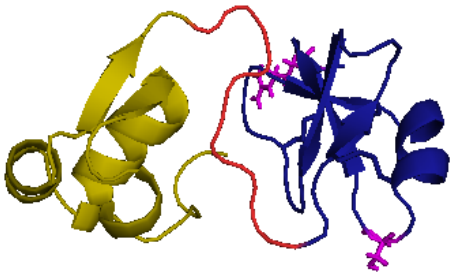


Fig S1A. 3-D structure of Cg-BigDef1 (PBD 6QBL). The N-terminal domain, the C-terminal domain and the linker areas colored in olive, blue and red, respectively. The exposed Ser84 was substituted by Lys for further installation at its N^{ε} of an azido-Peg moiety via an NHS coupling. Ser 84 is extended as stick.

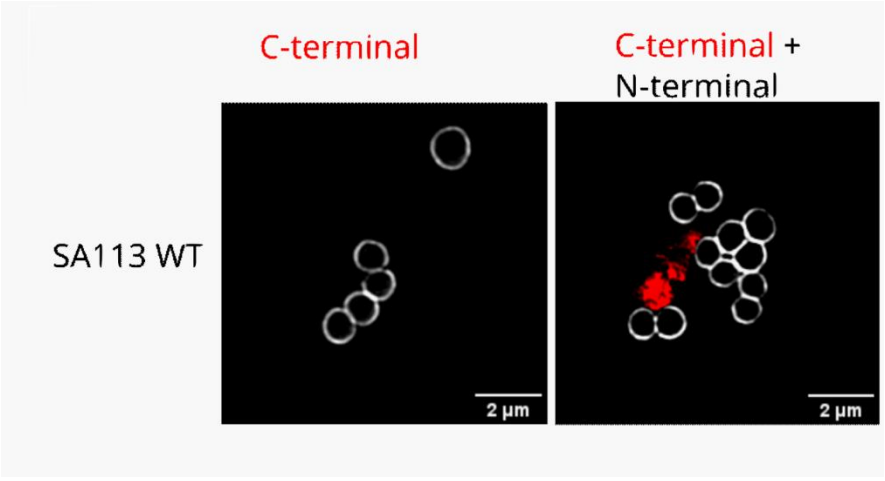


Figure S1B. SIM super-resolution microscopy images of wild-type *S. aureus* SA113 treated with *Cg*-BigDef1 C-terminal domain (labelled with ATTO FLUOR 550 tetrazines, red) and *Cg*-BigDef1 N-domain (unlabeled). The left panel shows a 2h-contact with the C-terminal domain alone (1.25 µM). The right panel shows a 2h-contact with the C-terminal domain (1.25 µM) pre-incubated with the N-terminal domain of *Cg*-BigDef1(1.25 µM) during 1h before contact. The cell wall was labelled with WGA-Alexa647 (gray), Scale bar is 2µm. Objective x100.

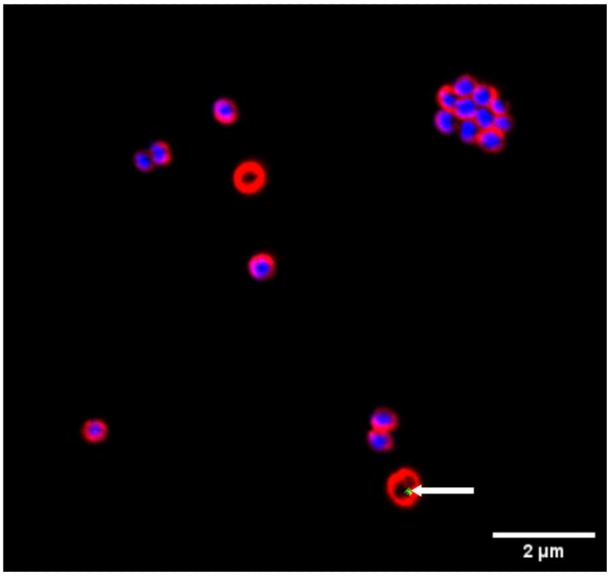


Figure S1C. Apotome image of wild-type *S. aureus* SA113 treated with C-terminal domain a concentration of 1,25µM during 2 h. The cell wall was labelled with WGA-Alexa555 (red), DNA was labelled with DAPI (blue) and the C-terminal domain was labelled with Alexa FLUOR 488 Alkyne (green). The C-terminal domain (white arrow) is localized inside ghost cell, i.e. cells devoid of intracellular DNA. Images are shown from the middle image of the z-stack. Scale bar is 2µm. Objective x100.

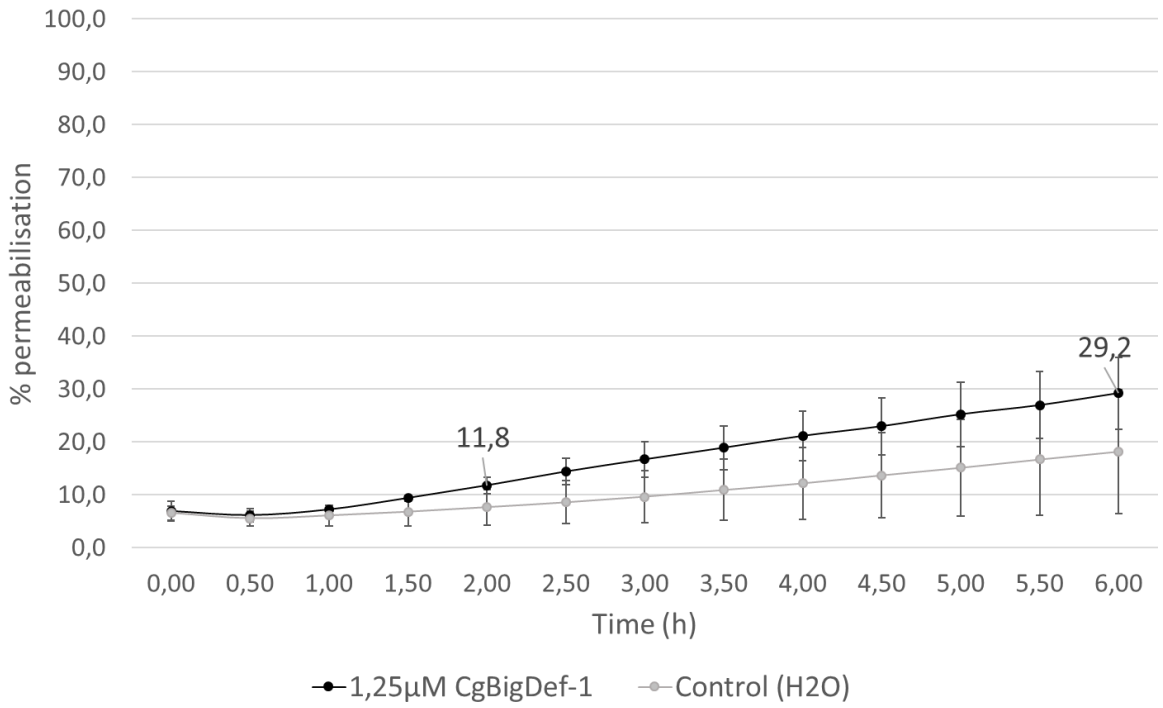


Figure S1D. Membrane permeabilization of *S. aureus* SA113 was measured by the Sytox green assay for 6 h. Bacteria were exposed to 1.25 µM *Cg*-BigDef1 or an equal volume of water (control). Data are represented as percentages of permeabilized bacterial cells relative to complete cell lysis with Triton X-100 as a positive control. In killing and membrane permeabilization assays, standard deviations were calculated using results from three and five independent experiments, respectively.

General information

All reagents and solvents were used without further purification. Protected amino acids were purchased from Gyros Protein Technology (Uppsala, Sweden). DIEA was purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). TentaGel® R RAM resin was purchased from Rapp Polymere (Tübingen, Germany). Amino-PEGA resin was purchased from Sigma Aldrich. Trityl-OH ChemMatrix resin was purchased from PCAS BioMatrix. Peptide synthesis grade DMF was obtained from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). TCO-PEG8-NHS ester, were purchased from (BroadPharm, San Diego, USA). Azido-dPEG®8-NHS ester was purchased from Sigma Aldrich. All other chemicals were from Sigma and solvents from Carlo Erba. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q water system from Millipore (Molsheim, France). Polypropylene syringes fitted with polypropylene frits were obtained from Torviq (Niles, MI, USA) and were equipped with PTFE stopcocks bought from Biotage.

HPLC analyses were carried out on a Chromaster system equipped with a 5160 pump, a 5430 diode array detector and a 5260 auto sampler. Semi-preparative scale purifications were carried out on a LaChromElite system equipped with a Hitachi L-2130 pump, a Hitachi L-2455 diode array detector, a Hitachi L-2200 auto sampler and a Foxy R3 fraction collector. Preparative scale purification was performed on a Shimadzu instrument equipped with LC-20AP pump, a SPD-40 UV detector, a FRC-10A fraction collector and a SCL-40 communication module.

Chromolith High Resolution RP-18e (150 Å, 10 × 4.6 mm, 3 mL/min flow rate), Nucleosil C18 (300 Å, 5 µm, 250 × 4.6 mm, 1 mL/min flow rate), Jupiter C4 (300 Å, 5 µm, 250 × 4.6 mm, 1 mL/min flow rate) columns were used for analysis. For semi-preparative purifications, Nucleosil C18 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) or Jupiter C4 column (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) were used. For preparative purifications Nucleosil C18 column (300 Å, 5 µm, 250 x 32 mm, 30 mL/min flow rate) was used. Solvents A and B are 0.1% TFA in H_2O and 0.1% TFA in MeCN, respectively.

LC-MS analyses were carried out on an Agilent 1260 Infinity HPLC system, coupled with an Agilent 6120 mass spectrometer (ESI + mode), and fitted with an Aeris Widepore XB-C18 2 (3.6 µm, 150 × 2.1 mm, 0.5 mL/min flow rate, 60 °C) column. The reported *m*/*z* values correspond to the monoisotopic ions if not specified otherwise. Solvents A' and B' were 0.1% formic acid in H_2O and 0.1% formic acid in MeCN, respectively. Two different gradients were used: "the standard gradient": 3% B' for 0.6 min, then 3 to 50% B' over 10.8 min) or the "hydrophobic peptide gradient" 12% B' for 0.6 min, then 12 to 65% B' over 10.8 min were used for hydrophilic and hydrophobic peptide segments, respectively. Low resolution MS of pure compounds was obtained using this system. When needed, the multiply charged envelope was deconvoluted using the charge deconvolution tool in Agilent OpenLab CDS ChemStation software to obtain the average [M] value. High resolution ESI-MS analyses were performed on a maXis™ ultra-high-resolution Q-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), using the positive mode. The multiply charged envelope was deconvoluted using the charge deconvolution algorithm in Bruker Data Analysis 4.1 software to obtain the monoisotopic [M] value.

For calculating the yields, the quantities of purified peptides were determined by weight, taking into account a molecular weight including trifluoroacetate counter-ions (one per Arg, His, Lys and N-terminal amine of the peptide sequence) but not water content.

General procedures for solid phase peptide synthesis and NCL

Protocol PS1 – Peptide elongation:

Automated Fmoc-based solid phase peptide syntheses (SPPS) were carried out on a Prelude synthesizer from Protein technologies. Manual couplings were performed on polypropylene syringes fitted with polypropylene frits using rotation stirring. The side-chain protecting groups used were Arg(Pbf), Asp(O*t*Bu), Asn(Trt), Cys(Trt), Cys(S*t*Bu), Glu(O*t*Bu), Gln(Trt), His(Trt), Lys(Boc), Ser(*t*Bu), Thr(*t*Bu), Trp(Boc) and Tyr(*t*Bu). Syntheses were performed on 0.050 mmol-per-reactor scale. Protected amino acids (10 equiv.) were coupled using HATU (9.5 equiv.) and DIEA (20 equiv.) in NMP (4 mL) for 30 min. Coupling on *N*-(Hnb)-cysteine secondary amine were performed through three successive couplings for 2 h. Capping of possible unreacted amine groups was achieved by treatment with acetic anhydride (60 equiv.), DIEA (15.5 equiv.) and HOBt hydrate (1.8 equiv.) in NMP (4 mL) for 7 min (3 x 7 min in the case of *N*-(Hnb)-cysteine secondary amine). Fmoc group was deprotected by three successive treatments with 20% piperidine in NMP (4 mL) for 3 min.

Protocol PS2 – Reductive amination: introduction of the hydroxyl nitrobenzyl group (Hnb):

50 µmol of H-Cys(S*t*Bu)-Gly-Rink-resin was washed with 1:1 DMF/MeOH (4 x 4 mL, 30 s). 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (84 mg, 10 equiv.) in 4 mL 49.5:49.5:1 DMF/MeOH/AcOH (125 mM aldehyde concentration) was then added, and the reactor was stirred for 5 min. The reactor was drained, and the resin was washed with 1:1 DMF/MeOH (3 x 4 mL, 5 s) then DMF (3 x 4 mL, 5 s). Without delay, a fresh solution of sodium borohydride (38 mg, 20 equiv.) in 4 mL DMF (250 mM borohydride concentration) was added and the reactor was stirred for 20 min. The reactor was drained, and the resin was washed with DMF (4 × 4 mL, 30 s), 20% *v*/*v* piperidine in NMP (3 × 4 mL, 3 min), NMP (3 × 4 mL, 30 s), CH_2Cl_2 (3 × 5 mL, 30 s) and NMP (3 × 4 mL, 30 s).

Protocol PS3 – Peptide cleavage:

The crude peptide was deprotected and cleaved from the resin through a treatment with TFA/H_2O/*i*Pr_3SiH/phenol, 88:5:2:5 or TFA/H_2O/*i*Pr_3SiH/phenol/2,2′-(ethylenedioxy)diethanethiol, 82.5:5:5:2:5 (for segments containing cysteine) for 2.5 h. and the peptide was precipitated by dilution into an ice-cold diethyl ether/petroleum ether (1:1) mixture, recovered by centrifugation and washed twice with diethyl ether.

Protocol PS4 – Procedure for selective (Hnb) ester cleavage to allow UV titration of Fmoc deprotection through piperidine treatment:

Because of the formation of variable amounts (5-90%) of *O*-acylated (Hnb) during each coupling, standard UV titration of the fluorenylmethyl-piperidine adduct after Fmoc leads to overestimation if a prior treatment for selective ester cleavage before the piperidine treatment. Ester cleavage mixture was prepared as follows: 1.25 g (1.80 mmol) of $NH_2OH{\cdot}HCl$ and 0.92 g (1.35 mmol) of imidazole were suspended in 5 mL of NMP and the mixture was sonicated until complete dissolution. This solution can be stored for few months at -20 °C. 5 volumes of this solution was diluted with 1 volume of CH_2Cl_2 prior to use, and the resin is treated with the resulting mixture for 3 × 20 min for quantitative ester cleavage. The fluorenylmethyl-piperidine adduct is quantified by UV spectroscopy at 301 nm (ε = 7800 L mol^{-1} cm^{-1}) to evaluate the Fmoc SPPS elongation yield.

Protocol PS5 – Preparation of the hydrazide resin:

The commercially available Trityl-OH Chemmatrix resin (2.00 g, 0.44 mmol/g) was suspended in anhydrous CH_2Cl_2 and kept in an ice bath. Thionyl chloride (83 µL, 1.14 mmol, 1.3 equiv.) was added dropwise to the reaction vessel and reacted for 2 h allowing the reaction mixture to slowly warm to room temperature. After 2 h, the resin was washed with CH_2Cl_2 and DMF. In the next step, the resin was swelled in DMF (12 mL) for 20 min, to which a mixture of hydrazine monohydrate (128 µL 2.64 mmol, 3 equiv.) and DIEA in (380 µL, 2.1 mmol, 2.4 equiv.) in DMF (4 mL) was added while keeping in an ice bath and left to react for 1.5 h while allowing it warm to room temperature. After 1.5 h, the reaction was

quenched by the addition of 200 µL of methanol. The resin was washed with water, DMF, DMF and diethyl ether.

Protocol PS6 – One pot thioesterification and cleavage of peptide hydrazides:

The peptidyl-hydrazide resin was thoroughly washed multiple times with CH_2Cl_2 and vacuum dried. For every 100 mg resin, 2 mL of cleavage cocktail containing TFA/TIPS/water/*m*-cresol/thioanisole (80: 2.5:2.5:5:10, *v*/*v*/*v*/*v*/*v*) was added. The suspension was let to react for 2.5 h. The reaction mixture was then transferred into a round bottom flask placed in an ice bath kept at -15 °C, to which 10 equiv. of $NaNO_2$ dissolved in water (20 µl) was added dropwise. The colour of the solution turned from slight reddish to deep maroon. The reaction was then allowed to stir at -15 °C for 20 min. The reaction mixture was then precipitated by diluting into ice cold diethyl ether (1:9, *v*/*v*). To the pellets containing peptide-acyl azide, 50 equiv. of MeSNa dissolved in phosphate buffer (apparent pH 7, 200 mM phosphate, 6 M guanidinium chloride (Gu.HCl) was added and stirred for 30 min while keeping the tubes in ice. The formation of the thioester was confirmed using ESI-LC-MS. Once the conversion was complete, the thioester was purified using reverse-phase HPLC.

Protocol PS7 – General procedure for native chemical ligation:

Preparation of the NCL buffer (100 mM MPAA, 50 mM TCEP, 6 M Gu.HCl, 200 mM sodium phosphate, apparent pH = 6.5, corrected pH = 7.2):

A stock solution containing 200 mM disodium hydrogen phosphate and 6 M Gu.HCl was prepared by dissolving 356 mg Na_2HPO_4, $2H_20$ (2 mmol) and 5.73 g Gu.HCl (60 mmol) in water (10 mL final volume). This solution can be kept at 4 °C for several months. The solution was thoroughly deoxygenated through successive vacuum/argon cycles before use.

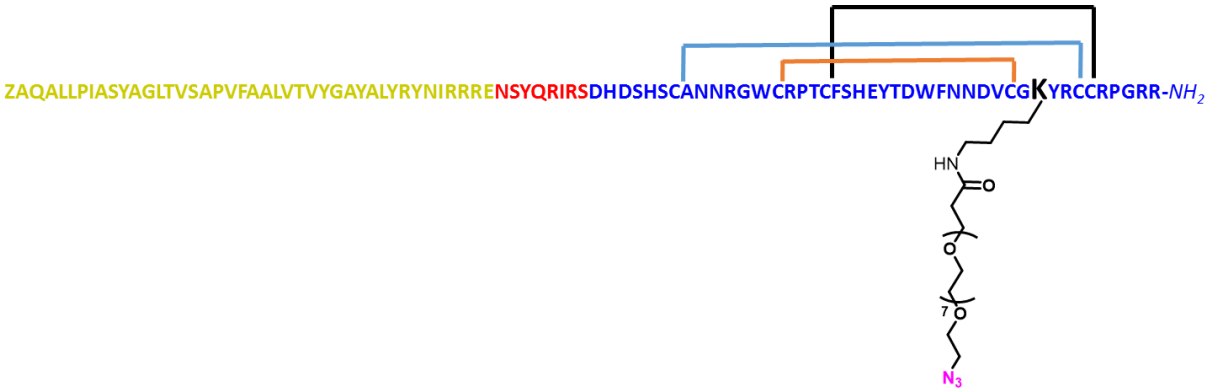
For preparing 1 mL of the NCL buffer, 16.8 mg 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA, 0.10 mmol), 14.3 mg *tris*-carboxyethylphosphine hydrochloride (TCEP, 0.050 mmol) and 10.3 mg of dry NaOH powder (0.26 mmol) were weighted into a vial, which was sealed with a septum and purged with an argon flow. Under argon, 1 mL of the stock solution was added to the MPAA/TCEP/NaOH vial, followed by sonication upon complete dissolution to give the NCL buffer which was immediately used.

NCL reaction: the cysteinyl and crypto-thioester peptides were weighted in a centrifuge tube, which was sealed with a septum and purged with an argon flow. The volume of the NCL buffer appropriate to reach the desired final peptide segments concentration was added under argon, the reaction vessel was firmly sealed with Parafilm®, and the resulting yellow solution was allowed to stir at 37 °C or 40 °C. The reaction was quenched by dilution of the reaction mixture into 20 volumes of the solution of 6 M Gu.HCl/acetic acid (9:1, *v*/*v*) mixture.

Protocol PS8 – Native chemical ligation involving peptide hydrazides:

The peptide hydrazide was dissolved in deoxygenated buffer containing 6 M Gu.HCl and 0.2 M phosphate at pH 3. The solution was then kept in an ice bath at -15 ºC. To the peptide solution, sodium nitrite (10 equiv.) dissolved in deoxygenated water was added and stirred for 15 min. To the peptide-acyl azide, buffer containing MPAA (100 equiv.) and the cysteinyl peptide (1.2 equiv.) was added, and the pH of the solution was adjusted to 6.5 (apparent pH). The reaction was then let to stir at 50 °C. After the completion, a reductive treatment was applied by the addition of an equal volume of 50 mM TCEP solution in 0.2 M phosphate buffer containing 6 M Gu.HCl at pH 7 (apparent pH). After 20 minutes, reaction was quenched by dilution of the reaction mixture into 20 volumes of 6 M Gu.HCl/acetic acid (9:1, *v*/*v*) mixture.

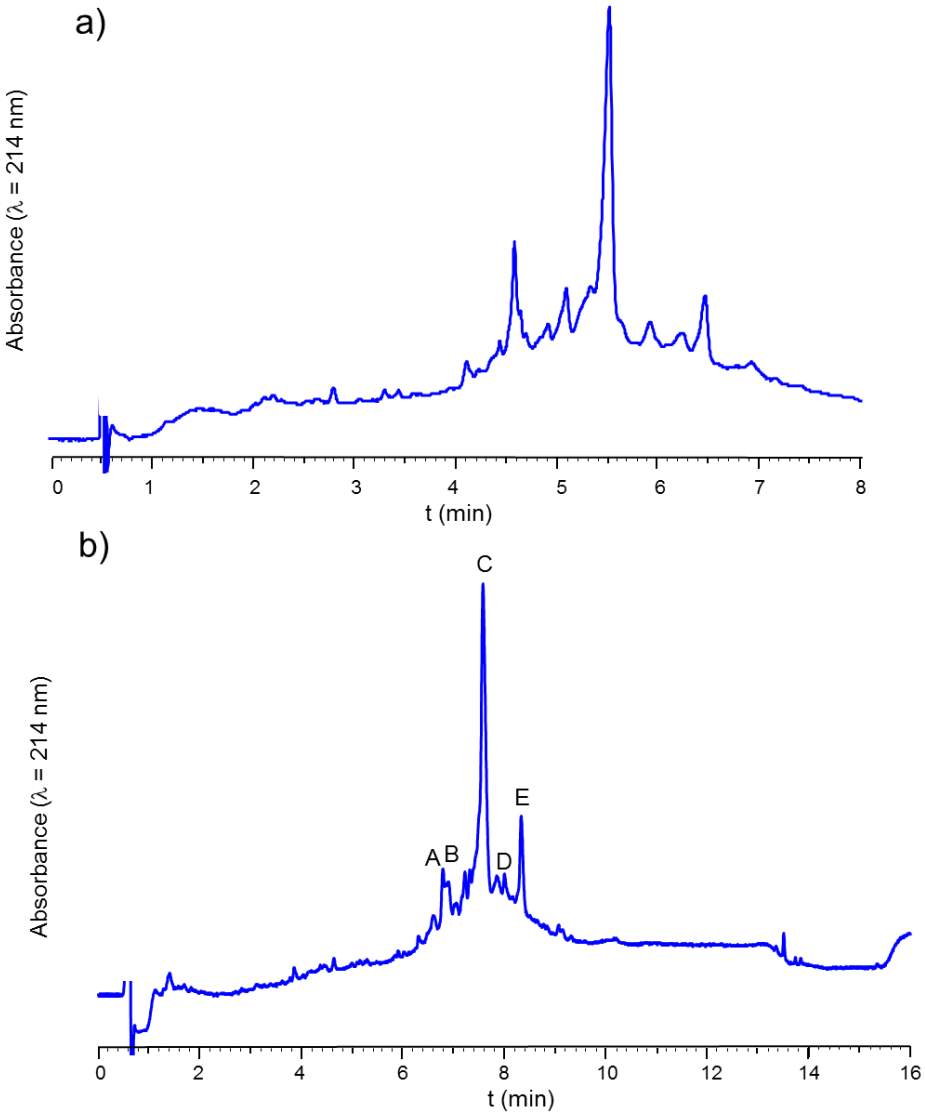
Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K-dPEG)$_8$-N$_3$)



Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)G-NH$_2$

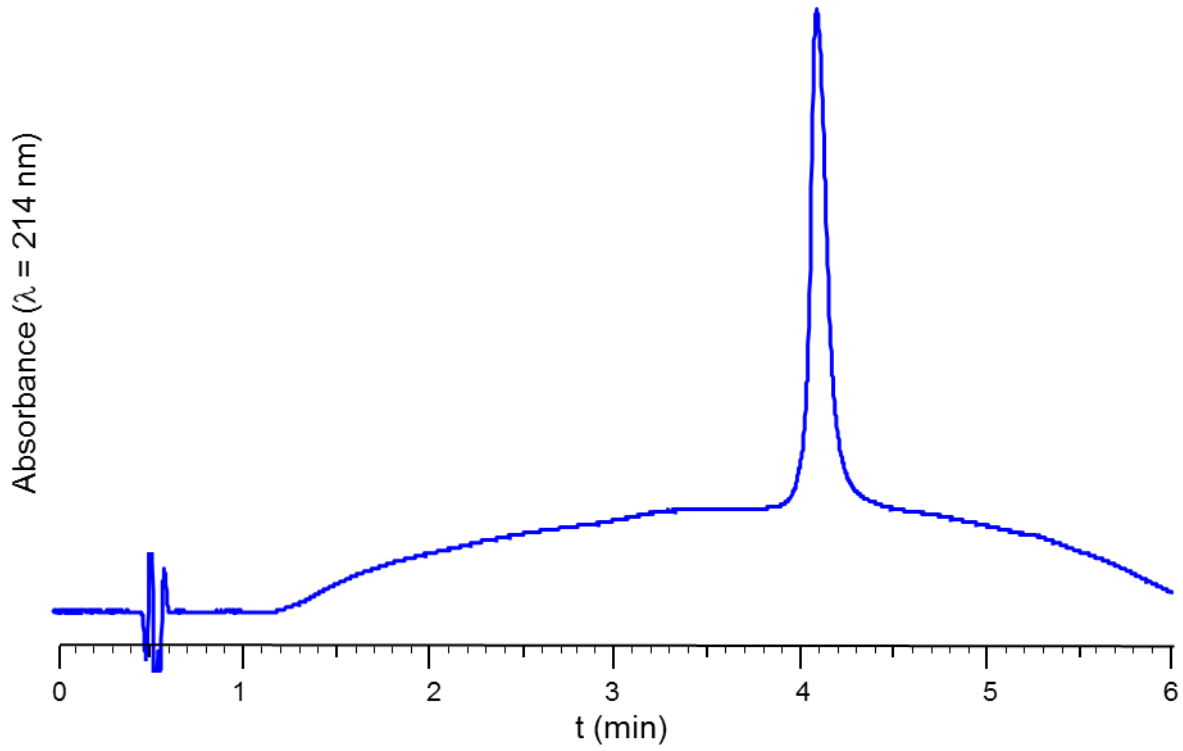
Sequence: ZAQALLPIASYAGLTVSAPVFAALVTVYGAYALYRYNIRRRENSYQRIRSDHDSHS-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH$_2$ (Z = Pyroglutamic acid)

The peptide was synthesized following protocol PS1 starting from Rink tentagel R resin (0.19 mmol/g) Hnb was introduced following protocol PS2. The residues from Z1 to D51 were double coupled (0.5 h x 2), S56 was triple coupled (2 h x 3). M14 was replaced with norlecuine residue. Cleavage was performed following protocol PS3.



Peak number (t_R (min))	[M] found	[M] calcd.	Attributed to
A (6.9)	4985.9	4986.5	Ac-[19-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH_2
B (7.1)	5585.7	5586.2	Ac-[12-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH_2
C (7.8)	6682.8	6683.5	BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH_2
E (8.5)	6778.8	6779.5	BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH_2 + TFA ester on either Ser or Thr residue

Supplementary figure 34: Analysis of the crude BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)-G-NH_2 (a) HPLC trace (HPLC conditions ; Chromolith C18, gradient 25-70% B/A over 5 min) and (b) LC-MS characterization (HPLC conditions : Aeris Widepore XB-C18, hydrophobic gradient)



HPLC analysis: t_R = 4.2 min, (Chromolith C18, gradient 25-80% B/A over 5 min)

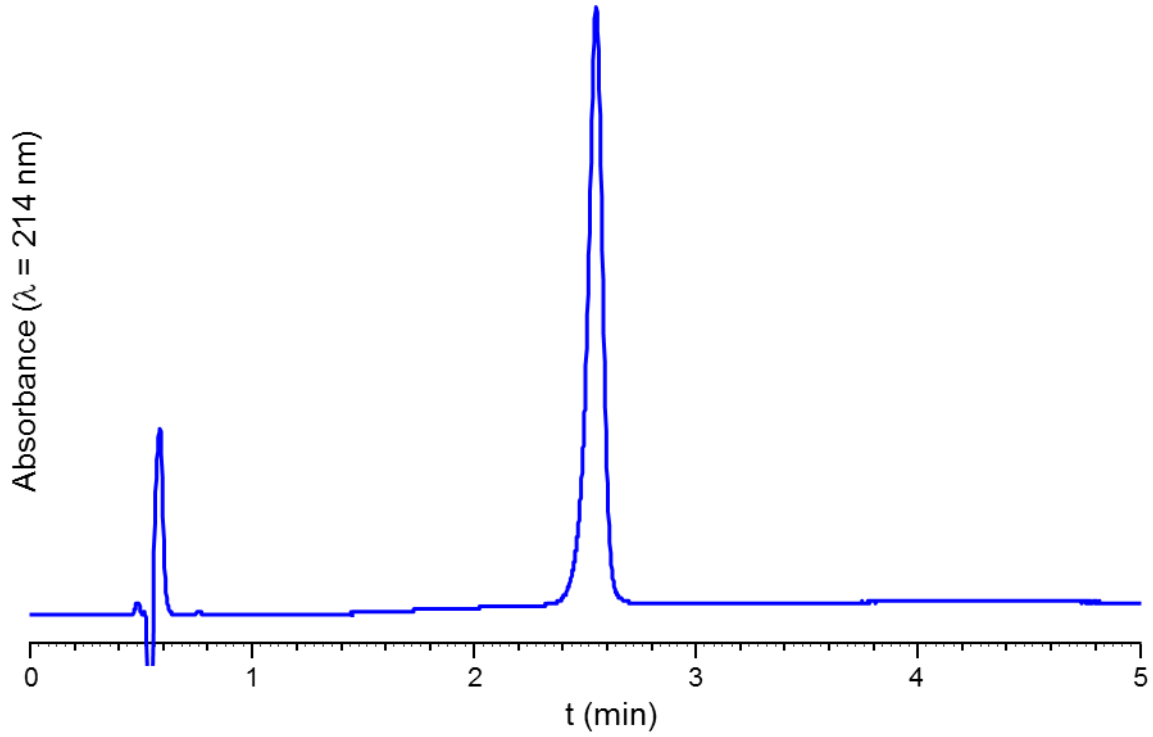
ESI-MS (*m/z*): [M] calcd. for $C_{298}H_{456}N_{86}O_{86}S_6$: 6683.5, found: 6682.8 (average mass, deconvoluted)

Preparative HPLC purification: gradient: 25% B/A for 8 min, then 25-60% B/A over 60 min.

Isolated yield: 5.2 % (20 mg, 2.6 µmol, based on the initial resin loading)

Ligation between *Cg*-BigDef1[1-56]-(Hnb)C(S*t*Bu)G-NH_2 + *Cg*-BigDef1[57-93](S84K)

Following general protocol PSX, crypto-thioester **XX** (8 mg, 1.05 µmol, 1.5 mM final concentration) and cysteinyl peptide **XX** (6.95 mg, 1.2 µmol, 1.2 equiv., 2.4 mM final concentration) were dissolved in NCL buffer (0.53 mL) and the resulting yellow solution was gently stirred under inert atmosphere at 37 °C for 72 h. The reaction was quenched by dilution of the reaction mixture into 20 volumes of the solution of 6 M GdnHCl /acetic acid (9:1, *v*/*v*) mixture. The ligation product was purified on a Nucleosil C18 column and lyophilized.



Supplementary figure 35: HPLC traces of the pure BigDef1[1-93](S84K) (HPLC conditions: Chromolith C18, gradient 40-65% B/A over 4 min)

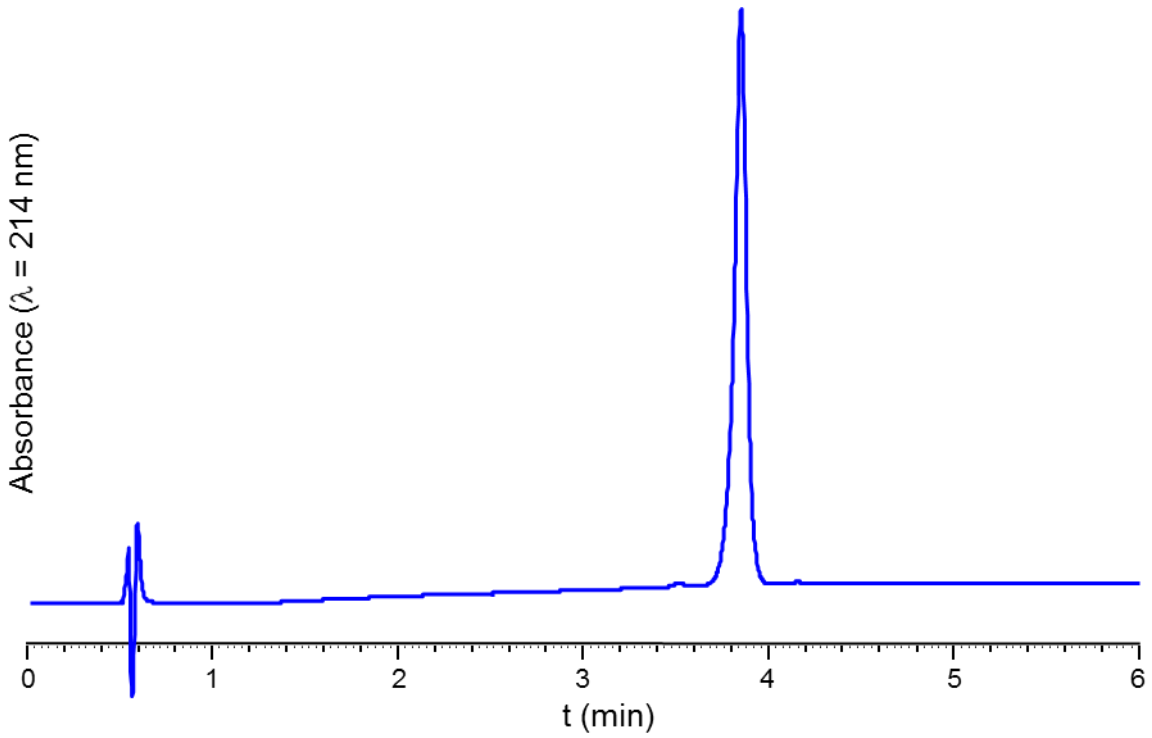
ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$ calcd. for $C_{470}H_{709}N_{147}O_{133}S_6$: 10739.0 Da, found: 10738.0 Da

HPLC analysis: t_R = 2.5 min (Chromolith C18, gradient 40-65 % B/A in 4 min)

Yield: 32% (4.7 mg, 0.37 µmol)

Oxidative folding of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K)

The reduced form of BigDef1[1-93](S84K) (4.7 mg, 0.4 µmol, 7.5 µM final) was dissolved in 10 mL of deoxygenated water containing 0.1% TFA. To which, deoxygenated solutions of GSH (5 mL, 10 mM) containing 0.1% TFA, GSSG (5 mL, 1 mM) containing 0.1% TFA, and acetonitrile (25 mL) were added. The mixture was then thoroughly deoxygenated through successive vacuum/argon cycles while keeping in an ice bath. After which tris buffer containing EDTA was added (5 mL, 1 M Tris containing 10 mM EDTA, pH 8.6). The reaction was let to stir for 48 h in argon atmosphere. The completion of the folding was confirmed using LC-MS. The reaction was then quenched by the addition of glacial acetic acid (5 mL) to a final pH of 4. After acidification, the reaction mixture was concentrated under vacuum and the target peptide was purified by semi preparative HPLC.



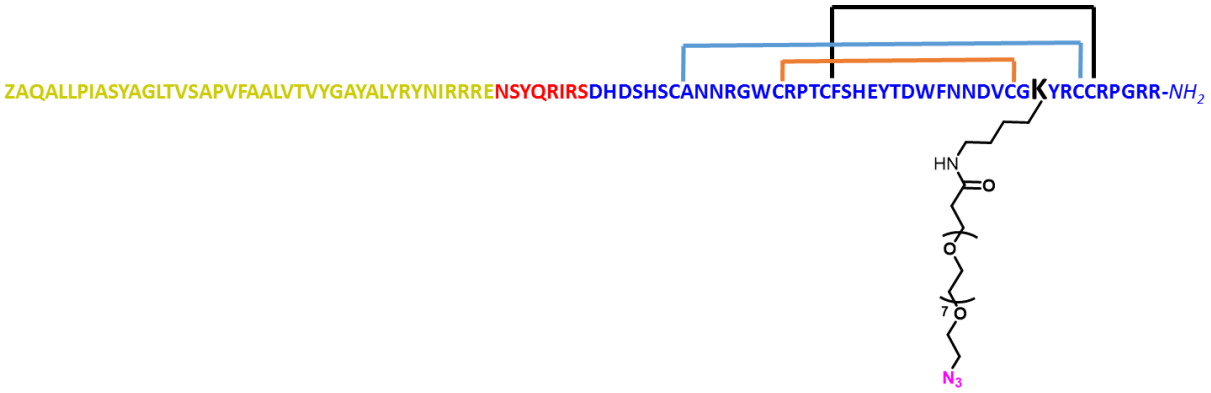
Supplementary figure 36: HPLC trace of the pure oxidized form of BigDef1[1-93](S84K) (HPLC conditions: Chromolith C18, gradient 30-70% B/A over 6 min)

ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$ calcd. for $C_{467}H_{702}N_{144}O_{134}S_6$: 10669.8 Da, found: 10668.9 Da

HPLC analysis: t_R = 3.9 min (Chromolith C18, gradient 30-70 % B/A in 6 min)

Yield: 40% (2 mg, 0.16 µmol)

Synthesis of *Cg*-BigDef1[1-93](S84K-dPEG)$_8$-N$_3$)

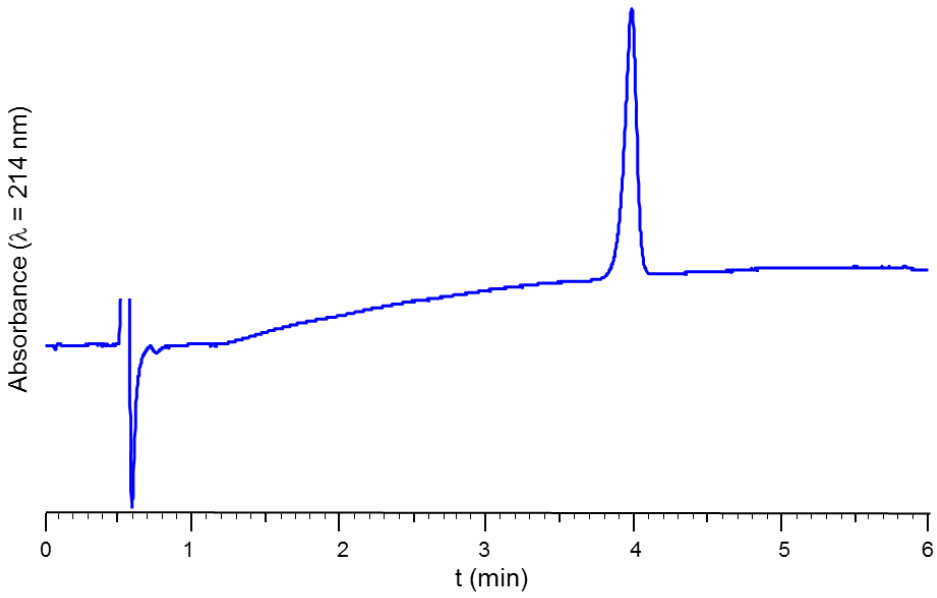


To a solution of folded form of BigDef1[1-93]-S84K (4.2 mg, 167 µL, 0.33 µmol, 1 equiv., final concentration 2 mM) in a mixture of 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6/DMSO (2:8), NHS-dPEG$_8$-N$_3$ (3.7 mg (37 µL from 10 mg/ 0.1 mL stock solution), 6.68 µmol, 20 equiv.) was added. The mixture was then left to stir at room temperature for 2 h. The reaction was quenched by the addition of 1 mL of 10% Acetic acid in 6M GdnHCl and purified using C4-Jupiter column (Jupiter C4 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) using a gradient of 28-42% B/A in 24 min at 70 ºC.

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{489}H_{738}N_{150}O_{142}S_6$: 11176.3537, found: 11176.3402

HPLC analysis: t_R = 4.0 min (Chromolith C18, gradient 30-70 % B/A in 5 min)

Yield: 35% (0.381 mg, 0.11 µmol)



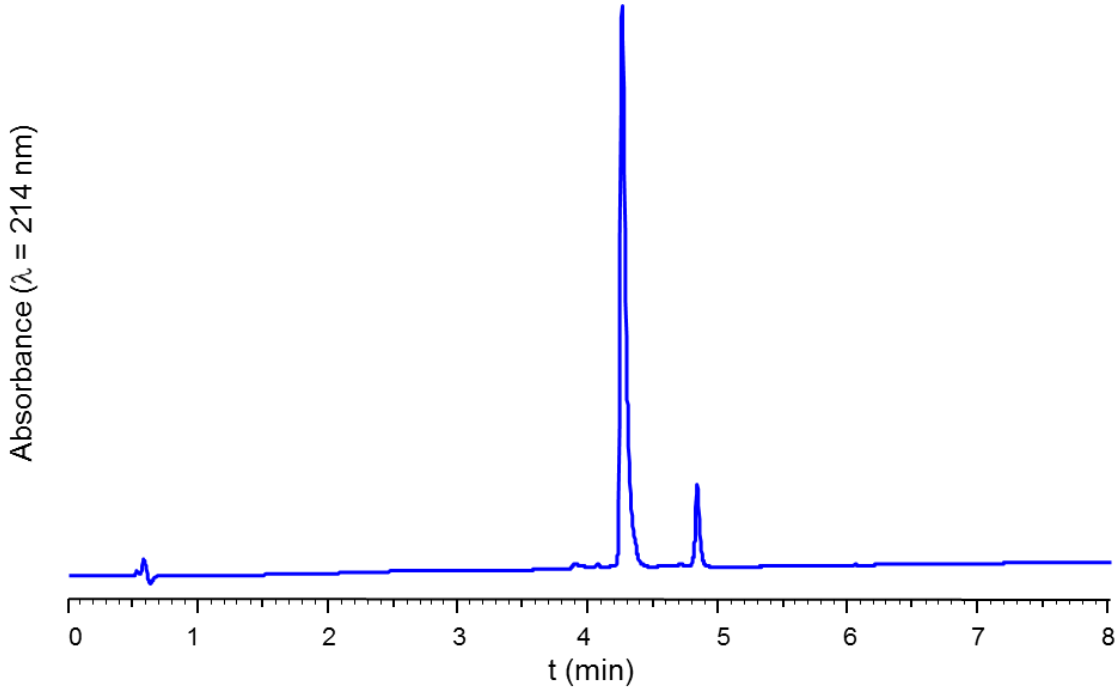
Supplementary figure 37: HPLC trace of pure BigDef1[1-93](S84K-dPEG8-N$_3$) (Chromolith C18, gradient 30-70 % B/A in 5 min)

Synthesis of N_3-(dPEG)$_8$-BigDef1[44-93]



Cg-BigDef1[44-93] was synthezised as described in Loth *et al.* 2019. *Cg*-BigDef1[44-93] (3 mg, 407 µL, 0.4 µmol, 1 equiv., final concentration 1 mM) in a mixture of 50 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6/DMSO (2:8), NHS-dPEG8-N_3 (1.38 mg, 13 µL (10 mg/100 µl stock solution), 2.44 µmol, 6 equiv.) was added. The mixture was then left to stir at room temperature for 2.5 h. The reaction was quenched by the addition of 1 mL solution of 10% Acetic acid in 6M GdnHCl and purified using C4-Jupiter column (Jupiter C4 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) using a gradient of 28-42% B/A in 24 min at 70 ºC.

Important note: N_3-(dPEG)$_8$-*Cg*-BigDef1[44-93] exists in two conformations at pH 2, resulting in two distinct peaks in HPLC analysis. (Supplementary figure S8). To confirm our hypothesis, the major peak was isolated and incubated at pH 2, which resulted in the redistribution of the peaks to previous ratio (not shown), implying that the two peaks arising from two conformers of N_3-(dPEG)$_8$-BigDef1[44-93] which are in equilibrium at pH 2. This observation is validated by LC-MS analysis as both peaks show exact mass.



Supplementary figure 38: HPLC trace of pure N_3-(dPEG)$_8$-BigDef1[44-93] (Chromolith C18, gradient 5-60 % B/A in 7 min. Remark: the two peaks correspond to different conformers in equilibrium)

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{269}H_{394}N_{88}O_{85}S_6$: 6440.7782, found: 6440.7722

HPLC analysis: t_R = 4.30 min and 4.89 min (Chromolith C18, gradient 5-60 % B/A in 7 min)

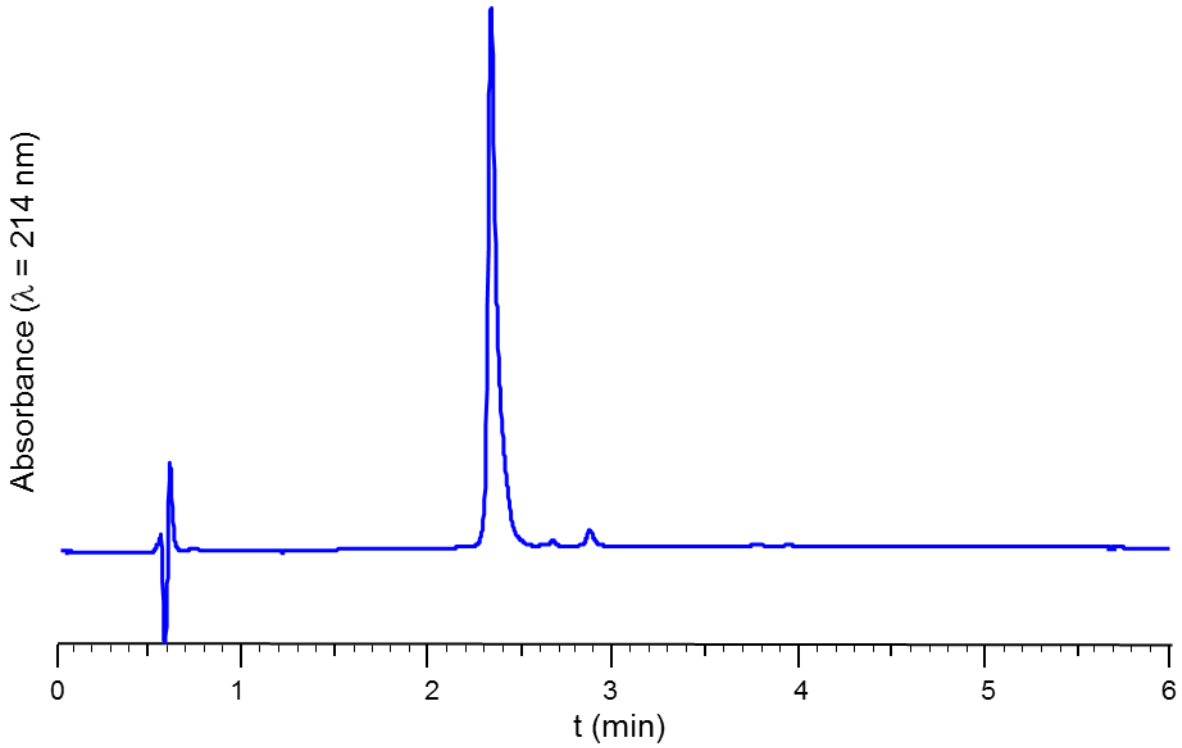
Yield: 22% (693 µg, 0.08 µmol)

Synthesis of TCO-(PEG)$_8$- *Cg*-BigDef1[44-93]



To a solution of folded form of *Cg*-BigDef1[44-93] (3 mg, 207 µL, 0.4 µmol, 1 equiv., final concentration 1 mM) in 200 µL NMP, was added DIEA (6 µL, 32.5 µmol, 80 equiv.). To the mixture, TCO-PEG$_8$-NHS (11.25 mg, 16.3 µmol, 40 equiv.) dissolved in 200 µL of NMP was added. The mixture was then left to stir at 40 ºC for 2h. The reaction was quenched by the addition of 1 mL solution of 10% Acetic acid in 6M GdnHCl and purified using C4-Jupiter column (Jupiter C4 (300 Å, 5 µm, 250 × 10 mm, 3 mL/min flow rate) using a gradient of 10-40% B/A in 30 min at 70 ºC.

Important note: TCO-(PEG)$_8$-*Cg*-BigDef1[44-93] exists in two conformations at pH 2, resulting in two distinct peaks in HPLC analysis. (Supplementary figure 10). To confirm our hypothesis, the major peak was isolated and incubated at pH 2, which resulted in the redistribution of the peaks to previous ratio (not shown), implying that the two peaks arising from two conformers of TCO-(PEG)$_8$-*Cg*-BigDef1[44-93] which are in equilibrium at pH 2. This observation is validated by LC-MS analysis as both peaks show exact mass.



Supplementary figure39: HPLC trace of pure TCO-(PEG)$_8$- *Cg*-BigDef1[44-93] (Chromolith C18, gradient 5-50 % B/A in 5 min, *: the second peaks correspond to different conformers in equilibrium)

ESI-HRMS (*m/z*): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{277}H_{409}N_{89}O_{87}S_6$: 6566.8714, found: 6566.8563

HPLC analysis: t_R = 2.4 min and 2.9 min (Chromolith C18, gradient 5-50% B/A in 5 min)

Yield: 22% (673 ug, 0.09 µmol)

CHAPITRE 3: Discussion générale et perspectives

L'objet d'étude de ma thèse a été les Big défensines, une famille de PAMs diversifiée produite par les cellules immunitaires de l'huître *C. gigas*. Nous avons posé les questions suivantes : (1) Quelles sont les conséquences de la diversité structurale de Big défensines en termes de fonctions ? En particulier, est-ce que les Big défensines jouent des rôles différents dans le contrôle du microbiote de l'huître ? (2) Quels sont les mécanismes d'action qui sous-tendent l'activité bactéricide de *Cg*-BigDef1 ? Peut-on identifier des composants bactériens déterminants pour leur activité ?

Dans ce chapitre, je discuterai des principaux résultats de la thèse en relation avec la littérature disponible ainsi que les perspectives de recherche dérivées de nos conclusions. Mais je commencerai par une petite synthèse sur les outils que nous avons développés pour nos travaux et qui permettront je l'espère d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche.

Développement d'outils adaptés à l'étude des interactions PAMs / bactéries

Peptides de synthèse

Dans cette étude, nous avons pu obtenir des quantités suffisantes de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 de très haute pureté en utilisant la synthèse chimique de Big défensines de *C. gigas* selon la procédure de ligation native décrite précédemment (Loth et al., 2019; Terrier et al., 2016). Ceci n'est pas le fruit de mon travail mais celui de nos partenaires chimistes au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Ils ont également produit la *Cg*-BigDef5 et la *Cg*-BigDef3 (malheureusement peu soluble), ouvrant la voie aux études de diversité fonctionnelle (article 1). Ils ont pu synthétiser les domaines N- et C-terminaux de *Cg*-BigDef1 pour les études sur la fonction des domaines. Enfin, ils ont mis au point des dérivés des big défensines et de leurs domaines marquables par chimie click *a posterori* des contacts PAMs/bactéries (article 2), ce qui évite d'interférer avec les interactions moléculaires à l'origine de l'activité des PAMs.

La microscopie à super résolution

L'utilisation de la microscopie à super résolution s'est avérée essentielle dans notre étude sur les interactions entre *S. aureus* et *Cg*-BigDef1. Cette technique, qui a valu le prix Nobel de chimie en 2014 à Eric Betzig, William Moerner et Stefan Hell (M. Moreau & Cochard, 2014), permet de reconstruire les structures moléculaires avec une résolution allant jusqu'à environ 100 nm, surpassant ainsi les limitations de résolution spatiale de la microscopie à fluorescence conventionnelle. Elle s'est révélée particulièrement précieuse pour l'observation détaillée des

structures bactériennes telles que le peptidoglycane (Monteiro et al., 2015; Wheeler et al., 2011) ainsi que pour étudier le comportement de protéines bactériennes (Eswaramoorthy et al., 2011). En utilisant cette technique, nous avons démontré que *Cg*-BigDef1 interagit avec la paroi de *S. aureus*, et que cette interaction est médiée par le domaine N-terminal de *Cg*-BigDef1, qui facilite également le contact entre le domaine C-terminal de type défensine et la paroi de *S. aureus* (article 2). Ces découvertes fournissent des informations précieuses sur les mécanismes d'interaction entre *Cg*-BigDef1 et *S. aureus*. Ainsi, l'utilisation de la microscopie à super résolution, en particulier la technique SIM, permet une avancée significative dans notre compréhension des interactions entre les peptides antimicrobiens (PAMs) et les structures bactériennes.

Une collection cultivable de bactéries appartenant au microbiote de l'huître

Dans le cadre de cette étude, nous avons établi une collection de bactéries cultivables provenant de l'huître *C. gigas,* que nous avons caractérisée par séquençage 16S et spectrométrie de masse MALDI BioTyping (Dingle & Butler-Wu, 2013) (article 1). Nous avons également phénotypé cette collection pour la virulence de chaque souche chez l'huître (https://doi.org/10.12770/0d529567-92fd-4dcd-9d9c-70e98ab6f772). Cette approche nous a permis et permettra à l'avenir d'étudier l'activité antimicrobienne des PAMs de *C. gigas* sur des micro-organismes directement liés à sa santé, contribuant ainsi à surmonter l'un des obstacles rencontrés dans l'étude de la capacité des PAMs à façonner le microbiote des mollusques. En effet, malgré les avancées dans la description des microbiotes, il reste encore rare de disposer d'une collection de bactéries cultivables associées au microbiote des espèces animales.

Diversité fonctionnelle des Big défensines *de C. gigas*

Rôle de la diversité structurale des Big défensines

La diversification structurale des Big défensines chez certains mollusques, telles que l'huître *C. gigas* et les moules *M. galloprovinciallis* et *D. rostriformis*, constitue une caractéristique frappante de leur histoire évolutive (Gerdol et al., 2020a). Elle interroge sur ses conséquences fonctionnelles. Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les conséquences fonctionnelles de cette diversification observée chez *C. gigas.*

Dans l'article 1, nous avons démontré que la diversification des séquences se traduisait par une spécificité antibactérienne ainsi que par une synergie entre *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5, permettant d'étendre le spectre d'activité des Big défensines sur une collection de bactéries appartenant au microbiote de l'huître (https://doi.org/10.12770/0d529567-92fd-4dcd-9d9c-70e98ab6f772) et

d'accroitre l'activité de cette famille de PAMs. Il aurait évidemment été intéressant de tester l'activité antibactérienne des autres variants de *Cg*-BigDefs pour mesurer à quel point la diversité fonctionnelle est étendue. Une limitation à ces études a été la synthèse chimique, qui permet de produire des molécules extrêmement pures et dont la conformation est vérifiée par résonnance magnétique nucléaire, mais qui reste extrêmement difficile pour des molécules à deux domaines dont un est replié par des ponts disulfure intramoléculaires. Par exemple, nos collaborateurs du Centre de Biophysique Moléculaire (Orléans), ont rencontré certaines difficultés pour synthétiser *Cg*-BigDef3 qui est malheureusement insoluble dans l'eau ce qui n'a pas permis l'étude de son spectre d'activité antibactérien sur le microbiote de l'huître.

L'observation d'activités synergiques entre des variants d'une même famille de PAMs, comme montré ici pour *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5, se retrouve aussi au sein de deux autres familles de PAMs de *C. gigas* : les *Cg*-Defs et les *Cg*-Prps (Schmitt, Lorgeril, et al., 2012) et entre ces familles. La synergie inter-famille de PAMs a aussi été observé chez l'insecte *D. melanogaster* entre les Attacines et les Diptéricines (Hanson et al., 2019). Avec nos nouveaux outils moléculaires, il serait aujourd'hui intéressant d'étudier, *in vitro,* si les variants de *Cg*-BigDefs dont la synthèse est possible aujourd'hui, que ce soit, *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 peuvent aussi agir de manière synergique avec les autres familles de PAMs de *C. gigas* contre des agents pathogènes et/ou de son microbiote.

Nos résultats de synergie viennent renforcer l'hypothèse précédemment formulée par Schmitt et al. que la diversité des PAMs d'huître pourrait compenser leur faible concentration dans les tissus de l'huître (Schmitt, Rosa, et al., 2012). En appui à cette hypothèse, on n'observe qu'un seul variant de Big défensine dans une autre espèce de mollusque bivalve, le pétoncle chilien *A. purpuratus* (Gerdol et al., 2020a), qui est retrouvé en abondance aux surfaces épithéliales du pétoncle (Schmitt P, communication personnelle). Nous avons également montré l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1 et de *Cg*-BigDef5 contre des bactéries appartenant au pathobiote du POMS (Lucasson et al. 2018). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que certaines espèces de mollusques bivalves, telles que les huîtres, ont diversifié leur répertoire de PAMs afin d'accroître leur potentiel antibactérien face à une exposition de communautés bactérienne diversifiées tant dans leurs environnements que au sein de leurs microbiotes. En dehors des mollusques, les exemples s'accumulent sur le rôle de la diversité structurale dans la spécificité des PAMs et dans leurs synergies. Notamment chez les insectes, Hanson et al. 2019 ont observé par une approche *in vivo* que l'activité dans la défense de l'hôte des PAMs de la drosophile n'est visible lorsque plusieurs PAMs sont mutés, et ainsi agissent en synergie contre certains agents pathogènes. Ils ont aussi montré que certains PAMs de la drosophile possédaient un grande spécificité d'activité comme les Diptéricines qui contribuent à elles seules, à la défense contre *Providencia rettgeri* (Hanson et al., 2019). L'ancienne vision selon laquelle les PAMs

de métazoaires auraient une très fable spécificité de cible et agiraient par divers mécanismes membranolytiques est contredite par les résultats des deux articles de cette thèse et ceux de la littérature récente.

Au-delà de l'activité antibactérienne

Les études réalisées sur les Big défensines de l'huître *C. gigas* (Loth, Vergnes, Barreto, Voisin, Meudal, Da Silva, et al., 2019) mais aussi la limule *Tachypleus tridentatus* (Saito et al., 1995), la palourde *Ruditapes philippinesis* et *Venerupis philippinarum* (Wei et al., 2003; Zhao et al., 2010), l'amphioxus *Branchiostoma japonicum* (Teng et al., 2012), le coquillage *Tegillarca granosa* (Ri et al., 2022) et le pétoncle *Argopecten purpuratus* (Stambuk et al., 2021), se sont d'abord focalisés sur la caractérisation moléculaire de ces peptides (Gerdol et al., 2012, 2020a; Gonzalez et al., 2007; Kawabata et al., 1997; M. Li et al., 2012; Rosa et al., 2011; G.-L. Wang et al., 2014; Zhao et al., 2007, 2010). Les études menées sur leurs activités se sont limitées à l'activité antibactérienne particulièrement sur des bactéries d'importance en santé humaine comme certaines souches de *Escherichia coli* et *S. aureus*. Mais il est envisageable que toutes les *Cg*-BigDefs n'aient pas toutes comme seule fonction, au sein de l'huître, une activité antibactérienne. Comme décrit dans l'introduction, les PAMs peuvent avoir plusieurs activités différentes comme dans la famille de β-défensines humaine où HBD-3 qui présente une activité antibactérienne, antivirale et antifongique ainsi qu'une activité antibiofilm. Des activités antifongiques ont été mises en évidence pour *Cg*-BigDef1 sur une souche de *Fusarium oxysporum* pathogène de crevette (Vergnes A., Bressan A. et al., données non publiées). Néanmoins, on ne connait pas beaucoup de champignons associés à des pathologies d'huîtres. Ce n'est pas le cas pour les virus et les parasites. On peut alors s'étonner qu'à ce jour aucune étude publiée n'a testé l'activité antivirale ou antiparasite des Big défensines (ceci est largement lié à la difficulté à mettre en place des tests rapides et simples pour ces agents infectieux). On observe toutefois que l'expression du gène *Cg-bigdef1-2* est fortement atténuée suite à l'infection de OsHV1 µvar (de Lorgeril et al., 2018). Il serait donc particulièrement intéressant de tester *in vitro* l'activité antivirale des *Cg*-BigDefs contre par exemple les norovirus, iridovirus et herpes virus qui touchent ou sont accumulés par les huîtres. Mais aussi leurs activités antiparasitaires contre par exemple *Haplosporidium costale* qui cause des mortalités chez l'huître *C. gigas* (Arzul et al., 2002). La plupart des études sur l'expression des Big-défensines ont été menées suite à un challenge bactérien, par exemple chez la moule (G.-L. Wang et al., 2014), chez le pétoncle (Muñoz et al., 2019; Zhao et al., 2007) et chez l'huître (Rosa et al., 2011). Grâce à la mise en place d'outils durant cette thèse comme des couples d'amorces spécifiques pour les sept *Cg*-BigDefs, il est

désormais possible de suivre l'expression des gènes de chacune des *Cg*-BigDefs par qPCR, suite à une infection virale et/ou bactérienne et/ou parasitaire. Ceci permettra d'émettre des hypothèses sur leurs rôles dans la défense immunitaire de l'hôte face à des agents pathogènes.

Les Big défensines et la régulation du microbiote de *C. gigas*

Cg-BigDef1, un régulateur fin des populations bactériennes associées aux huîtres

Les travaux présentés dans l'article 1, mettent en évidence des changements significatifs dans la β-diversité du microbiote de l'huître *in vivo*, chez des huîtres ayant reçu une injection de *Cg*-BigDef1. Il est probable que ces changements résultent au moins en partie des activités antimicrobiennes de *Cg*-BigDef1 contre certaines bactéries du microbiote telles que mises en évidence dans l'article 1. Une hypothèse alternative (inexplorée dans cette thèse) est que *Cg*-BigDef1 possède une activité immunomodulatrice, comme mis en évidence pour un grand nombre de PAMs (Semple & Dorin, 2012). L'injection de *Cg*-BigDef1 chez *C. gigas* n'a pas eu d'effets négatifs sur la quantité générale en bactéries composant le microbiote des huîtres, ce qui suggère que ce peptide a évolué de manière spécifique pour avoir une activité antimicrobienne contre certaines souches bactériennes sans perturber l'ensemble du microbiote des huîtres.

Ces résultats ont enrichi nos connaissances sur la capacité des PAMs à façonner le microbiote des mollusques, comme cela a été précédemment démontré entre autres chez les mammifères (Salzman et al., 2007), les cnidaires (Franzenburg et al., 2013) et les insectes (Marra et al., 2021). Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux récemment obtenus *in vivo* par Paulina Schmitt et ses collègues chez *A. purpuratus,* démontrant que la Big défensine *Ap*BD1 et la « bactericidal/permeability-icreasing protein » *Ap*LBP/BPI1 ont le potentiel de façonner le microbiote de l'hémolymphe du pétoncle en régulant la prolifération des γ-protéobactéries (González et al., 2020).

Dans le contexte du rôle des PAMs dans la défense de l'hôte, une hypothèse historique suggère que les PAMs fonctionnent en cocktails, où plusieurs effecteurs sont nécessaires pour éliminer les agents pathogènes envahissants (Hanson et al 2022). Par ailleurs, une hypothèse récente suggère que la diversité des PAMs pourrait être attribuable à des interactions hautement spécifiques entre les PAMs et des sous-populations spécifiques de pathogènes qu'ils ciblent (Hanson et al 2022). Notre étude sur les Big défensines par l'injection de *Cg*-BigDef1 s'est principalement interessée au niveau taxonomique des ASV. Elle a révélé une grande spécificité et a amenés à proposer que *Cg*-BigDef1 est un régulateur fin du microbiote de l'huître. Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier l'action des autres *Cg*-BigDefs mais aussi d'autres PAMs de *C. gigas* individuellement, ainsi qu'en cocktail,

afin de valider leur potentiel d'interactions spécifiques et de révéler leur potentiel d'interactions et leur fonction dans le maintien de l'homéostasie. De telles recherches pourraient permettre de prédire les paramètres clés qui prédisposent les individus ou les populations à certains types d'infections. Avec l'accumulation croissante de preuves soutenant le rôle régulateur des PAMs sur le microbiote des espèces animales, y compris les mollusques, il devient essentiel d'explorer à l'avenir, comment les PAMs modulent les fonctions (et pas seulement la structure) du microbiote associé aux huîtres.

Vers le développement d'outils de génomique fonctionnelle pour l'étude des PAMs chez l'huître

Les études fonctionnelles requièrent le développement d'outils efficaces et fiables pour tester la multiplicité de rôles que peuvent endosser les PAMs dans la défense immunitaire des espèces animales. Le moyen utilisé dans l'article 1 pour étudier la fonction des Big défensines de *C. gigas* a été d'injecter la *Cg*-BigDef1 synthétique à *C. gigas* et de suivre l'évolution de son microbiote par métabarcoding 16S. Une alternative que nous avons également testée a consisté à développer des outils génétiques tels que le knock-in, le knock-out et le knock-down de gènes (méthodes utilisées avec succès chez le pétoncle et la drosophile pour étudier la fonction des PAMs). Nous avons tenté d'invalider les gènes codant *Cg*-BigDef1-2 chez *C. gigas* par ARN interférence (ARNi) sans succès, remettant ainsi en question l'étude menée par Jee et al. en 2014. Nos résultats indiquent que l'ARNi est difficilement applicable à notre modèle, qu'il est complexe à mettre en œuvre pour l'étude des gènes de l'immunité car l'injection de siARN et ARNdb induit l'expression des gènes de la réponse immunitaire. De plus, nos résultats soulèvent des interrogations quant à la fonctionnalité de la voie endogène du de l'ARN interférence chez l'huître. Face à ces défis, de nouvelles technologies de génomique fonctionnelle, telles que la technologie CRISPR-Cas9 (Yu et al., 2019) et CRISPR-Cas13 (Cox et al., 2017), offrent de nouvelles opportunités pour étudier la fonction des gènes chez cette espèce. Ces avancées sont particulièrement prometteuses et font actuellement l'objet de travaux au sein de notre laboratoire.

Phénomène du PAV et sélections génétiques

La combinaison *Cg*-BigDef1-2, *Cg*-BigDef4, *Cg*-BigDef7 est la plus répandue chez les huîtres françaises

Très tôt après la découverte des Big défensines chez l'huître, Rafael Da Rosa et Evelyne Bachère ont mis en évidence qu'un phénomène extrême de variation du nombre de copies de gène appelé « Presence/Absence gene variability » (PAV) affectait cette famille de PAMs diversifiée dont on ne connaissait alors que 3 varaints (Rosa et al., 2015). Dans cette thèse, nous avons confirmé que le

phénomène de PAV s'étend à toutes les *Cg*-BigDefs excepté *Cg*-BigDef4 et *Cg*-BigDef7 pour les lots d'huîtres françaises étudiées. Nous avons pu montrer que le profil des variants de Big défensines le plus répandu est la combinaison des gènes codant les *Cg-bigdef1-2, Cg-bigdef4* et *Cg-bigdef7*. Cette combinaison est retrouvée à la fois chez les populations naturelles d'huîtres françaises et chez la famille sélectionnées F14-V. La prévalence des gènes *Cg-bigdef3, Cg-bigdef5*, *Cg-bigdef6* est faible. Ils sont retrouvés chez respectivement 2,4%, 2,4% et 1,2% des individus testés. Les huîtres ne présentant pas le même profil de variants de *Cg*-BigDefs d'un individu à l'autre. Il serait pertinent, par une approche de métabarcoding, d'étudier si le microbiote diffère suivant les profils de variants *Cg*-BigDefs observés au sein de l'huître et ainsi confirmer le rôle des *Cg*-BigDefs dans le façonnage du microbiote de *C. gigas.* Les résultats du PAV en milieu naturel (obtenus après l'écriture de l'article 1) ont montré que l'on ne retrouve ensemble les gènes *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 que chez 1,2% des huîtres étudiées. Or il s'agit des deux défensines pour lesquelles nous avons montré un effet synergique. A la lumière des résultats du PAV, il serait intéressant de tester l'activité synergique des *Cg*-BigDef1-2, *Cg*-BigDef4, *Cg*-BigDef7, la combinaison la plus fréquemment retrouvée dans la nature. Rétrospectivement, l'ensemble des études sur l'expression des Big défensines en contexte sain et pathologique devraient être reprises. On peut en effet légitimement se demander comment chacun de ses variants répond aux stress biotiques et abiotiques que rencontrent les huîtres dans leur environnement.

PAV et sélection génétique des huîtres

Une surprise dans nos travaux a été de ne pas retrouver les mêmes prévalences des *Cg*-BigDef 1, 2 et 3 que Rosa et al en 2015. Or, depuis cette date, l'ostréiculture française a subi d'énormes pertes liées à la propagation du virus OsHV-1 µvar dans les cheptels (maladie du POMS). En réponse à ces épisodes de mortalité, la sélection de masse a été mise en pratique en choisissant des huîtres sauvages qui ont réussi à survivre à un épisode de mortalité estivale sur le terrain. Ces huîtres ont été reproduites afin de créer des lignées d'huîtres plus résistantes à la maladie (Degremont, 2003). Les résultats de ce programme de sélection, qui s'est étendu sur quatre générations, ont montré des taux de survie accrus respectivement de 22%, 44%, 50% et 62% (Dégremont et al., 2015). La base génétique de la résistance au POMS a été largement exploitée en France par les producteurs de naissains, et il est vraisemblable qu'elle a modifié le fond génétique des huîtres présentes sur nos côtes. Sur la base des phénotypes de résistance des populations naturelles d'huître, Gwara et al. ont émis l'hypothèse d'un réel brassage génétique entre les huîtres d'élevages sélectionnées et les populations naturelles de *C. gigas* (Gawra, 2022). On peut donc envisager que cette sélection intensive et massive d'huîtres résistantes au virus OsHV-1 µVar pour pallier aux mortalités causées

par la maladie du POMS, ait induit un biais génétique visible pour les Big défensines en populations naturelles.

Pour nos travaux sur le phénomène du PAV, nous avons utilisé les données générées lors de la thèse de Janan Gawra en 2022 (sous l'encadrement de J. Vidal-Dupiol) qui observe que les populations naturelles d'huîtres provenant de zones d'élevage sont plus résistantes que les huîtres provenant de zones d'élevages éloignées. Toutefois, nos résultats de génotypage sur ces populations d'huîtres n'ont permis de montrer aucune corrélation entre certains profils de *Cg*-BigDefs et la capacité à résister à la maladie du POMS. Ceci suggère que les Big défensines de *C. gigas* ne joue pas à elles seules le rôle clé que nous avions suspecté dans le contrôle du microbiote des huîtres lors de l'expression du POMS (de Lorgeril et al., 2018). En outre, il apparait peu probable que les profils de *Cg*-BigDefs aient changé sous l'influence de la maladie. Pour tester cela nous proposons d'étudier ce phénomène de PAV des Big défensines au niveau mondial et surtout chez des huîtres présentent dans des régions non impactées par le POMS comme par exemple, le Brésil. En effet, au Brésil, toutes les huîtres cultivées proviennent exclusivement d'écloseries et sont issues du même pool génétique depuis plusieurs années. Par conséquent, décrire le profil des Big défensines chez ces huîtres pourrait permettre d'établir un lien entre leur sensibilité au syndrome du POMS, la présence des Big défensines et la dysbiose induite par OsHV-1 µvar.

Spécificité et mécanismes d'action

L'étude *in vitro* de l'activité antibactérienne des Big défensines sur le microbiote de *C. gigas*, menée au cours de cette thèse, a démontré une spécificité de l'activité antibactérienne au niveau des souches appartenant à un même genre, par exemple les deux souches testées du genre *Marinomonas*. En outre, lors de l'étude de l'interaction entre *S. aureus* et *Cg*-BigDef1, on a observé qu'une mutation d'un seul gène avait eu fort un impact sur l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1. Ainsi, la mutation du gène *tagO* dans la souche *S. aureus* SA113 a induit une résistance à *Cg*-BigDef1, tandis que la mutation de *dltA* rend la souche plus susceptible à l'action de *Cg*-BigDef1. Ceci suggère qu'il pourrait exister des cibles moléculaires fines chez les bactéries qui sont reconnues par *Cg*-BigDef1.

Une étape clé du mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1 sur les souches *S. aureus* SG511 et SA113 est la formation de nanonets, des assemblages peptidtiques supramoléculaires similaires à ceux que forme la défensine humaine HBD-6 (Chairatana & Nolan, 2017), qui piège les bactéries, mais contrairement à celle-ci, *Cg*-BigDef1 présente une action bactéricide. Cependant, la formation de ces nanonets n'est observée qu'à des concentrations élevées de *Cg*-BigDef1 (10 µM et 5 µM) or *Cg*-BigDef1 est

bactéricide sur *S. aureus* SA113 à 1,25 µM. De plus, lors des tests antibactériens réalisés *in vitro,* il a été observé que *Cg*-BigDef1 présentait une activité bactéricide sur certaines souches du microbiote de *C. gigas* à 10 µM sans former de nanonets visibles au microscope à lumière blanche (de San Nicolas N., données non publiées). Ensemble, ces données suggèrent que les activités des *Cg*-BigDefs contre la diversité des bactéries et leur spécificité peuvent être attribuées à différents mécanismes d'action.

En outre, l'article 1 a révélé que les spectres de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 étaient complémentaires. Ce qui amène comme question : comment expliquer cette spécificité et cette synergie ? Est-ce que les deux variants reconnaissent différentes cibles moléculaires ? Nos observations lors des tests antibactériens indiquent que, tout comme *Cg*-BigDef1, *Cg*-BigDef5 est capable de former des nanonets visibles à une concentration de 10 µM (de San Nicolas N., données non publiées). Toutefois, au cours de ma thèse, nous n'avons pas exploré le mécanisme d'action de *Cg*-BigDef5. Seul le mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1 a été exploré. Il serait intéressant d'examiner les interactions d'autres Big défensines avec *S. aureus* en utilisant la microscopie à super résolution SIM. Nous avons prouvé que cette méthode était efficace pour étudier ce type d'interaction. Une limitation potentielle est la synthèse de peptides ainsi que la modification avec un groupement azoture pour permettre la chimie click. Il conviendrait également d'étudier les interactions avec les bactéries à Gram négatif qui feront très vraisemblablement intervenir des déterminants moléculaires d'autre nature.

L'étude par RMN de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 a permis de caractériser leur structure tridimensionnelle. Malgré une similarité de séquence au niveau protéique de 62,8% et des caractéristiques bio-physiques similaires en termes de taille et de charge nette positive, une différence majeure a été observée dans la région de liaison reliant les domaines N-terminal hydrophobe et C-terminal de type β-défensine. Cette différence entraîne une orientation différente des domaines N-terminal et C-terminal, et modifie l'exposition de certains acides aminés (Loth et al. 2019), ce qui peut suggérer des interactions potentiellement différentes en termes de mécanisme d'action. Chez les α-défensines de neutrophiles humains, la différence d'un seul acide aminé diminue fortement l'activité du peptide HNP-3 contre la levure *Candida* par comparaison à celle de HNP-1 et HNP-2 (J. J. Schneider et al., 2005). De plus, la diversité des structures des β-défensine humaines leurs confère des mécanismes d'actions différents, par exemple, HBD-2 perméabilise la membrane en formant des pores (Makarenko et al., 2019) alors que HBD-3 va se lier au lipide II de la paroi bactérienne (Dhople et al., 2006). Par ailleurs, bien que la charge de surface ne diffère pas entre les deux *Cg*-BigDefs, il est possible que l'hydrophobicité de la surface du peptide joue un rôle important dans leur interaction avec les bactéries. Ces observations indiquent la présence de déterminants

structurels spécifiques qui pourraient être impliqués dans la spécificité des *Cg*-BigDefs ainsi que leurs mécanismes d'action, mais leur identification précise nécessite des investigations supplémentaires.

Les acides téichoïques de *S. aureus* sont des cibles moléculaires potentielles de *Cg*-BigDef1.

Rôle des acides téichoïques

Les PAMs qui agissent sur les membranes sont généralement actifs à des concentrations micromolaires (Turner et al., 1998). C'est le plus souvent le cas pour *Cg*-BigDef1 et 5 ; néanmoins elles peuvent parfois être actives à des concentrations nanomolaires, comme *Cg*-BigDef1 sur la souche *Bacillus* sp. 15.5814, isolée du microbiote d'huître (article 1). Ceci est cohérent avec l'existence de récepteurs moléculaires, comme le lipide II pour les défensines Csαβ d'huître et de champignons (Schmitt, Wilmes, Pugnière, et al., 2010; T. Schneider et al., 2010). Nos résultats ont démontré que les acides teichoiques (TAs) jouent un rôle essentiel dans l'interaction de *Cg*-BigDef1 avec *S. aureus* et dans son activité antibactérienne. Cette interaction est médiée par le domaine N-terminal spécifique de cette famille de peptides. Les mutants déficients en WTA et en D-Alanylation des TAs ont montré une sensibilité différente à *Cg*-BigDef1. L'absence de WTA chez le mutant *tagO* a entraîné une diminution de la charge négative de la paroi cellulaire, tandis que l'absence de D-Alanylation des TAs chez le mutant *dltA* a augmenté la charge positive à la surface bactérienne. Cette augmentation de la charge positive est connue pour réduire l'affinité des bactéries pour les PAMs cationiques (Saar-Dover et al., 2012b). Il est important de souligner néanmoins que les interactions électrostatiques ne semblent pas jouer pas un rôle essentiel dans le mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1, comme le confirme sa stabilité à des concentrations élevées de sel.

Dans l'article 2, nous avons fréquemment observé la localisation de *Cg*-BigDef1 près du septum bactérien, une région où les LTA sont synthétisés pendant la division cellulaire (Schneewind et Missiakas, 2019), ce qui appuie l'hypothèse que les TAs dont le LTA pourraient être une cible de *Cg*-BigDef1. Par ailleurs, *Cg*-BigDef1 a été observé de manière très focalisée autour de la paroi cellulaire. Cette localisation hétérogène suggère une interaction directe avec les TAs, à partir de laquelle les nanonets pourrait s'assembler et s'étendre, piégeant ainsi les cellules voisines. Des études antérieures ont montré que l'interaction avec les TA peut déclencher la formation de nanonets chez les peptides capables de s'auto-assembler (Tram et al., 2023). De plus, nos images de microscopie de super-résolution (SIM) ont clairement démontré, par des expériences de co-localisation, que le domaine N-terminal permet la localisation du domaine C-terminal au niveau de la paroi cellulaire grâce à la formation de nanonets.

Nos résultats de l'article 2, nous amènent à supposer que *Cg*-BigDef1 peut interagir directement avec les TAs, indépendamment des charges électrostatiques. Nous avons en effet observé l'inhibition de l'activité de *Cg*-BigDef1 par du LTA D-Alanylé ajouté de manière exogène, ce qui suggère que le LTA se lie de manière compétitive à *Cg*-BigDef1 et empêche l'interaction avec sa (ses) cible(s) cellulaire(s).

Pour vérifier cela, nous proposons de traiter les parois cellulaires avec de l'acide fluorhydrique, pour éliminer les TAs de la paroi cellulaire comme l'ont démontré Sieradzki et Tomasz sur une souche résistante de *S. aureus* à la vancomycine (Sieradzki & Tomasz, 1997). Ou encore, de suivre l'interaction entre *Cg*-BigDef1 et un mutant dépourvu de LTA, résultant d'une mutation dans le gène *lstA*, qui est responsable de l'initiation de la biosynthèse du LTA et un double mutant *lstA* et *tagO*, dépourvu de tout TAs pour confirmer le rôle essentiel des TAs dans l'interaction et l'activité de *Cg*-BigDef1. De plus, il serait aussi intéressant d'observer si, comme la vancomycine, *Cg*-BigDef1 se lie à la D-Alanine (Peschel et al., 2000). Si la reconnaissance de *Cg*-BigDef1 par les acides téichoïques est déterminante, on peut aussi s'attendre à ce que les modifications de l'enveloppe bactérienne qui les masquent (par exemple des capsules) confèrent une résistance à *Cg*-BigDef1. Les travaux actuels d'Albane Jouault et Lhousseine Touqui (Institut Pasteur) qui testent l'évolution expérimentale de la résistance à *Cg*-BigDef1 tendent à la confirmer.

Rôle des autolysines ?

Nos expériences ont montré que *S. aureus* SA113 traité avec 1.25 µM *Cg*-BigDef1 perd sa cultivabilité en 2 h alors même qu'aucun effet membranaire n'est mesurable. Par contre l'exposition prolongée à *Cg*-BigDef1 permet de visualiser des dégâts membranaires. Ceux-ci semblent donc se produire dans un second temps et ne pas résulter de l'action directe du peptide sur la membrane de *S. aureus*. Il convient de rappeler ici que les TAs jouent un rôle dans le contrôle de l'autolyse bactérienne chez certaines espèces bactériennes à Gram-positif, en déterminant le nombre de sites de liaison disponibles pour les autolysines cationiques (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014; Neuhaus & Baddiley, 2003; Schlag et al., 2010). De plus, des études antérieures ont suggéré que le degré de D-Alanylation des TAs pouvait également réguler l'autolyse (Steen et al., 2005). A la vue de nos résultats, on peut émettre l'hypothèse que l'interaction de *Cg*-BigDef1 avec les TAs de la paroi cellulaire peut provoquer une activation locale des autolysines, qui sont responsables de la dégradation du peptidoglycane (Flores-Kim et al., 2019). Il est ainsi probable qu'une activation des autolysines devient visible lors de l'exposition prolongée à *Cg*-BigDef1, entraînant ainsi une perte d'intégrité de la paroi cellulaire et une lyse cellulaire subséquente (Yamada et al., 1996b). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'interaction de *Cg*-BigDef1 avec un mutant dépourvu d'autolysine. Pour confirmer l'hypothèse d'une activation des autolysines dans nos études, nous proposons de tester l'activité de dégradation du peptidoglycane chez *S. aureus* traités par *Cg*-BigDef1 comme décrit précédemment par (Kristian et al., 2005).

Mécanismes d'action au-delà des bactéries à Gram positif

Des études futures visant à approfondir notre compréhension des mécanismes d'action des *Cg*-BigDefs et à évaluer leur efficacité contre différents types de bactéries seront nécessaires pour comprendre leur diversité fonctionnelle et tester leur potentiel thérapeutique. Par exemple mener une approche à l'échelle moléculaire en recherchant les potentiels cibles des Big défensines par le criblage d'une banque de mutants de *S. aureus* (ou d'autres espèces) et ainsi confirmer ou non le rôle de cible des TAs, et de manière rapide aussi tester l'ensemble des variants de Big défensines dont la synthèse chimique est possible pour observer si les cibles sont des motifs conservés.

Cg-BigDef1 est active à la fois sur des bactéries à Gram positif comme *S. aureus* mais aussi sur des bactéries à Gram négatif comme celles que nous avons isolées du microbiote de l'huître. Or, les bactéries à Gram négatif représentent la majorité des bactéries présentes en milieu marin et au sein du microbiote de l'huître. Cependant les bactéries à Gram négatif sont dépourvues de TAs, il serait donc intéressant, d'étudier par les mêmes techniques employées lors de cette thèse une bactérie à Gram négatif. Il est donc fort probable que les Big défensines possèdent plusieurs cibles moléculaires permettant d'étendre leur spectre d'activité, et leur rôle dans la défense de l'huître mais aussi dans le contrôle de son microbiote. On pourra tester si le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram-négatif qui est un composant majeur de la membrane externe est également déterminant pour les interactions avec les Big défensines d'huître comme il l'est pour de nombreux autres PAMs (Schmitt et al. 2016). En effet, une étude a observé que la Big défensine de la limule se lie au LPS (Iwanaga et al., 1998). De plus une autre étude sur la Big défensine de l'amphioxus *Branchiostoma japonicum* (*Bj*BD) a démontré que son expression est induite suite à l'injection de LTA et de LPS (Teng et al., 2012).

En conclusion, mes travaux de thèse ont permis d'approfondir nos connaissances sur les Big défensines, une famille de peptides antimicrobiens présente chez l'huître *C. gigas.*

Grâce à la synthèse chimique de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5, ainsi qu'à la création d'une collection de bactéries cultivables provenant du microbiote de *C. gigas*, j'ai démontré que la diversification des *Cg*-BigDefs a étendu leur spectre d'activité antimicrobienne. Cette diversification se manifeste par l'action spécifique et synergique de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5. De plus, j'ai pu observer *in vivo* la capacité des *Cg*-BigDef1 à moduler finement le microbiote de l'huître en utilisant le métabarcoding 16S.

Cette thèse a aussi permis d'observer le profil de variants de *Cg*-BigDefs chez des huîtres provenant de populations naturelles ou d'élevage par la mise en place d'outils comme des couples d'amorces spécifiques pour les sept Big défensines de *C. gigas*. Nous avons démontré qu'il est difficilement possible d'invalider ces gènes par la méthode d'ARN interférence. Ensemble, ces travaux ouvrent la voie à de nouvelles études fonctionnelles de cette famille de PAMs chez *C. gigas* par le developpement d'autres techniques d'invalidation de gènes.

En explorant les cibles moléculaires de *Cg*-BigDef1 chez *S. aureus* à l'aide de méthodes novatrices telles que la chimie click, la microscopie à haute résolution et l'utilisation de mutants isogéniques, nous avons pu mettre en évidence que les acides teichoïques, des polymères clés de la paroi cellulaire de *S. aureus*, jouent un rôle crucial dans l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1. L'interaction entre *Cg*-BigDef1 et les acides teichoïques implique le domaine N-terminal de *Cg*-BigDef1, qui rapproche le domaine C-terminal de la paroi bactérienne. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires pour décrire le mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1.

Mes travaux de thèse contribuent ainsi à l'avancement des connaissances dans le domaine des Big défensines et ouvrent la voie à de futures recherches visant à exploiter pleinement le potentiel de ces peptides dans la lutte contre les infections microbiennes chez l'huître et éventuellement dans d'autres domaines d'application.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ansari, I., Raddatz, G., Gutekunst, J., Ridnik, M., Cohen, D., Abu-Remaileh, M., Tuganbaev, T., Shapiro, H., Pikarsky, E., Elinav, E., Lyko, F., & Bergman, Y. (2020). The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nature Microbiology*, *5*(4), 610-619. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0659-3

Armstrong, P. B. (2006). Proteases and protease inhibitors : A balance of activities in host–pathogen interaction. *Immunobiology*, *211*(4), 263-281. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.01.002

Armstrong, P. B., & Quigley, J. P. (1999). α 2 -macroglobulin : An evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Developmental & Comparative Immunology*, *23*(4-5), 375-390. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00018-X

Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., & Gérard, A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic Crassostrea gigas adults. *Virus Research*, *84*(1-2), 151-160. https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00007-2

Augustin, R., Schröder, K., Murillo Rincón, A. P., Fraune, S., Anton-Erxleben, F., Herbst, E.-M., Wittlieb, J., Schwentner, M., Grötzinger, J., Wassenaar, T. M., & Bosch, T. C. G. (2017). A secreted antibacterial neuropeptide shapes the microbiome of Hydra. *Nature Communications*, *8*(1), 698. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00625-1

Aumer, T. (2020). *Étude du mécanisme d'action d'un peptide antifongique de la famille des héliomicines pour contrôler le champignon phytopathogène Botrytis cinerea*. L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant.

Bachère, E., Rosa, R. D., Schmitt, P., Poirier, A. C., Merou, N., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2015). The new insights into the oyster antimicrobial defense : Cellular, molecular and genetic view. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(1), 50-64. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040

Baedke, J., Fábregas-Tejeda, A., & Nieves Delgado, A. (2020). The holobiont concept before Margulis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *334*(3), 149-155. https://doi.org/10.1002/jez.b.22931

Barbosa Solomieu, V., Renault, T., & Travers, M.-A. (2015). Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 2-10. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.011

Barbosa-Solomieu, V., Miossec, L., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., & Renault, T. (2004). Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *Journal of Virological Methods*, *119*(2), 65-72. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.02.007

Beliu, G., Kurz, A. J., Kuhlemann, A. C., Behringer-Pliess, L., Meub, M., Wolf, N., Seibel, J., Shi, Z.-D., Schnermann, M., Grimm, J. B., Lavis, L. D., Doose, S., & Sauer, M. (2019). Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. *Communications Biology*, *2*(1), 261. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0518-z

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., … Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited : Old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 103. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0

Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). The potter's wheel : The host's role in sculpting its microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(22), 3675-3685. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0830-3

Blaser, M. J. (2014). The microbiome revolution. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(10), 4162-4165. https://doi.org/10.1172/JCI78366

Bloch, C., & Richardson, M. (1991). A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect α-amylases from seeds or sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ-purothionins. *FEBS Letters*, *279*(1), 101-104. https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80261-Z

Blum, J. E., Fischer, C. N., Miles, J., & Handelsman, J. (2013). Frequent Replenishment Sustains the Beneficial Microbiome of Drosophila melanogaster. *MBio*, *4*(6), e00860-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00860-13

Bosch, T. C. G., & Zasloff, M. (2021). Antimicrobial Peptides—Or How Our Ancestors Learned to Control the Microbiome. *MBio*, *12*(5), e01847-21. https://doi.org/10.1128/mBio.01847-21

Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(4), 321-323. https://doi.org/10.1038/nrd2004

Britt, A., Bernini, M., McSweeney, B., Dalapati, S., Duchin, S., Cavanna, K., Santos, N., Donovan, G., O'Byrne, K., Noyes, S., Romero, M., Poonacha, K. N. T., & Scully, T. (2020). The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster : Crassostrea virginica. *Scientific Reports*, *10*(1), 11088. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67851-4

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides : Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238-250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098

Bruto, M., James, A., Petton, B., Labreuche, Y., Chenivesse, S., Alunno-Bruscia, M., Polz, M. F., & Le Roux, F. (2017). Vibrio crassostreae, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *The ISME Journal*, *11*(4), 1043-1052. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.162

Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster—From microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, *14*(12), 796-810. https://doi.org/10.1038/nri3763

Bulet, P., Cociancich, S., Reuland, M., Sauber, F., Bischoff, R., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1992). A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly Aeschna cyanea (Paleoptera, Odonata). *European Journal of Biochemistry*, *209*(3), 977-984. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17371.x

Buroker, N. (1983). *Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster Crassostrea gigas*. *23*, 271-279.

Cao, Q., Najnine, F., Han, H., Wu, B., & Cai, J. (2020). BALOs Improved Gut Microbiota Health in Postlarval Shrimp (Litopenaeus vannamei) After Being Subjected to Salinity Reduction Treatment. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1296. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01296

Capuco, A., Urits, I., Hasoon, J., Chun, R., Gerald, B., Wang, J. K., Ngo, A. L., Simopoulos, T., Kaye, A. D., Colontonio, M. M., Parker-Actlis, T. Q., Fuller, M. C., & Viswanath, O. (2020). Gut Microbiome Dysbiosis and Depression : A Comprehensive Review. *Current Pain and Headache Reports*, *24*(7), 36. https://doi.org/10.1007/s11916-020-00871-x

Chaillou, S., Chaulot-Talmon, A., Caekebeke, H., Cardinal, M., Christieans, S., Denis, C., Hélène Desmonts, M., Dousset, X., Feurer, C., Hamon, E., Joffraud, J.-J., La Carbona, S., Leroi, F., Leroy, S., Lorre, S., Macé, S., Pilet, M.-F., Prévost, H., Rivollier, M., … Champomier-Vergès, M.-C. (2015). Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal*, *9*(5), 1105-1118. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.202

Chairatana, P., & Nolan, E. M. (2014). Molecular Basis for Self-Assembly of a Human Host-Defense Peptide That Entraps Bacterial Pathogens. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(38), 13267-13276. https://doi.org/10.1021/ja5057906

Chairatana, P., & Nolan, E. M. (2017). Human α-Defensin 6 : A Small Peptide That Self-Assembles and Protects the Host by Entangling Microbes. *Accounts of Chemical Research*, *50*(4), 960-967. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00653

Chapot-Chartier, M.-P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, *13*(Suppl 1), S9. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9

Chatzidaki-Livanis, M., Geva-Zatorsky, N., & Comstock, L. E. (2016). *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(13), 3627-3632. https://doi.org/10.1073/pnas.1522510113

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaeverbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective Microbiota : From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1678. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678

Chong, P. P., Chin, V. K., Looi, C. Y., Wong, W. F., Madhavan, P., & Yong, V. C. (2019). The Microbiome and Irritable Bowel Syndrome – A Review on the Pathophysiology, Current Research and Future Therapy. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1136. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01136

Chu, H., Pazgier, M., Jung, G., Nuccio, S.-P., Castillo, P. A., de Jong, M. F., Winter, M. G., Winter, S. E., Wehkamp, J., Shen, B., Salzman, N. H., Underwood, M. A., Tsolis, R. M., Young, G. M., Lu, W., Lehrer, R. I., Baumler, A. J., & Bevins, C. L. (2012). Human -Defensin 6 Promotes Mucosal Innate Immunity Through Self-Assembled Peptide Nanonets. *Science*, *337*(6093), 477-481. https://doi.org/10.1126/science.1218831

Clerissi, C. (2020). Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 12.

Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.-M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., & Toulza, E. (2018). *Microbiota composition and evenness predict survival rate of oysters confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome* [Preprint]. Microbiology. https://doi.org/10.1101/378125

Cobo, E., & Chadee, K. (2013). Antimicrobial Human β-Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens*, *2*(1), 177-192. https://doi.org/10.3390/pathogens2010177

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J. A., & Letellier, L. (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in Micrococcus luteus. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(26), 19239-19245. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36505-6

Colwell, R. R., & Liston, J. (1960). Microbiology of Shellfish. Bacteriological Study of the Natural Flora of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied Microbiology*, *8*(2), 104-109. https://doi.org/10.1128/am.8.2.104-109.1960

Conejo-Garcia, J. R., Benencia, F., Courreges, M.-C., Kang, E., Mohamed-Hadley, A., Buckanovich, R. J., Holtz, D. O., Jenkins, A., Na, H., Zhang, L., Wagner, D. S., Katsaros, D., Caroll, R., & Coukos, G. (2004). Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature Medicine*, *10*(9), 950-958. https://doi.org/10.1038/nm1097

Conibear, A. C., & Craik, D. J. (2014). The Chemistry and Biology of Theta Defensins. *Angewandte Chemie International Edition*, *53*(40), 10612-10623. https://doi.org/10.1002/anie.201402167

Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Leonardo-Reza, M., Ochoa-Romo, J. P., & Ochoa-Leyva, A. (2018). A meta-analysis reveals the environmental and host factors shaping the structure and function of the shrimp microbiota. *PeerJ*, *6*, e5382. https://doi.org/10.7717/peerj.5382

Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, M. J., Joung, J., & Zhang, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*, *358*(6366), 1019-1027. https://doi.org/10.1126/science.aaq0180

Criscitiello, M. F., & de Figueiredo, P. (2013). Fifty Shades of Immune Defense. *PLoS Pathogens*, *9*(2), e1003110. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003110

Cullen, B. R. (2006). Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nature Methods*, *3*(9), 677-681. https://doi.org/10.1038/nmeth913

D Ainsworth, T., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., Gates, R. D., Padilla-Gamiño, J. L., Spalding, H. L., Smith, C., Woolsey, E. S., Bourne, D. G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O., & Leggat, W. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME Journal*, *9*(10), 2261-2274. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.39

Dantan, L., Toulza, E. R., Gueguen, Y., Dégremont, L., Morga, B., Vidal-Dupiol, J., Petton, B., Fleury, Y., Buffo, M. J., Maurouard, E., Allienne, J. F., Gaëlle Courtay, G., Romatif, O., Carcassonne, P., & Cosseau, C. (2022). *Protective effect of bacteria isolated from the natural microbiota of the Pacific oyster Crassostrea gigas against OsHV-1 µvar and Vibrio aestuarianus infections.* Joint Meeting ISS 10 & Holobionts 3, International Society of Symbiosis; Holobionts Conference, Jul 2022, Lyon, France. https://hal.science/hal-03971568v1

Darnell, J. E., Kerr, Ian M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science*, *264*(5164), 1415-1421. https://doi.org/10.1126/science.8197455

De Marco, A., Baldassarro, V. A., Calzà, L., Giardino, L., Dondi, F., Ferrari, M. G., Bignami, G., Parma, L., & Bonaldo, A. (2023). Prolonged heat waves reduce the condition index and alter the molecular parameters in the pacific oyster Crassostrea gigas. *Fish & Shellfish Immunology*, *133*, 108518. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108518

De Marco Castro, E., Calder, P. C., & Roche, H. M. (2021). β-1,3/1,6-Glucans and Immunity : State of the Art and Future Directions. *Molecular Nutrition & Food Research*, *65*(1), 1901071. https://doi.org/10.1002/mnfr.201901071

De San Nicolas, N., Asokan, A., Rosa, R. D., Voisin, S. N., Travers, M.-A., Rocha, G., Dantan, L., Dorant, Y., Mitta, G., Petton, B., Charrière, G. M., Escoubas, J.-M., Boulo, V., Pouzadoux, J., Meudal, H., Loth, K., Aucagne, V., Delmas, A. F., Bulet, P., … Destoumieux-Garzón, D. (2022a). Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. *Marine Drugs*, *20*(12), 745. https://doi.org/10.3390/md20120745

De San Nicolas, N., Asokan, A., Rosa, R. D., Voisin, S. N., Travers, M.-A., Rocha, G., Dantan, L., Dorant, Y., Mitta, G., Petton, B., Charrière, G. M., Escoubas, J.-M., Boulo, V., Pouzadoux, J., Meudal, H., Loth, K., Aucagne, V., Delmas, A. F., Bulet, P., … Destoumieux-Garzón, D. (2022b). Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. *Marine Drugs*, *20*, 745-745. https://doi.org/10.3390/md20120745

Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nature Immunology*, *9*(12), 1425-1432. https://doi.org/10.1038/ni.1664

Defer, D., Desriac, F., Henry, J., Bourgougnon, N., Baudy-Floc'h, M., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2013). Antimicrobial peptides in oyster hemolymph : The bacterial connection. *Fish & Shellfish Immunology*, *34*(6), 1439-1447. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.357

Degremont, L. (2003). *Genetic basis of summer mortality and relationship with growth in juvenile Pacific cupped oysters Crassostrea gigas.*

Dégremont, L., Azéma, P., Maurouard, E., & Travers, M.-A. (2020). Enhancing resistance to Vibrio aestuarianus in Crassostrea gigas by selection. *Aquaculture*, *526*, 735429. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735429

Dégremont, L., Morga, B., Maurouard, E., & Travers, M.-A. (2021). Susceptibility variation to the main pathogens of Crassostrea gigas at the larval, spat and juvenile stages using unselected and selected oysters to OsHV-1 and/or V. aestuarianus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *183*, 107601. https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107601

Dégremont, L., Nourry, M., & Maurouard, E. (2015). 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. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.04.029

de Leeuw, E., Li, C., Zeng, P., Li, C., Buin, M. D., Lu, W.-Y., Breukink, E., & Lu, W. (2010). Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Letters*, *584*(8), 1543-1548. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G. M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., … Mitta, G. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature Communications*, *9*(1), 4215. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3

Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., Libby, S. J., Fang, F. C., & Raffatellu, M. (2013). Probiotic Bacteria Reduce Salmonella Typhimurium Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host & Microbe*, *14*(1), 26-37. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.007

Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnière, M., Got, P., Destoumieux-Garzón, D., & Fleury, Y. (2020). Alterins Produced by Oyster-Associated Pseudoalteromonas Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. *Marine Drugs*, *18*(12), 630. https://doi.org/10.3390/md18120630

Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., & Fleury, Y. (2014). Exploring the hologenome concept in marine bivalvia : Haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. *FEMS Microbiology Letters*, *350*(1), 107-116. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12308

Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., & Bachère, E. (1997). Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp Penaeus vannamei (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28398-28406. https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28398

Destoumieux-Garzón, D., Canesi, L., Oyanedel, D., Travers, M., Charrière, G. M., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2020). *Vibrio* -bivalve interactions in health and disease. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.15055. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15055

Dhople, V., Krukemeyer, A., & Ramamoorthy, A. (2006). The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1758*(9), 1499-1512. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.007

Dietrich, A., Steffens, U., Sass, P., & Bierbaum, G. (2021). The hypersusceptible antibiotic screening strain Staphylococcus aureus SG511-Berlin harbors multiple mutations in regulatory genes. *International Journal of Medical Microbiology*, *311*(8), 151545. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151545

Dingle, T. C., & Butler-Wu, S. M. (2013). MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clinics in Laboratory Medicine*, *33*(3), 589-609. https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.03.001

Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A. K., & Soudant, P. (2012). Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster Crassostrea gigas : A Mitochondrial Involvement. *PLoS ONE*, *7*(10), e46594. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046594

Dungan, C. F., & Elston, R. A. (1988). Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, Crassostrea gigas. *Aquaculture*, *72*(1-2), 1-14. https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90141-X

Dungan, C. F., Elston, R. A., & Schiewe, M. H. (1989). Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured juvenile Pacific oysters (Crassostrea gigas) by cytophaga-like bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(5), 1128-1135. https://doi.org/10.1128/aem.55.5.1128-1135.1989

Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2011). Use

of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(7), 2993-2998. https://doi.org/10.1073/pnas.1015326108

Dupont, S., Lokmer, A., Corre, E., Auguet, J.-C., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Tanguy, G., Pecqueur, D., Salmeron, C., Guillou, L., Desnues, C., La Scola, B., Bou Khalil, J., de Lorgeril, J., Mitta, G., Gueguen, Y., & Escoubas, J.-M. (2020). Oyster hemolymph is a complex and dynamic ecosystem hosting bacteria, protists and viruses. *Animal Microbiome*, *2*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s42523-020-00032-w

Ellerton, H. D., Ellerton, N. F., & Robinson, H. A. (1983). Hemocyanin—A current perspective. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *41*, 143-247. https://doi.org/10.1016/0079-6107(83)90028-7

Elston, R., Hasegawa, H., Humphrey, K., Polyak, I., & Häse, C. (2008). Re-emergence of Vibrio tubiashii in bivalve shellfish aquaculture : Severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of Aquatic Organisms*, *82*, 119-134. https://doi.org/10.3354/dao01982

Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W., & Lehrer, R. I. (2005). Antibacterial Activity and Specificity of the Six Human α-Defensins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(1), 269-275. https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.269-275.2005

Escoubas, J.-M., Briant, L., Montagnani, C., Hez, S., Devaux, C., & Roch, P. (1999). Oyster IKK-like protein shares structural and functional properties with its mammalian homologues. *FEBS Letters*, *453*(3), 293-298. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00737-1

Escoubas, J.-M., Gourbal, B., Duval, D., Green, T. J., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzón, D., & Montagnani, C. (2016). Immunity in Molluscs. In *Encyclopedia of Immunobiology* (p. 417-436). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12004-1

Eswaramoorthy, P., Erb, M. L., Gregory, J. A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., & Ramamurthi, K. S. (2011). Cellular Architecture Mediates DivIVA Ultrastructure and Regulates Min Activity in Bacillus subtilis. *MBio*, *2*(6), e00257-11. https://doi.org/10.1128/mBio.00257-11

Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., & Huvet, A. (2009). *In vivo* RNA interference in oyster—*Vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, *276*(9), 2566-2573. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x

Fallet, M., Montagnani, C., Petton, B., Dantan, L., de Lorgeril, J., Comarmond, S., Chaparro, C., Toulza, E., Boitard, S., Escoubas, J.-M., Vergnes, A., Le Grand, J., Bulla, I., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., Grunau, C., Mitta, G., & Cosseau, C. (2022). Early life microbial exposures shape the Crassostrea gigas immune system for lifelong and intergenerational disease protection. *Microbiome*, *10*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5

FAO. (s. d.). https://www.fao.org/fishery/en/collection/aquaculture?lang=en

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(52), 33159-33163. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)30111-3

Figueiredo, A. R. T., & Kramer, J. (2020). Cooperation and Conflict Within the Microbiota and Their Effects On Animal Hosts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*, 132. https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00132

Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., & Huvet, A. (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*(3), 326-339. https://doi.org/10.1007/s10126-009-9227-9

Flores Higuera, F., Luis Villasenor, I., Rochin Arenas, J., Gomez Gil, B., Mazon Suastegui, J., Voltolina, D., & Medina Hernandez, D. (2019). Effect of pH on the bacterial community present in larvae and spat of Crassostrea gigas. *Latin American Journal of Aquatic Research*, *47*(3), 513-523. https://doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-13

Flores-Kim, J., Dobihal, G. S., Fenton, A., Rudner, D. Z., & Bernhardt, T. G. (2019). A switch in surface polymer biogenesis triggers growth-phase-dependent and antibiotic-induced bacteriolysis. *ELife*, *8*, e44912. https://doi.org/10.7554/eLife.44912

Franzenburg, S., Walter, J., Kunzel, S., Wang, J., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., & Fraune, S. (2013). Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(39), E3730-E3738. https://doi.org/10.1073/pnas.1304960110

Fraune, S., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Wittlieb, J., Gelhaus, C., Klimovich, V. B., Samoilovich, M. P., & Bosch, T. C. G. (2010). In an early branching metazoan, bacterial colonization of the embryo is

controlled by maternal antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(42), 18067-18072. https://doi.org/10.1073/pnas.1008573107

Fricker, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. *Journal of Advanced Research*, *19*, 105-112. https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006

Friedman, C. S., Beaman, B. L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A., & Hedrick, R. P. (1998). Nocardia crassostreae sp. Nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*(1), 237-246. https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-237

Fruitwala, S., El-Naccache, D. W., & Chang, T. L. (2019). Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *88*, 163-172. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.023

Ganz, T. (2003). Defensins : Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *3*(9), 710-720. https://doi.org/10.1038/nri1180

Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., & Lehrer, R. I. (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, *76*(4), 1427-1435. https://doi.org/10.1172/JCI112120

Gao, X., Ding, J., Liao, C., Xu, J., Liu, X., & Lu, W. (2021). Defensins : The natural peptide antibiotic. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *179*, 114008. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114008

Garnier, M., Labreuche, Y., & Nicolas, J.-L. (2008). Molecular and phenotypic characterization of Vibrio aestuarianus subsp. Francensis subsp. Nov., a pathogen of the oyster Crassostrea gigas. *Systematic and Applied Microbiology*, *31*(5), 358-365. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.003

Gawra, J. (2022). *Determinants and relative weight of genetic and epigenetic variation in the resistance of the oyster Crassostrea gigas to the Pacific Oyster Mortality Syndrome*. UPVD - Université de Perpignan via domitia.

Gawra, J., Valdivieso, A., Roux, F., Laporte, M., De Lorgeril, J., Gueguen, Y., Saccas, M., Escoubas, J.-M., Montagnani, C., Destoumieux-Garzón, D., Lagarde, F., Leroy, M. A., Haffner, P., Petton, B., Cosseau, C., Morga, B., Dégremont, L., Mitta, G., Grunau, C., & Vidal-Dupiol, J. (2023). *Epigenetic then genetic variations underpin rapid adaptation of oyster populations (* Crassostrea gigas *) to Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS)* [Preprint]. Evolutionary Biology. https://doi.org/10.1101/2023.03.09.531494

Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., & Phelipot, L. E. P. (1995). *Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. Relations « reproduction » et « génétique »*. 13.

Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., & Pallavicini, A. (2012). Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis. *Developmental and Comparative Immunology*, *36*(2), 390-399. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.08.003

Gerdol, M., Schmitt, P., Venier, P., Rocha, G., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2020a). Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. *Frontiers in Immunology*, *11*, 758. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758

Gerdol, M., Schmitt, P., Venier, P., Rocha, G., Rosa, R. D., & Destoumieux-Garzón, D. (2020b). Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. *Frontiers in Immunology*, *11*(April), 1-16. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758

Gómez-Chiarri, M., Warren, W. C., Guo, X., & Proestou, D. (2015). Developing tools for the study of molluscan immunity : The sequencing of the genome of the eastern oyster, Crassostrea virginica. *Fish & Shellfish Immunology*, *46*(1), 2-4. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.004

Gong, N., Yang, H., Zhang, G., Landau, B. J., & Guo, X. (2004). Chromosome inheritance in triploid Pacific oyster Crassostrea gigas Thunberg. *Heredity*, *93*(5), 408-415. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800517

Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B., & Bachère, E. (2007). Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster Crassostrea gigas. *Developmental & Comparative Immunology*, *31*(4), 332-339. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.006

Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugniere, M., Roquet, F., Escoubas, J.-M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Saune, L., Bulet, P., & Bachere, E. (2007). Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the Crassostrea gigas Cg-BPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(45), 17759-17764. https://doi.org/10.1073/pnas.0702281104

Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., & Bachère, E. (2005). Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(2), 1089-1097. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.075

González, R., Gonçalves, A. T., Rojas, R., Brokordt, K., Rosa, R. D., & Schmitt, P. (2020). Host Defense Effectors Expressed by Hemocytes Shape the Bacterial Microbiota From the Scallop Hemolymph. *Frontiers in Immunology*, *11*, 599625. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599625

Goulet, T. L., Erill, I., Ascunce, M. S., Finley, S. J., & Javan, G. T. (2020). Conceptualization of the Holobiont Paradigm as It Pertains to Corals. *Frontiers in Physiology*, *11*, 566968. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.566968

Gounder, A. P., Wiens, M. E., Wilson, S. S., Lu, W., & Smith, J. G. (2012). Critical Determinants of Human α-Defensin 5 Activity against Non-enveloped Viruses. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(29), 24554-24562. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354068

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G. J. M., Van Der Meer, J. W. M., Conrath, U., & Netea, M. G. (2018). Innate immune memory : An evolutionary perspective. *Immunological Reviews*, *283*(1), 21-40. https://doi.org/10.1111/imr.12647

Green, T. J., & Montagnani, C. (2013). Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 µvar). *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(2), 382-388. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051

Green, T. J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N., & Speck, P. (2014). Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Fish & Shellfish Immunology*, *36*(1), 151-157. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.026

Green, T. J., Raftos, D., Speck, P., & Montagnani, C. (2015). Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology*, *96*(9), 2471-2482. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000244

Green, T. J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O'Connor, W., & Speck, P. (2014). Evidence that the major hemolymph protein of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, has antiviral activity against herpesviruses. *Antiviral Research*, *110*, 168-174. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.010

Green, T. J., Vergnes, A., Montagnani, C., & de Lorgeril, J. (2016). Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (Crassostrea gigas) to viral and bacterial infections. *Veterinary Research*, *47*(1), 72. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0356-7

Green, T., & Speck, P. (2018). Antiviral Defense and Innate Immune Memory in the Oyster. *Viruses*, *10*(3), 133. https://doi.org/10.3390/v10030133

Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.-G., Franck, V., Philippe, B., & Evelyne, B. (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology*, *46*(4), 516-522. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.021

Gueguen, Y., Cadoret, J.-P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.-L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachère, E., & Escoubas, J.-M. (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, Crassostrea gigas. *Gene*, *303*, 139-145. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01149-6

Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.-M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P., & Bachère, E. (2006). Characterization of a Defensin from the Oyster Crassostrea gigas. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(1), 313-323. https://doi.org/10.1074/jbc.M510850200

Gupta, P., Lackman-Smith, C., Snyder, B., Ratner, D., Rohan, L. C., Patton, D., Ramratnam, B., & Cole, A. M. (2013). Antiviral Activity of Retrocyclin RC-101, a Candidate Microbicide Against Cell-Associated HIV-1. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *29*(2), 391-396. https://doi.org/10.1089/aid.2012.0135

Hancock, R. E. W., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(16), 8856-8861. https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856

Hanson, M. A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., & Lemaitre, B. (2019). Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach. *ELife*, *8*, e44341. https://doi.org/10.7554/eLife.44341

Harusato, A., & Chassaing, B. (2018). Insights on the impact of diet-mediated microbiota alterations on immunity and diseases. *American Journal of Transplantation*, *18*(3), 550-555. https://doi.org/10.1111/ajt.14477

Hazrati, E., Galen, B., Lu, W., Wang, W., Ouyang, Y., Keller, M. J., Lehrer, R. I., & Herold, B. C. (2006). Human α- and β-Defensins Block Multiple Steps in Herpes Simplex Virus Infection. *The Journal of Immunology*, *177*(12), 8658-8666. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8658

Heintzmann, R., & Huser, T. (2017). Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. *Chemical Reviews*, *117*(23), 13890-13908. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00218

Hernandez-Zarate, G., & Olmos-Soto, J. (2006). Identification of bacterial diversity in the oyster Crassostrea gigas by fluorescent in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(4), 664-672. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02800.x

Hilchie, A. L., Wuerth, K., & Hancock, R. E. W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology*, *9*(12), 761-768. https://doi.org/10.1038/nchembio.1393

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., & Ezekowitz, R. A. B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, *284*(5418), 1313-1318. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313

Honda, K., & Littman, D. R. (2016). The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, *535*(7610), 75-84. https://doi.org/10.1038/nature18848

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, *336*(6086), 1268-1273. https://doi.org/10.1126/science.1223490

Huang, B., Zhang, L., Du, Y., Xu, F., Li, L., & Zhang, G. (2017). Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates. *Scientific Reports*, *7*(1), 8217. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08566-x

Huang, B., Zhang, L., Li, L., Tang, X., & Zhang, G. (2015). Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Fish & Shellfish Immunology*, *43*(2), 485-490. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.021

Hughes, A. L. (1999). Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *56*(1-2), 94-103. https://doi.org/10.1007/s000180050010

Hwang, P. M., & Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, *76*(2-3), 235-246. https://doi.org/10.1139/o98-026

Itoh, N., & Takahashi, K. G. (2007). CDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, *148*(2), 160-166. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.05.005

Itoh, N., & Takahashi, K. G. (2008). Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *150*(4), 409-417. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.04.011

Iwanaga, S., Kawabata, S., & Muta, T. (1998). New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph : Their structures and functions. *Journal of Biochemistry*, *123*(1), 1-15. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021894

Jeang, K.-T. (2012). RNAi in the regulation of mammalian viral infections. *BMC Biology*, *10*(1), 58. https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-58

Jee, B. Y., Kim, M. S., Cho, M. Y., Lee, S. J., Park, M. A., Kim, J. W., Choi, S. H., Jeong, H. D., & Kim, K. H. (2014). Simultaneous and Systemic Knock-down of Big Defensin 1 and 2 gene Expression in the Pacific Oyster Crassostrea gigas using Long Double-stranded RNA-mediated RNA Interference. *Fisheries and Aquatic Sciences*, *17*(3), 377-380. https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0377

Jemaà, M., Morin, N., Cavelier, P., Cau, J., Strub, J.-M., & Delsert, C. (2014). Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster. *Journal of Experimental Biology*, jeb.106575. https://doi.org/10.1242/jeb.106575

Jensen, C., Li, H., Vestergaard, M., Dalsgaard, A., Frees, D., & Leisner, J. J. (2020). Nisin Damages the Septal Membrane and Triggers DNA Condensation in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1007. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01007

Jia, X., Guo, J., Yuan, W., Sun, L., Liu, Y., Zhou, M., Xiao, G., Lu, W., Garzino-Demo, A., & Wang, W. (2021). Mechanism through Which Retrocyclin Targets Flavivirus Multiplication. *Journal of Virology*, *95*(15), e00560-21. https://doi.org/10.1128/JVI.00560-21

Jiménez-Padilla, Y., Esan, E. O., Floate, K. D., & Sinclair, B. J. (2020). Persistence of diet effects on the microbiota of *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae). *The Canadian Entomologist*, *152*(4), 516-531. https://doi.org/10.4039/tce.2020.37

Jin, Y., Qiao, X., Lv, X., Wang, W., Wang, S., Gao, Y., Wang, L., & Song, L. (2023). A conserved RNAi molecule Ago2 involved in antiviral immunity of oyster Crassostrea gigas. *Developmental and Comparative Immunology*, *142*, 104668. https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104668

Jing, W., Hunter, H. N., Tanabe, H., Ouellette, A. J., & Vogel, H. J. (2004). Solution Structure of Cryptdin-4, a Mouse Paneth Cell α-Defensin′. *Biochemistry*, *43*(50), 15759-15766. https://doi.org/10.1021/bi048645p

Jung, S., Dingley, A. J., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Stanisak, M., Gelhaus, C., Gutsmann, T., Hammer, M. U., Podschun, R., Bonvin, A. M. J. J., Leippe, M., Bosch, T. C. G., & Grötzinger, J. (2009). Hydramacin-1,

Structure and Antibacterial Activity of a Protein from the Basal Metazoan Hydra. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(3), 1896-1905. https://doi.org/10.1074/jbc.M804713200
Kawabata, S., Saito, T., Saeki, K., Okino, N., Mizutani, A., Toh, Y., & Iwanaga, S. (1997). CDNA cloning, tissue distribution, and subcellular localization of horseshoe crab big defensin. *Biological Chemistry*, *378*(3-4), 289-292. https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.3-4.289
Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, *13*(5), 816-825. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850
Keith, S. A., Bishop, C., Fallacaro, S., & McCartney, B. M. (2021). Arc1 and the microbiota together modulate growth and metabolic traits in *Drosophila*. *Development*, *148*(15), dev195222. https://doi.org/10.1242/dev.195222
Kim, Y. H., Kim, B. Y., Choi, Y. S., Lee, K. S., & Jin, B. R. (2023). Ingestion of heat-killed pathogens confers transgenerational immunity to the pathogens via the vitellogenin–hypopharyngeal gland axis in honeybees. *Developmental & Comparative Immunology*, *144*, 104709. https://doi.org/10.1016/j.dci.2023.104709
King, G. M., Judd, C., Kuske, C. R., & Smith, C. (2012). Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (Crassostrea virginica) from Coastal Louisiana, USA. *PLoS ONE*, *7*(12), e51475. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051475
King, W. L., Jenkins, C., Go, J., Siboni, N., Seymour, J. R., & Labbate, M. (2019). Characterisation of the Pacific Oyster Microbiome During a Summer Mortality Event. *Microbial Ecology*, *77*(2), 502-512. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1226-9
King, W. L., Jenkins, C., Seymour, J. R., & Labbate, M. (2019). Oyster disease in a changing environment : Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment. *Marine Environmental Research*, *143*, 124-140. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007
Klüver, E., Schulz-Maronde, S., Scheid, S., Meyer, B., Forssmann, W.-G., & Adermann, K. (2005). Structure−Activity Relation of Human β-Defensin 3 : Influence of Disulfide Bonds and Cysteine Substitution on Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Biochemistry*, *44*(28), 9804-9816. https://doi.org/10.1021/bi050272k
Kohlgraf, K. G., Pingel, L. C., Dietrich, D. E., & Brogden, K. A. (2010). Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants. *Future Microbiology*, *5*(1), 99-113. https://doi.org/10.2217/fmb.09.104
Koprivnjak, T., Weidenmaier, C., Peschel, A., & Weiss, J. P. (2008). Wall Teichoic Acid Deficiency in *Staphylococcus aureus* Confers Selective Resistance to Mammalian Group IIA Phospholipase A_2 and Human β-Defensin 3. *Infection and Immunity*, *76*(5), 2169-2176. https://doi.org/10.1128/IAI.01705-07
Kostic, A. D., Howitt, M. R., & Garrett, W. S. (2013). Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. *Genes & Development*, *27*(7), 701-718. https://doi.org/10.1101/gad.212522.112
Kovaleva, V., Bukhteeva, I., Kit, O. Y., & Nesmelova, I. V. (2020). Plant Defensins from a Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5307. https://doi.org/10.3390/ijms21155307
Koyano, Y., Okajima, K., Mihara, M., & Yamamoto, H. (2023). Visualization of Wall Teichoic Acid Decoration in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *205*(4), e00066-23. https://doi.org/10.1128/jb.00066-23
Krautkramer, K. A., Kreznar, J. H., Romano, K. A., Vivas, E. I., Barrett-Wilt, G. A., Rabaglia, M. E., Keller, M. P., Attie, A. D., Rey, F. E., & Denu, J. M. (2016). Diet-Microbiota Interactions Mediate Global Epigenetic Programming in Multiple Host Tissues. *Molecular Cell*, *64*(5), 982-992. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.025
Kristian, S. A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R. L., & Nizet, V. (2005). D-Alanylation of Teichoic Acids Promotes Group A *Streptococcus* Antimicrobial Peptide Resistance, Neutrophil Survival, and Epithelial Cell Invasion. *Journal of Bacteriology*, *187*(19), 6719-6725. https://doi.org/10.1128/JB.187.19.6719-6725.2005
Kueh, C. S. W., & Chan, K. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology*, *59*(1), 41-47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01773.x
Kvennefors, E. C. E., Sampayo, E., Kerr, C., Vieira, G., Roff, G., & Barnes, A. C. (2012). Regulation of Bacterial Communities Through Antimicrobial Activity by the Coral Holobiont. *Microbial Ecology*, *63*(3), 605-618. https://doi.org/10.1007/s00248-011-9946-0
Lafont, M. (2017). *Mécanismes et spécificité du priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l'huitre creuse Crassostrea gigas*.
Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pauletto, M., Segarra, A., Gourbal, B., & Montagnani, C. (2017). Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Scientific Reports*, *7*(1), 13143. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13564-0

Lafont, M., Vergnes, A., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Haffner, P., Petton, B., Chaparro, C., Barrachina, C., Destoumieux-Garzon, D., Mitta, G., Gourbal, B., & Montagnani, C. (2020). A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, Crassostrea gigas. *MBio*, *11*(2), e02777-19. https://doi.org/10.1128/mBio.02777-19

Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., & Paillard, C. (2003). Measurement of Crassostrea gigas hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology*, *15*(3), 225-240. https://doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00160-2

Landon, C., Vovelle, F., Sodano, P., & Pajon, A. (2000). The active site of drosomycin, a small insect antifungal protein, delineated by comparison with the modeled structure of *Rs* -AFP2, a plant antifungal protein : The antifungal active site of drosomycin. *The Journal of Peptide Research*, *56*(4), 231-238. https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00757.x

Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J. (2022). Innate immune memory in invertebrates : Concept and potential mechanisms. *Developmental & Comparative Immunology*, *127*, 104285. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104285

Lasa, A., di Cesare, A., Tassistro, G., Borello, A., Gualdi, S., Furones, D., Carrasco, N., Cheslett, D., Brechon, A., Paillard, C., Bidault, A., Pernet, F., Canesi, L., Edomi, P., Pallavicini, A., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2019). Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. *Environmental Microbiology*, *21*(12), 4548-4562. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14750

Lassudrie, M., Hégaret, H., Wikfors, G. H., & da Silva, P. M. (2020). Effects of marine harmful algal blooms on bivalve cellular immunity and infectious diseases : A review. *Developmental & Comparative Immunology*, *108*, 103660. https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103660

Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S., Ganz, T., & Selsted, M. E. (1989). Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *Journal of Clinical Investigation*, *84*(2), 553-561. https://doi.org/10.1172/JCI114198

Lehrer, R. I., Daher, K., Ganz, T., & Selsted, M. E. (1985). Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *Journal of Virology*, *54*(2), 467-472. https://doi.org/10.1128/jvi.54.2.467-472.1985

Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., & Ganz, T. (1993). Defensins : Antimicrobial and Cytotoxic Peptides of Mammalian Cells. *Annual Review of Immunology*, *11*(1), 105-128. https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.000541

Lehrer, R. I., & Lu, W. (2012). α-Defensins in human innate immunity : α-Defensins. *Immunological Reviews*, *245*(1), 84-112. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x

Lemaitre, B., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense : Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(26), 14614-14619. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14614

Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *17*(4), 219-232. https://doi.org/10.1038/nri.2017.7

Li, M., Zhu, L., Zhou, C., Sun, S., Fan, Y., & Zhuang, Z. (2012). Molecular characterization and expression of a novel big defensin (Sb-BDef1) from ark shell, Scapharca broughtonii. *Fish & Shellfish Immunology*, *33*(5), 1167-1173. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.008

Li, X., Yang, B., Shi, C., Wang, H., Yu, R., Li, Q., & Liu, S. (2022). Synergistic Interaction of Low Salinity Stress With Vibrio Infection Causes Mass Mortalities in the Oyster by Inducing Host Microflora Imbalance and Immune Dysregulation. *Frontiers in Immunology*, *13*, 859975. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.859975

Li, Y., Song, X., Wang, W., Wang, L., Yi, Q., Jiang, S., Jia, Z., Du, X., Qiu, L., & Song, L. (2017). The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster Crassostrea gigas against secondary challenge with Vibrio splendidus. *Developmental & Comparative Immunology*, *71*, 59-69. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.024

Li, Z., Nicolae, V., Akileh, R., & Liu, T. (2017). A Brief Review of Oyster-associated Microbiota. *Microbiology Research Journal International*, *20*(5), 1-14. https://doi.org/10.9734/MRJI/2017/33842

Linzmeier, R. M., & Ganz, T. (2005). Human defensin gene copy number polymorphisms : Comprehensive analysis of independent variation in α- and β-defensin regions at 8p22–p23. *Genomics*, *86*(4), 423-430. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.06.003

Liu, C., Zhang, T., Wang, L., Wang, M., Wang, W., Jia, Z., Jiang, S., & Song, L. (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 & Comparative Immunology*, *63*, 163-170. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.002

Liu, L., Chen, X., Skogerbø, G., Zhang, P., Chen, R., He, S., & Huang, D.-W. (2012). The human microbiome : A hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics*, *100*(5), 265-270. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.07.012

Lokmer, A., Goedknegt, M. A., Thieltges, D. W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J. F., & Wegner, K. M. (2016). Spatial and Temporal Dynamics of Pacific Oyster Hemolymph Microbiota across Multiple Scales. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01367

Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J. F., & Wegner, K. M. (2016). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters : Microbiota and oyster establishment. *Environmental Microbiology*, *18*(3), 970-987. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13163

Lokmer, A., & Mathias Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*, *9*(3), 670-682. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160

Loth, K., Vergnes, A., Barreto, C., Voisin, S. N., Meudal, H., Da Silva, J., Bressan, A., Belmadi, N., Bachère, E., Aucagne, V., Cazevielle, C., Marchandin, H., Rosa, R. D., Bulet, P., Touqui, L., Delmas, A. F., & Destoumieux-Garzón, D. (2019). The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets. *MBio*, *10*(5), e01821-19, /mbio/10/5/mBio.01821-19.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.01821-19

Loth, K., Vergnes, A., Barreto, C., Voisin, S. N., Meudal, H., Silva, D., Bressan, A., Bulet, P., Touqui, L., Delmas, A. F., & Destoumieux-Garzón, D. (2019). The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets Karine. *mBio*, 10:e01821-19. https://doi.org/10.1128/mBio.01821-19

Lubet, P. E. (s. d.). *Influence des facteurs externes sur la reproduction des lamellibranches*.

Lucasson, A., Luo, X., Mortaza, S., de Lorgeril, J., Toulza, E., Petton, B., Escoubas, J.-M., Clerissi, C., Dégremont, L., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Jacq, A., & Mitta, G. (2020). *A core of functionally complementary bacteria colonizes oysters in Pacific Oyster Mortality Syndrome* [Preprint]. Microbiology. https://doi.org/10.1101/2020.11.16.384644

Lund, V. A., Gangotra, H., Zhao, Z., Sutton, J. A. F., Wacnik, K., DeMeester, K., Liang, H., Santiago, C., Leimkuhler Grimes, C., Jones, S., & Foster, S. J. (2022). Coupling Novel Probes with Molecular Localization Microscopy Reveals Cell Wall Homeostatic Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chemical Biology*, *17*(12), 3298-3305. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00741

Lund, V. A., Wacnik, K., Turner, R. D., Cotterell, B. E., Walther, C. G., Fenn, S. J., Grein, F., Wollman, A. J., Leake, M. C., Olivier, N., Cadby, A., Mesnage, S., Jones, S., & Foster, S. J. (2018). Molecular coordination of Staphylococcus aureus cell division. *ELife*, *7*, e32057. https://doi.org/10.7554/eLife.32057

Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Rio, T. G. del, Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome. *Nature*, *488*(7409), 86-90. https://doi.org/10.1038/nature11237

Lv, X., Wang, W., Han, Z., Liu, S., Yang, W., Li, M., Wang, L., & Song, L. (2019). The Dicer from oyster Crassostrea gigas functions as an intracellular recognition molecule and effector in anti-viral immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, *95*, 584-594. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.10.067

Madhusudhan, N., Pausan, M. R., Halwachs, B., Durdević, M., Windisch, M., Kehrmann, J., Patra, V., Wolf, P., Boukamp, P., Moissl-Eichinger, C., Cerroni, L., Becker, J. C., & Gorkiewicz, G. (2020). Molecular Profiling of Keratinocyte Skin Tumors Links Staphylococcus aureus Overabundance and Increased Human β-Defensin-2 Expression to Growth Promotion of Squamous Cell Carcinoma. *Cancers*, *12*(3), 541. https://doi.org/10.3390/cancers12030541

Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, *25*(21), 5439-5450. https://doi.org/10.1111/mec.13862

Makarenko, M. V., Semeniuk, D. O., ESC Institute of Biology and Medicine,Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;, Starenka, I. O., ESC Institute of Biology and Medicine,Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;, Pogribna, A. P., Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv;, Sokol, I. V., Kyiv City Maternity Hospital No 5, Martinova, L. I., Institute of Postgraduate Education Institute,Bogomolets National Medical University, Kyiv Ukraine;, Govsieiev, D.

O., & Kyiv City Maternity Hospital No 5. (2019). HBD-2 interactions with erythrocyte membranes in vitro. *The Ukrainian Biochemical Journal*, *91*(1), 65-73. https://doi.org/10.15407/ubj91.01.065

Margulis, L., & Fester, R. (1991). Bellagio conference and book. Symbiosis as Source of Evolutionary Innovation : Speciation and Morphogenesis. Conference—June 25-30, 1989, Bellagio Conference Center, Italy. *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*, *11*, 93-101.

Marra, A., Hanson, M. A., Kondo, S., Erkosar, B., & Lemaitre, B. (2021). *Drosophila* Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. *MBio*, *12*(4), e00824-21. https://doi.org/10.1128/mBio.00824-21

Marteil, L. (1976). *La conchyliculture française—2° Partie—Biologie de l'huître et de la moule*.

Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J.-P., & Houssin, M. (2011). Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, Crassostrea gigas between 2008 and 2010. *Virus Research*, *160*(1-2), 25-31. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.012

Matzinger, P. (2002). The Danger Model : A Renewed Sense of Self. *Science*, *296*(5566), 301-305. https://doi.org/10.1126/science.1071059

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Nealson, K., Pierce, N. E., … Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3229-3236. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110

Meade, K. G., & O'Farrelly, C. (2019). β-Defensins : Farming the Microbiome for Homeostasis and Health. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3072. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03072

Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., & Boraschi, D. (2018). Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans : A Critical Appraisal. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1915. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915

Meng, Q., Stoyko, D., Andrews, C. M., Konstantinidou, P., Genzor, P., O, T., Elchert, A. R., Benner, L., Sobti, S., Katz, E. Y., & Haase, A. D. (2022). Functional editing of endogenous genes through rapid selection of cell pools (*Rapid generation of endogenously tagged genes in Drosophila ovarian somatic sheath cells*). *Nucleic Acids Research*, *50*(15), e90-e90. https://doi.org/10.1093/nar/gkac448

Mesnil, A., Jacquot, M., Garcia, C., Tourbiez, D., Canier, L., Bidois, A., Dégremont, L., Cheslett, D., Geary, M., Vetri, A., Roque, A., Furones, D., Garden, A., Orozova, P., Arzul, I., Sicard, M., Charrière, G. M., Destoumieux-Garzón, D., & Marie-Agnès, T. (2023). Emergence and clonal expansion of *Vibrio aestuarianus* lineages pathogenic for oystersin Europe. *Molecular Ecology*, mec.16910. https://doi.org/10.1111/mec.16910

Miani, M., Le Naour, J., Waeckel-Enée, E., Verma, S. chand, Straube, M., Emond, P., Ryffel, B., van Endert, P., Sokol, H., & Diana, J. (2018). Gut Microbiota-Stimulated Innate Lymphoid Cells Support β-Defensin 14 Expression in Pancreatic Endocrine Cells, Preventing Autoimmune Diabetes. *Cell Metabolism*, *28*(4), 557-572.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.012

Mitta, G. (2000). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels : Gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, *24*(4), 381-393. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00084-1

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., & Roch, P. (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, *112*(23), 4233-4242. https://doi.org/10.1242/jcs.112.23.4233

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., & Roch, P. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(17), 12954-12962. https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12954

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(2), 240-273. https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08

Montagnani, C., Avarre, J. C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V., & Escoubas, J. M. (2007). First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Developmental & Comparative Immunology*, *31*(1), 1-11. https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.04.002

Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J. M., & Escoubas, J. M. (2004). *Cg* -Rel, the first Rel/NF-κB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*, *561*(1-3), 75-82. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00124-3

Montagnani, C., Labreuche, Y., & Escoubas, J. M. (2008). Cg-IκB, a new member of the IκB protein family characterized in the pacific oyster Crassostrea gigas. *Developmental & Comparative Immunology*, *32*(3), 182-190. https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.06.001

Monteiro, J. M., Fernandes, P. B., Vaz, F., Pereira, A. R., Tavares, A. C., Ferreira, M. T., Pereira, P. M., Veiga, H., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Filipe, S. R., & Pinho, M. G. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nature Communications*, *6*(1), 8055. https://doi.org/10.1038/ncomms9055

Moreau, M., & Cochard, P. (2014). De la microscopie à la nanoscopie : Une révolution en résolution: Prix Nobel de Chimie 2014 : Stefan W. Hell, Eric Betzig et William E. Moerner. *médecine/sciences*, *30*(12), 1169-1176. https://doi.org/10.1051/medsci/20143012021

Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.-A., Rubinsztein, D. C., & Renault, T. (2015). Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy*, *11*(3), 516-526. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017188

Mourot, A. (2023). [The Nobel Prize in Chemistry 2022—Click chemistry and bioorthogonal chemistry]. *Medecine Sciences: M/S*, *39*(2), 184-186. https://doi.org/10.1051/medsci/2023010

Muñoz, K., Flores-Herrera, P., Gonçalves, A. T., Rojas, C., Yáñez, C., Mercado, L., Brokordt, K., & Schmitt, P. (2019). The immune response of the scallop Argopecten purpuratus is associated with changes in the host microbiota structure and diversity. *Fish & Shellfish Immunology*, *91*, 241-250. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.028

Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S. G., Sørensen, M. V., Christensen, B. E., Kjærulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M., & Kristensen, H.-H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, *437*(7061), 975-980. https://doi.org/10.1038/nature04051

Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J. A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D. J., Trinchieri, G., Segre, J. A., & Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. *Science*, *337*(6098), 1115-1119. https://doi.org/10.1126/science.1225152

Nakamura, K., Sakuragi, N., Takakuwa, A., & Ayabe, T. (2016). Paneth cell α-defensins and enteric microbiota in health and disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, *35*(2), 57-67. https://doi.org/10.12938/bmfh.2015-019

Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., O'Neill, L. A. J., & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity : A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, *352*(6284), aaf1098. https://doi.org/10.1126/science.aaf1098

Netea, M. G., Latz, E., Mills, K. H. G., & O'Neill, L. A. J. (2015). Innate immune memory : A paradigm shift in understanding host defense. *Nature Immunology*, *16*(7), 675-679. https://doi.org/10.1038/ni.3178

Neuhaus, F. C., & Baddiley, J. (2003). A Continuum of Anionic Charge : Structures and Functions of D -Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 686-723. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003

Nguyen, V. K., King, W. L., Siboni, N., Mahbub, K. R., Dove, M., O'Connor, W., Seymour, J. R., & Labbate, M. (2020). The Sydney rock oyster microbiota is influenced by location, season and genetics. *Aquaculture*, *527*, 735472. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735472

Nicolas, J. L., & Cochennec, N. (1992). Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, Crassostrea gigas. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*, *12*, 11-13.

Oguiura, N., Corrêa, P. G., Rosmino, I. L., de Souza, A. O., & Pasqualoto, K. F. M. (2021). Antimicrobial Activity of Snake β-Defensins and Derived Peptides. *Toxins*, *14*(1), 1. https://doi.org/10.3390/toxins14010001

Orlans, J., Vincent-Monegat, C., Rahioui, I., Sivignon, C., Butryn, A., Soulère, L., Zaidman-Remy, A., Orville, A. M., Heddi, A., Aller, P., & Da Silva, P. (2021). PGRP-LB : An Inside View into the Mechanism of the Amidase Reaction. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4957. https://doi.org/10.3390/ijms22094957

Ouellette, A. J. (2015). Defensins in Enteric Mucosal Immunity. In *Mucosal Immunology* (p. 271-285). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00016-1

Oyanedel, D., Lagorce, A., Bruto, M., Haffner, P., Morot, A., Dorant, Y., de La Forest Divonne, S., Delavat, F., Inguimbert, N., Montagnani, C., Morga, B., Toulza, E., Chaparro, C., Escoubas, J.-M., Labreuche, Y., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Petton, B., … Destoumieux-Garzón, D. (2023). *Cooperation and cheating orchestrate* Vibrio *assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus* [Preprint]. Microbiology. https://doi.org/10.1101/2023.02.11.528104

Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K. M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., & Arzul, I. (2022). Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology*, *73*, 225-232. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.026

Paillard, C., Le Roux, F., & Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies : Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, *17*(4), 477-498. https://doi.org/10.1051/alr:2004054

Pales Espinosa, E., Barillé, L., & Allam, B. (2007). Use of encapsulated live microalgae to investigate pre-ingestive selection in the oyster Crassostrea gigas. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *343*(1), 118-126. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.12.002

Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *88*, 107-118. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004

Parizadeh, L., Tourbiez, D., Garcia, C., Haffner, P., Dégremont, L., Le Roux, F., & Travers, M. (2018). Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by *Vibrio aestuarianus*. *Environmental Microbiology*, *20*(12), 4343-4355. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350

Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777-1789. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7

Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., Giustina, A., & Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, *61*(3), 357-371. https://doi.org/10.1007/s12020-018-1605-5

Pazgier, M., Hoover, D. M., Yang, D., Lu, W., & Lubkowski, J. (2006). Human β-defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *63*(11), 1294-1313. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5540-2

Pelegrini, P. B., Lay, F. T., Murad, A. M., Anderson, M. A., & Franco, O. L. (2008). Novel insights on the mechanism of action of α-amylase inhibitors from the plant defensin family. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *73*(3), 719-729. https://doi.org/10.1002/prot.22086

Peñaloza, C., Gutierrez, A. P., Eöry, L., Wang, S., Guo, X., Archibald, A. L., Bean, T. P., & Houston, R. D. (2021). A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *GigaScience*, *10*(3), giab020. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab020

Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., & Götz, F. (1999). Inactivation of the dlt Operon in Staphylococcus aureus Confers Sensitivity to Defensins, Protegrins, and Other Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(13), 8405-8410. https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8405

Peschel, A., Vuong, C., Otto, M., & Götz, F. (2000). The D -Alanine Residues of *Staphylococcus aureus* Teichoic Acids Alter the Susceptibility to Vancomycin and the Activity of Autolytic Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(10), 2845-2847. https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2845-2847.2000

Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, *16*(7), 1024-1033. https://doi.org/10.1111/cmi.12308

Petton, B., Alunno-Bruscia, M., Mitta, G., & Pernet, F. (2023). Increased growth metabolism promotes viral infection in a susceptible oyster population. *Aquaculture Environment Interactions*, *15*, 19-33. https://doi.org/10.3354/aei00450

Phan, T. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H., Hinds, M. G., Kvansakul, M., & Hulett, M. D. (2016). Human β-defensin 3 contains an oncolytic motif that binds PI(4,5)P2 to mediate tumour cell permeabilisation. *Oncotarget*, *7*(2), 2054-2069. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6520

Picot, S., Morga, B., Faury, N., Chollet, B., Dégremont, L., Travers, M.-A., Renault, T., & Arzul, I. (2019). A study of autophagy in hemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Autophagy*, *15*(10), 1801-1809. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596490

Pirtskhalava, M., Vishnepolsky, B., Grigolava, M., & Managadze, G. (2021). Physicochemical Features and Peculiarities of Interaction of AMP with the Membrane. *Pharmaceuticals*, *14*(5), 471. https://doi.org/10.3390/ph14050471

Poirier, A. C., Schmitt, P., Rosa, R. D., Vanhove, A. S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T. P., Charrière, G. M., & Destoumieux-Garzón, D. (2014). Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(36), 24821-24831. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546

Polz, M. F., Alm, E. J., & Hanage, W. P. (2013). Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends in Genetics*, *29*(3), 170-175. https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.006

Powell, D., Subramanian, S., Suwansa-ard, S., Zhao, M., O'Connor, W., Raftos, D., & Elizur, A. (2018). The genome of the oyster *Saccostrea* offers insight into the environmental resilience of bivalves. *DNA Research*, *25*(6), 655-665. https://doi.org/10.1093/dnares/dsy032

Pütsep, K., Axelsson, L.-G., Boman, A., Midtvedt, T., Normark, S., Boman, H. G., & Andersson, M. (2000). Germ-free and Colonized Mice Generate the Same Products from Enteric Prodefensins. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(51), 40478-40482. https://doi.org/10.1074/jbc.M007816200

Qu, T., Zhang, L., Wang, W., Huang, B., Li, Y., Zhu, Q., Li, L., & Zhang, G. (2015). Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in Crassostrea gigas clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Developmental & Comparative Immunology*, *51*(1), 74-78. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.02.011

Radkov, A. D., Hsu, Y.-P., Booher, G., & VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *87*(1), 991-1014. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921

Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal Tripartite Interactions between the Aedes aegypti Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(3), e1561. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561

Ramsey, M. M., Freire, M. O., Gabrilska, R. A., Rumbaugh, K. P., & Lemon, K. P. (2016). Staphylococcus aureus Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01230

Randall, R. E., & Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses : An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, *89*(1), 1-47. https://doi.org/10.1099/vir.0.83391-0

Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., & Gordon, J. I. (2006). Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, *127*(2), 423-433. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043

Renault, T. (2006). *Les virus infectant les bivalves marins*. Virologie. 2006;10(1):35-41.

Renault, T., Deuff, R. L., Cochennec, N., Chollet, B., & Maffart, P. (1994). *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*.

Ri, S., Zha, S., Kim, T., Ju, K., Zhou, W., Shi, W., Wu, M., Kim, C., Bao, Y., Sun, C., & Liu, G. (2022). Identification, characterization, and antimicrobial activity of a novel big defensin discovered in a commercial bivalve mollusc, Tegillarca granosa. *Fish & Shellfish Immunology*, *124*, 174-181. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.04.003

Rocha, G. (2020). *Prospecção e caracterização molecular de novas defensinas do tipo CSab (Cg-Defs) e big defensinas (Cg-BigDefs) na ostra Crassostrea gigas.* [Dissertação (mestrado)]. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Romero, J., García-Varela, M., Laclette, J. P., & Espejo, R. T. (2002). Bacterial 16S rRNA Gene Analysis Revealed That Bacteria Related to Arcobacter spp. Constitute an Abundant and Common Component of the Oyster Microbiota (Tiostrea chilensis). *Microbial Ecology*, *44*(4), 365-371. https://doi.org/10.1007/s00248-002-1063-7

Rosa, R. D., Alonso, P., Santini, A., Vergnes, A., & Bachère, E. (2015). High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence–absence gene variability (PAV) in the oyster Crassostrea gigas. *Developmental & Comparative Immunology*, *49*(2), 231-238. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.12.002

Rosa, R. D., Santini, A., Fievet, J., Bulet, P., Destoumieux-Garzón, D., & Bachère, E. (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*(9), e25594. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025594

Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007a). The hologenome theory disregards the coral holobiont : Reply from Rosenberg et al. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(10), 826-826. https://doi.org/10.1038/nrmicro1635-c2

Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007b). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(5), 355-362. https://doi.org/10.1038/nrmicro1635

Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *9*(5), 313-323. https://doi.org/10.1038/nri2515

Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., & Shai, Y. (2012a). D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B Streptococcus by Increasing the Cell Wall Density. *PLoS Pathogens*, *8*(9). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891

Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., & Shai, Y. (2012b). D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B Streptococcus by

Increasing the Cell Wall Density. *PLoS Pathogens*, *8*(9), e1002891. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891

Saito, T., Kawabata, S., Shigenaga, T., Takayenoki, Y., Cho, J., Nakajima, H., Hirata, M., & Iwanaga, S. (1995). A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes : Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity1. *The Journal of Biochemistry*, *117*(5), 1131-1137. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124818

Salvi, D., & Mariottini, P. (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*. https://doi.org/10.1111/zoj.12455

Salzman, N. H., Ghosh, D., Huttner, K. M., Paterson, Y., & Bevins, C. L. (2003). Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature*, *422*(6931), 522-526. https://doi.org/10.1038/nature01520

Salzman, N. H., Hung, K., Haribhai, D., Chu, H., Karlsson, J., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., Hayward, M., Stoel, M., Zhou, Y., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Bevins, C. L., Williams, C. B., & Bos, N. A. (2010). *Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology*. 22.

Salzman, N. H., Underwood, M. A., & Bevins, C. L. (2007). Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota : A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*, *19*(2), 70-83. https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.04.002

Samain, J.-F., & Mccombie, H. (2007). Summer mortality of Pacific oyster Crassostrea gigas. *The Morest Project*.

Sandaa, R.-A., Magnesen, T., Torkildsen, L., & Bergh, Ø. (2003). Characterisation of the Bacterial Community Associated with Early Stages of Great Scallop (Pecten maximus), Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Systematic and Applied Microbiology*, *26*(2), 302-311. https://doi.org/10.1078/072320203322346164

Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N., Shamova, O., & Sahl, H. G. (2010). Human β-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci. *Infection and Immunity*, *78*(6), 2793-2800. https://doi.org/10.1128/IAI.00688-09

Schamberger, G. P., & Diez-Gonzalez, F. (2002). Selection of Recently Isolated Colicinogenic Escherichia coli Strains Inhibitory to Escherichia coli O157:H7. *Journal of Food Protection*, *65*(9), 1381-1387. https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.9.1381

Scherer, K. M., Spille, J.-H., Sahl, H.-G., Grein, F., & Kubitscheck, U. (2015). The Lantibiotic Nisin Induces Lipid II Aggregation, Causing Membrane Instability and Vesicle Budding. *Biophysical Journal*, *108*(5), 1114-1124. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.020

Schlag, M., Biswas, R., Krismer, B., Kohler, T., Zoll, S., Yu, W., Schwarz, H., Peschel, A., & Götz, F. (2010). Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. *Molecular Microbiology*, *75*(4), 864-873. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07007.x

Schmidt, N. W., Mishra, A., Lai, G. H., Davis, M., Sanders, L. K., Tran, D., Garcia, A., Tai, K. P., McCray, P. B., Ouellette, A. J., Selsted, M. E., & Wong, G. C. L. (2011). Criterion for Amino Acid Composition of Defensins and Antimicrobial Peptides Based on Geometry of Membrane Destabilization. *Journal of the American Chemical Society*, *133*(17), 6720-6727. https://doi.org/10.1021/ja200079a

Schmitt, P. (2011). *Oysters : Physiology, ecological distribution and mortality*. Nova Science Publishers.

Schmitt, P., Gueguen, Y., Desmarais, E., Bachère, E., & de Lorgeril, J. (2010). Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster Crassostrea gigas. *BMC Evolutionary Biology*, *10*(1), 23. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-23

Schmitt, P., Lorgeril, J. de, Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., & Bachère, E. (2012). Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster Crassostrea gigas. *Developmental & Comparative Immunology*, *37*(3-4), 363-370. https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.01.004

Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2012). The Antimicrobial Defense of the Pacific Oyster, Crassostrea gigas. How Diversity may Compensate for Scarcity in the Regulation of Resident/Pathogenic Microflora. *Frontiers in Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160

Schmitt, P., Wilmes, M., Pugnière, M., Aumelas, A., Bachère, E., Sahl, H.-G., Schneider, T., & Destoumieux-Garzón, D. (2010). Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action : OYSTER DEFENSINS INHIBIT PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS BY BINDING TO LIPID II. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(38), 29208-29216. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143388

Schmitt, P., Wilmes, M., Pugniere, M., Bachere, E., Sahl, H., Schneider, T., & Destoumieux-Garzon, D. (2010). Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action. *J. Biol. Chem.*, *285*(38), 29208-29216. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143388

Schneewind, O., & Missiakas, D. (2014). Lipoteichoic Acids, Phosphate-Containing Polymers in the Envelope of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Bacteriology*, *196*(6), 1133-1142. https://doi.org/10.1128/JB.01155-13

Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2019). Staphylococcal Protein Secretion and Envelope Assembly. *Microbiology Spectrum*, *7*(4), 7.4.5. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0070-2019

Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., & Korting, H. C. (2005). Human defensins. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(8), 587-595. https://doi.org/10.1007/s00109-005-0657-1

Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A. K., Mygind, P. H., Raventós, D. S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A. M. J. J., De Maria, L., Andersen, A. S., Gammelgaard, L. K., Sahl, H. G., & Kristensen, H. H. (2010). Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science*, *328*(5982), 1168-1172. https://doi.org/10.1126/science.1185723

Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A. K., Mygind, P. H., Raventós, D. S., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A. M. J. J., Maria, L. D., Andersen, A. S., Gammelgaard, L. K., Sahl, H.-G., & Kristensen, H.-H. (2010). Plectasin, a Fungal Defensin, Targets the Bacterial Cell Wall Precursor Lipid II. *Science*, *328*(5982), 1168-1172. https://doi.org/10.1126/science.1185723

Schröder, K., & Bosch, T. C. G. (2016). The Origin of Mucosal Immunity : Lessons from the Holobiont *Hydra*. *MBio*, *7*(6), e01184-16, /mbio/7/6/e01184-16.atom. https://doi.org/10.1128/mBio.01184-16

Segarra, A., Baillon, L., Tourbiez, D., Benabdelmouna, A., Faury, N., Bourgougnon, N., & Renault, T. (2014). Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, Crassostrea gigas. *Veterinary Research*, *45*(1), 103. https://doi.org/10.1186/s13567-014-0103-x

Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., & Renault, T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, Crassostrea gigas, in France in 2008. *Virus Research*, *153*(1), 92-99. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011

Selsted, M. E., Szklarek, D., & Lehrer, R. I. (1984). Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infection and Immunity*, *45*(1), 150-154. https://doi.org/10.1128/iai.45.1.150-154.1984

Semple, F., & Dorin, J. R. (2012). ß-Defensins : Multifunctional Modulators of Infection, Inflammation and More? *Journal of Innate Immunity*, *4*(4), 337-348. https://doi.org/10.1159/000336619

Seo, J.-K., Lee, M. J., Nam, B.-H., & Park, N. G. (2013). CgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(2), 480-488. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.010

Shafee, T., & Anderson, M. A. (2019). A quantitative map of protein sequence space for the cis-defensin superfamily. *Bioinformatics*, *35*(5), 743-752. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty697

Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Hulett, M. D., & Anderson, M. A. (2016). The Defensins Consist of Two Independent, Convergent Protein Superfamilies. *Molecular Biology and Evolution*, *33*(9), 2345-2356. https://doi.org/10.1093/molbev/msw106

Shafee, T. M. A., Lay, F. T., Phan, T. K., Anderson, M. A., & Hulett, M. D. (2017). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(4), 663-682. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5

Shen, Y., Torchia, M. L. G., Lawson, G. W., Karp, C. L., Ashwell, J. D., & Mazmanian, S. K. (2012). Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host & Microbe*, *12*(4), 509-520. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004

Shin, S. C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H., & Lee, W.-J. (2011). *Drosophila* Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science*, *334*(6056), 670-674. https://doi.org/10.1126/science.1212782

Shokralla, S., Gibson, J. F., Nikbakht, H., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hajibabaei, M. (2014). Next-generation DNA barcoding : Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources*, *14*(5), 892-901. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12236

Shu, M., Wang, Y., Yu, J., Kuo, S., Coda, A., Jiang, Y., Gallo, R. L., & Huang, C.-M. (2013). Fermentation of Propionibacterium acnes, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *PLoS ONE*, *8*(2), e55380. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055380

Sieradzki, K., & Tomasz, A. (1997). Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, *179*(8), 2557-2566. https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2557-2566.1997

Simon, J.-C., Marchesi, J. R., Mougel, C., & Selosse, M.-A. (2019). Host-microbiota interactions : From holobiont theory to analysis. *Microbiome*, *7*(1), 5. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4

Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., & Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, *480*(7376), 241-244. https://doi.org/10.1038/nature10571

Smith, C. D., Piasecki, C. C., Weera, M., Olszewicz, J., & Lonstein, J. S. (2013). Noradrenergic alpha-2 receptor modulators in the ventral bed nucleus of the stria terminalis : Effects on anxiety behavior in postpartum and virgin female rats. *Behavioral Neuroscience*, *127*(4), 582-597. https://doi.org/10.1037/a0032776

Smith, J. G., & Nemerow, G. R. (2008). Mechanism of Adenovirus Neutralization by Human α-Defensins. *Cell Host & Microbe*, *3*(1), 11-19. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.12.001

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—Masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 227-238. https://doi.org/10.1038/nrmicro2974

Stambuk, F., Ojeda, C., Machado Matos, G., Rosa, R. D., Mercado, L., & Schmitt, P. (2021). Big defensin from the scallop Argopecten purpuratus ApBD1 is an antimicrobial peptide which entraps bacteria through nanonets formation. *Fish & Shellfish Immunology*, *119*, 456-461. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.10.037

Stambuk, F., Ojeda, C., & Schmitt, P. (2020). *Big Defensin* Ap *BD1 from the scallop* Argopecten purpuratus *is an antimicrobial peptide which entraps bacteria through nanonets formation* [Preprint]. Immunology. https://doi.org/10.1101/2020.02.25.965327

Stecher, B., Maier, L., & Hardt, W.-D. (2013). « Blooming » in the gut : How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 277-284. https://doi.org/10.1038/nrmicro2989

Steen, A., Palumbo, E., Deghorain, M., Cocconcelli, P. S., Delcour, J., Kuipers, O. P., Kok, J., Buist, G., & Hols, P. (2005). Autolysis of *Lactococcus lactis* Is Increased upon D -Alanine Depletion of Peptidoglycan and Lipoteichoic Acids. *Journal of Bacteriology*, *187*(1), 114-124. https://doi.org/10.1128/JB.187.1.114-124.2005

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., & Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, *292*(5820), 246-248. https://doi.org/10.1038/292246a0

Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis : Microbial genes, brain & behaviour. *Genes, Brain and Behavior*, *13*(1), 69-86. https://doi.org/10.1111/gbb.12109

Stoppel, S. M., Duinker, A., Khatri, M., Lunestad, B. T., & Myrmel, M. (2023). Temperature Dependent Depuration of Norovirus GII and Tulane Virus from Oysters (Crassostrea gigas). *Food and Environmental Virology*, *15*(1), 43-50. https://doi.org/10.1007/s12560-022-09547-8

Tang, X., Huang, B., Lin, S., Wang, W., Zhang, G., & Li, L. (2020). CgMyD88s Serves as an Innate Immune System Plug During Ostreid Herpesvirus 1 Infection in the Pacific Oyster (Crassostrea gigas). *Frontiers in Immunology*, *11*, 1247. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01247

Tang, X., Huang, B., Zhang, L., Li, L., & Zhang, G. (2016). TANK-binding kinase-1 broadly affects oyster immune response to bacteria and viruses. *Fish & Shellfish Immunology*, *56*, 330-335. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.011

Tang, X., Huang, B., Zhang, L., Li, L., & Zhang, G. (2017). Molecular characterization of Pacific oyster (Crassostrea gigas) IRAK4 gene and its role in MyD88-dependent pathway. *Developmental & Comparative Immunology*, *72*, 21-29. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.004

Tang, Y. Q., & Selsted, M. E. (1993). Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(9), 6649-6653. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53299-3

Taris, N., Lang, R. P., Reno, P. W., & Camara, M. D. (2009). Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display. *Animal Genetics*, *40*(5), 663-677. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01894.x

Tarr, D. E. K. (2016). Establishing a reference array for the CS-αβ superfamily of defensive peptides. *BMC Research Notes*, *9*(1), 490. https://doi.org/10.1186/s13104-016-2291-0

Teng, L., Gao, B., & Zhang, S. (2012). The first chordate big defensin : Identification, expression and bioactivity. *Fish & Shellfish Immunology*, *32*(4), 572-577. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.007

Terahara, K., Takahashi, K. G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T., Hirasawa, M., & Mori, K. (2006). Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster "Crassostrea gigas". *Developmental & Comparative Immunology*, *30*(8), 667-683. https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.09.009

Terras, F. R., Schoofs, H. M., De Bolle, M. F., Van Leuven, F., Rees, S. B., Vanderleyden, J., Cammue, B. P., & Broekaert, W. F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (Raphanus sativus L.) seeds. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(22), 15301-15309.

Terrier, V. P., Adihou, H., Arnould, M., Delmas, A. F., & Aucagne, V. (2015). A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. *Chem. Sci.* https://doi.org/10.1039/C5SC02630J

Terrier, V. P., Adihou, H., Arnould, M., Delmas, A. F., & Aucagne, V. (2016). A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters. *Chemical Science*, *7*(1), 339-345. https://doi.org/10.1039/C5SC02630J

te Winkel, J. D., Gray, D. A., Seistrup, K. H., Hamoen, L. W., & Strahl, H. (2016). Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*, 29. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00029

Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., & Elinav, E. (2016). The microbiome and innate immunity. *Nature*, *535*(7610), 65-74. https://doi.org/10.1038/nature18847

Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J. M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., & Romero, J. (2014). Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis* , *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS Microbiology Ecology*, *88*(1), 69-83. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12270

Tram, N. D. T., Xu, J., Mukherjee, D., Obanel, A. E., Mayandi, V., Selvarajan, V., Zhu, X., Teo, J., Barathi, V. A., Lakshminarayanan, R., & Ee, P. L. R. (2023). Bacteria-Responsive Self-Assembly of Antimicrobial Peptide Nanonets for Trap-and-Kill of Antibiotic-Resistant Strains. *Advanced Functional Materials*, *33*(5), 2210858. https://doi.org/10.1002/adfm.202210858

Travers, M.-A., Miller, K. B., Roque, A. C. A., & Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology*, *131*, 11-31.

Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, *489*(7415), 242-249. https://doi.org/10.1038/nature11552

Turner, J., Cho, Y., Dinh, N.-N., Waring, A. J., & Lehrer, R. I. (1998). Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *42*(9), 2206-2214. https://doi.org/10.1128/AAC.42.9.2206

van der Does, A. M., Hiemstra, P. S., & Mookherjee, N. (2019). Antimicrobial Host Defence Peptides : Immunomodulatory Functions and Translational Prospects. In K. Matsuzaki (Éd.), *Antimicrobial Peptides* (Vol. 1117, p. 149-171). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3588-4_10

Vance, R. E., Isberg, R. R., & Portnoy, D. A. (2009). Patterns of Pathogenesis : Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host & Microbe*, *6*(1), 10-21. https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.06.007

Vasudevan, S., Yuan, J., Ösapay, G., Tran, P., Tai, K., Liang, W., Kumar, V., Selsted, M. E., & Cocco, M. J. (2008). Synthesis, Structure, and Activities of an Oral Mucosal α-Defensin from Rhesus Macaque. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(51), 35869-35877. https://doi.org/10.1074/jbc.M806915200

Vriens, K., Cammue, B., & Thevissen, K. (2014). Antifungal Plant Defensins : Mechanisms of Action and Production. *Molecules*, *19*(8), 12280-12303. https://doi.org/10.3390/molecules190812280

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3 : The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D1087-D1093. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278

Wang, G.-L., Xia, X.-L., Li, X.-L., Dong, S.-J., & Li, J.-L. (2014). Molecular characterization and expression patterns of the big defensin gene in freshwater mussel (Hyriopsis cumingii). *Genetics and Molecular Research: GMR*, *13*(1), 704-715. https://doi.org/10.4238/2014.January.29.1

Wei, Y.-X., Guo, D.-S., Li, R.-G., Chen, H.-W., & Chen, P.-X. (2003). [Purification of a big defensin from Ruditapes philippinesis and its antibacterial activity]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, *35*(12), 1145-1148.

Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y., Kristian, S. A., Dietz, K., Yeaman, M. R., & Bayer, A. S. (2005). Lack of Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus* Leads to Reduced Interactions with Endothelial Cells and

to Attenuated Virulence in a Rabbit Model of Endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases*, *191*(10), 1771-1777. https://doi.org/10.1086/429692

Wheeler, R., Mesnage, S., Boneca, I. G., Hobbs, J. K., & Foster, S. J. (2011). Super-resolution microscopy reveals cell wall dynamics and peptidoglycan architecture in ovococcal bacteria : Ovococcal peptidoglycan architecture and dynamics. *Molecular Microbiology*, *82*(5), 1096-1109. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07871.x

Wiedemann, C., Kumar, A., Lang, A., & Ohlenschläger, O. (2020). Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units : Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Frontiers in Chemistry*, *8*, 280. https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00280

Wilmes, M., Stockem, M., Bierbaum, G., Schlag, M., Götz, F., Tran, D., Schaal, J., Ouellette, A., Selsted, M., & Sahl, H.-G. (2014). Killing of Staphylococci by θ-Defensins Involves Membrane Impairment and Activation of Autolytic Enzymes. *Antibiotics*, *3*(4), 617-631. https://doi.org/10.3390/antibiotics3040617

Xia, G., Kohler, T., & Peschel, A. (2010a). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(2-3), 148-154. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001

Xia, G., Kohler, T., & Peschel, A. (2010b). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*, *300*(2-3), 148-154. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.10.001

Xu, D., & Lu, W. (2020). Defensins : A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Frontiers in Immunology*, *11*.

Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T., Matsumoto, A., & Suginaka, H. (1996a). An autolysin ring associated with cell separation of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, *178*(6), 1565-1571. https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1565-1571.1996

Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T., Matsumoto, A., & Suginaka, H. (1996b). An autolysin ring associated with cell separation of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, *178*(6), 1565-1571. https://doi.org/10.1128/jb.178.6.1565-1571.1996

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M. Z., & Oppenheim, J. J. (1999). β-Defensins : Linking Innate and Adaptive Immunity Through Dendritic and T Cell CCR6. *Science*, *286*(5439), 525-528. https://doi.org/10.1126/science.286.5439.525

Yang, Y.-S., Mitta, G., Chavanieu, A., Calas, B., Sanchez, J. F., Roch, P., & Aumelas, A. (2000). Solution Structure and Activity of the Synthetic Four-Disulfide Bond Mediterranean Mussel Defensin (MGD-1). *Biochemistry*, *39*(47), 14436-14447. https://doi.org/10.1021/bi0011835

Yu, H., Li, H., Li, Q., Xu, R., Yue, C., & Du, S. (2019). Targeted Gene Disruption in Pacific Oyster Based on CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Marine Biotechnology*, *21*(3), 301-309. https://doi.org/10.1007/s10126-019-09885-y

Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin : Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(15), 5449-5453. https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., … Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, *490*(7418), 49-54. https://doi.org/10.1038/nature11413

Zhang, L., Li, L., Guo, X., Litman, G. W., Dishaw, L. J., & Zhang, G. (2015). Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports*, *5*(1), 8693. https://doi.org/10.1038/srep08693

Zhang, L., Li, L., & Zhang, G. (2011). Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the Crassostrea gigas apoptosis system. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(5), 603-610. https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.005

Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J., & Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides : Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, *8*(1), 48. https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2

Zhang, S., & Sun, X. (2022). Core Gut Microbiota of Shrimp Function as a Regulator to Maintain Immune Homeostasis in Response to WSSV Infection. *Microbiology Spectrum*, *10*(2), e02465-21. https://doi.org/10.1128/spectrum.02465-21

Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., & Song, L. (2014). The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (Crassostrea gigas) against secondary challenge with Vibrio

splendidus. *Developmental & Comparative Immunology*, *45*(1), 141-150. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015

Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K. L., & Yu, Z. (2013). Characteristic and Functional Analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, Crassostrea gigas, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity. *PLoS ONE*, *8*(10), e76464. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076464

Zhang, Y., He, X., & Yu, Z. (2011). Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (IκB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Fish & Shellfish Immunology*, *30*(6), 1354-1361. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.03.008

Zhao, J., Li, C., Chen, A., Li, L., Su, X., & Li, T. (2010). Molecular Characterization of a Novel Big Defensin from Clam Venerupis philippinarum. *PLoS ONE*, *5*(10), e13480. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013480

Zhao, J., Song, L., Li, C., Ni, D., Wu, L., Zhu, L., Wang, H., & Xu, W. (2007). Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop Argopecten irradians and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Molecular Immunology*, *44*(4), 360-368. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.02.025

Zhou, W., Gao, B., & Zhu, S. (2019). Did cis- and trans-defensins derive from a common ancestor? *Immunogenetics*, *71*(1), 61-69. https://doi.org/10.1007/s00251-018-1086-y

Zhu, S., & Gao, B. (2013). Evolutionary origin of β-defensins. *Developmental & Comparative Immunology*, *39*(1-2), 79-84. https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.02.011

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants : The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, *32*(5), 723-735. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x

Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., & Jin, M. (2020). Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides. *Animal Nutrition*, *6*(4), 389-396. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.002

ANNEXES

PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS B

Phil. Trans. R. Soc. B.

doi:10.1098/not yet assigned

Cross-talk and mutual shaping between the immune system and the microbiota during an oyster's life

Delphine Destoumieux-Garzón[1*], Caroline Montagnani[1], Jean-Michel Escoubas[1], Luc Dantan[1], Noémie de San Nicolas[1], Marie-Agnès Travers[1], Eve Toulza[1], Guillaume Mitta[2], Céline Cosseau[1]

1 IHPE, University Montpellier, CNRS, Ifremer, University Perpignan Via Domitia, 34090 Montpellier, France
2 Ifremer, IRD, ILM, Université de Polynésie Française, UMR EIO, Vairao 98179, French Polynesia.

Keywords: Insert a minimum of three and maximum of six keywords here.

Please refer to our instructions for authors for full details on manuscript preparation. Please note that this template should act as a guide on content, but doesn't necessarily need to be followed for style and formatting. Our typesetters will set your manuscript into house style after acceptance.

Summary

The critical role of microbiomes in the health of their hosts has recently been demonstrated in a number of non-model species of economic or ecological interest. In particular, progress has been made in the Pacific oyster *Crassostrea gigas,* which is the world's major cultured mollusc species. This species is characterized by a diversified internal microbiota that cohabits with immune cells. In the early stages of oyster development, just after fertilization, the microbiota plays a key role in the education of the immune system. Exposure to a rich microbial environment at the larval stage leads to an increase in immune competence throughout the life of the oysters, which confers a better protection to the oysters against pathogenic infections at the later juvenile/adult stages. This beneficial effect, which was found to be intergenerational, was associated with epigenetic remodelling. At juvenile stages, the educated immune system participates in the control of the homeostasis of the oyster microbiota, which is fine-tuned in particular by the oyster AMPs acting through specific and synergistic effects. However, this balance is fragile, as illustrated by the course of events that occur during the Pacific oyster mortality syndrome, a disease causing mass mortalities in oysters worldwide. In this pathogenesis, the weakening of oyster immune defences by OsHV-1 µVar virus results in dysbiosis of the microbiota and leads to fatal sepsis. These recent studies illustrate the continuous interaction between the oyster immune system and its microbiota throughout its life and the importance of the mutual shaping of these two components for oyster health.

*Author for correspondence (ddestoum@ifremer.fr).
†Present address: Department, Institution, Address, City, Code, Country

Introduction

Over the past decade, major scientific interest has been given to the role of microbiomes in the biology of metazoans. In particular, an abundant literature has been produced on the dialogue between the co-evolved immune system and microbiota of animal species. Across the animal kingdom, key studies have highlighted the importance of this dialogue for animal health. It is now recognized that effectors of the immune system control the microbiota and maintain homeostasis with resident microbial communities hosted by vertebrates (Bevins and Salzman, 2011), arthropods (Marra et al., 2021) and cnidarians (Franzenburg et al., 2013). Simultaneously, in both vertebrates and arthropods, the immune system is shaped by resident microbes (Broderick et al., 2014; Hooper et al., 2012) with far-reaching effects on host physiology (Liu et al., 2022; Miani et al., 2018).

The immunity-microbiota cross-talk and its physiological consequences have remained much less explored in mollusks until recently. Within this phylum, bivalve mollusks (e.g. oysters, mussels, clams) are particularly interesting as they are confronted to important microbial challenges from the very first embryonic and larval stages, when they are still ciliated and move freely in the seawater column, to the benthic spat and adult stages when they feed on plankton and their associated microorganisms. Benthic oysters not only host microbial communities in their epithelial surfaces (Lokmer et al., 2016b) but also in their circulating body fluids, *i.e.* the hemolymph (equivalent of the blood) (Dupont et al., 2020), in the pallial/extrapallial cavity fluid (de Lorgeril et al., 2018a; Pimentel et al., 2021) as well as in all the tissues and development stages studied (King et al., 2020, p. 202; Unzueta-Martínez et al., 2022). As they are filter feeders able to concentrate microorganisms present in their environment, it has been argued that bivalves host transient microbial communities that vary with environmental conditions. This is actually true for a fair proportion of their microbiota, which is rapidly eliminated upon depuration with purified seawater, a common method employed for removing waterborne microbial contaminants from bivalves (Vezzulli et al., 2018). Still, the microbiota of bivalves is highly distinct from the microbial communities found in the surrounding seawater (Clerissi et al., 2020; Dupont et al., 2020; Lokmer et al., 2016b; Offret et al., 2023; Vezzulli et al., 2018). Moreover, among bivalve-associated bacteria, some genera, which share the same habitat and probably have a long co-evolutionary history with their invertebrate hosts, have established stable associations that are poorly affected by the environment (Vezzulli et al., 2018). With the exception of species that host chemosynthetic bacterial mutualists (for review see (Duperron et al., 2012)), such as the sulfur-oxidizing lucinid *Codakia orbiculate* (Gros et al., 2012), most of the time it is ignored whether members of the microbiota play key functions in the biology of bivalves.

Studies on the oyster *Crassostrea gigas*, which is the main shellfish species cultured worldwide, have revealed a tight connection between the microbiota and the oyster health status (Clerissi et al., 2020). A fine-tuned dialogue between oyster immunity and its microbiota was evidenced from early life to adult stages (de Lorgeril et al., 2018b; De San Nicolas et al., 2022; Fallet et al., 2022). Recently a first insight into the functions carried by members of the microbiome has been made accessible, either by shotgun metagenomics (Pimentel et al., 2021) or metatranscriptomics (Clerissi et al., 2023). It is currently argued that bivalve microbiota may be manipulated for disease prevention in aquaculture (Paillard et al., 2022). The present article summarizes the knowledge accumulated on oyster-microbiota interactions over the last few years and reviews the deregulations leading to dysbiosis and oyster death. Finally, it covers the avenues opened for disease prevention and control.

Homeostasis: A diversified and fluctuating microbiota cohabits with oyster immune cells

Oyster larvae, as soon as two days after reproduction, are equipped with a velum used for motility and eating, and two valves develop forming the shell. Oysters become sessile after 2.5 weeks when a foot develops to attach to a hard surface (pediveliger stage). Once permanently attached, the oyster becomes a spat. From this stage until adulthood, the oyster soft body is covered by the mantle (or pallium), a tissue that ensures the development and growth of the shell and also plays a sensory role. A pair of lamellar gills, which extend from one extremity of the gut to the other, ensures the functions of respiration, nutrition and excretion of certain wastes. A kidney consisting of a tubular gland located within a renal sinus ensures the excretory system. Oysters have a open-type circulatory system: the circulating fluid called hemolymph (equivalent to vertebrate blood) is not confined to the vessels and the heart but flows into sinuses and infiltrate intercellular space of all tissues (Kennedy, Victor S. et al., 1996). The hemolymph carries the circulating immune cells called hemocytes throughout oyster body. The heart propels the hemolymph into the circulatory system. The two oyster valves forming the shell, which protects the oyster body, also enclose the pallial and extrapallial cavity fluids, which surrounds the mantle and the soft body of the mollusk, and contains hemocytes. Thus, oyster body surfaces are covered by the pallial fluid/mucus, which contains high amounts of antimicrobials such as copper, zinc, and hydrolases such as lysozyme participating in oyster chemical defenses against infections (Brousseau et al., 2014; Pales Espinosa et al., 2016). The mucus is secreted by mucocytes lining epithelia. Together with ciliary movement at epithelial surfaces, the mucus is believed to restrict microbial growth and serves as a first line of defense against infections from environmental pathogens (figure 1). Remarkably, bacteria are barely seen attached to epithelia and mucus of healthy oysters by means of electron microscopy (Garland et al., 1982). In contrast, bacteria are easily detected in oyster body fluids (de Lorgeril et al., 2018a). While body fluids may represent an entry route for oyster tissue colonization, they also host a number of bacterial genera such as *Pseudoalteromonas* that confer protection through the production of antimicrobial activities. Such protective bacteria have been isolated both in the pallial fluid of *Crassostrea virginica* (Braun et al., 2019) and in the hemolymph of *C. gigas* (Desriac et al., 2014). They secrete antimicrobial peptides generally referred to as bacteriocins (Desriac et al., 2020), which confer a protective shield against pathogens.

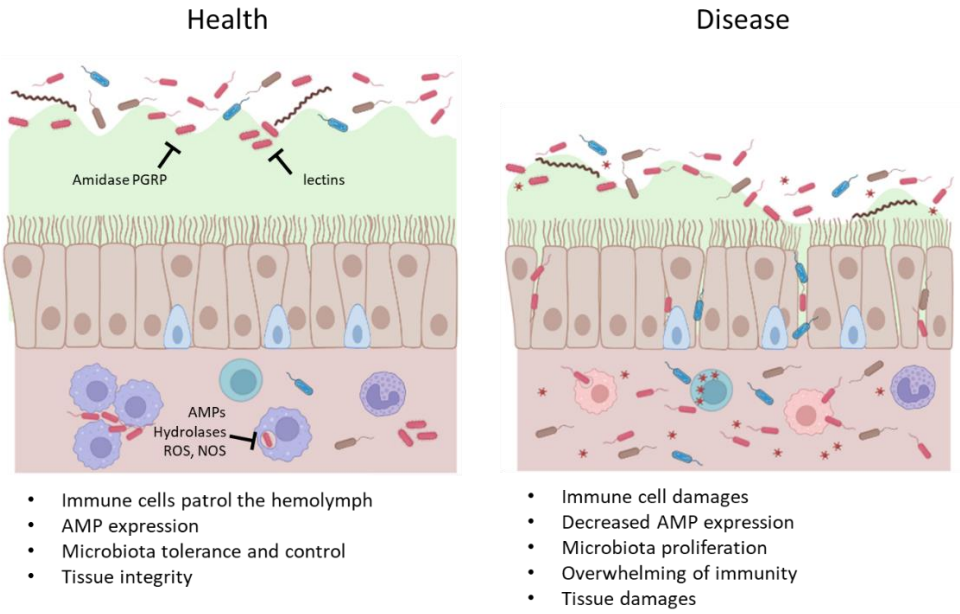


Figure 1. Immune-microbiota interplay at an oyster epithelium: homeostasis *vs.* dysbiosis. The left panel (Health) illustrates an homoestatic context. The microbiota is kept away from epithetial cells (brown cells) by a thick mucus layer (green) secreted by mucocytes (blue cells), which covers the oyster body surfaces. Lectins contribute to limit penetration of microorganisms. It is assumed that PGRPs prevent peptidoglycan from activating immune receptors. Bacteria circulate in the hemolymph without inducing a measurable immune response (pink). They are kept under control by functional immune cells (purple) and the AMPs, hydrolases, ROS and NOS they produce. The right panel (Disease) shows a context of dysbiosis. Pathogens alter immune cell functions (pink cells), which no longer control the microbiota. AMP expression is altered. Bacteria invade all tissues. Tissues loose their integrity and their barrier functions. (figure created in biorender.com).

Taxonomic information on the microbiota associated with oyster tissue has been mainly acquired with the eased access to next generation sequencing. The advent of this technology has highlighted the tremendous plasticity of the oyster microbiota under the influence of both biotic (*i.e.* oyster genetic background, developmental stage and metabolic rate or nutrient availability) and abiotic factors (*i.e.* temperature, pH, salinity, pCO_2) (Offret et al., 2020; Scanes et al., 2021a, 2021c; Trabal Fernández et al., 2014; Wegner et al., 2013). In addition to important fluctuations in response to environmental changes, physiological status, and developmental stages, the oyster microbiota shows important individual variability, both at the level of the whole animal and at the level of individual tissues throughout all life stages (Hines et al., 2023; King et al., 2020; Lokmer et al., 2016b; Pimentel et al., 2021; Unzueta-Martínez et al., 2022). Such an heterogeneity has rendered extremely difficult the identification of a core bacterial microbiota in oysters, if it actually exists. Overall, only Spirochaetaceae were widely distributed across tissues of different oyster species (*C. gigas, C. virginica* and *Saccostrea glomerata*) living on three continents (Clerissi et al., 2020; Hines et al., 2023; King et al., 2020; Lokmer et al., 2016a; Pimentel et al., 2021; Scanes et al., 2021b, 2021a). However, it shoud be noted that such a trans-specific conservation may be linked to the ecology of Spirochaetes, which are abundant in intertidial marine sediments (Harwood and Canale-Parola, 1984) to which oysters are exposed. On a population scale, a number of rare bacterial species were associated with genetic differentiation of *C. gigas* oysters but this association was lost in stressfull environmental conditions (Wegner et al., 2013). More conclusively, microbiota analyses carried out at an individual level and on different oyster tissues have shown

that each tissue harbors its own microbial consortia, probably reflecting the functional differences of each tissues (King et al., 2020; Lokmer et al., 2016b; Pimentel et al., 2021).

Hemolymph is by the far the tissue that has been the most extensively studied in oyster health and disease, probably due to its key immune functions. Hemolymph bacterial communities were clearly distinguished from those found in seawater and solid tissues, but the community dynamics shows a close relationship to the internal and external oyster environment, suggesting potential host selection strategies (Dupont et al., 2020, p. 202; Lokmer et al., 2016b; Pimentel et al., 2021; Vezzulli et al., 2018). Beyond its bacterial component, oyster hemolymph contains diverse protists and viruses; the composition and dynamics of these communities depend on the environment as well as on oyster genetics (Dupont et al., 2020). Among the diverse components of the hemolymph microbiota, bacteria show a more stable taxonomic composition than protists and viruses, suggesting more fine-tuned interactions with the oyster host. These data suggest that some bacterial groups, mostly γ- and α-proteobacteria, are well adapted to the hemolymph conditions, whereas viral and protist communities would be primarily transient (Dupont et al., 2020).

Maintenance of homeostasis in the hemolymph complex ecosystem remains far from being understood. Particularly, it is still largely ignored how such an abundant and diverse microbiota is tolerated by the host hemocytes (Schmitt et al., 2012b), which patrol in the hemolymph (figure 1) and are equipped with key immune receptors, pathways and effectors highly conserved across the animal kingdom (Escoubas et al., 2016). Recognition of potential pathogens occurs in the hemolymph where they are contained by hemocyte clusters, preventing them from invading the connective tissue (Rubio et al., 2019) (figure 1). To persist in such a hostile environment, the resident microbiota of oyster may have evolved low immunogenic properties, as recently evidenced in a *Vibrio* population showing preferential association with oyster tissues. In this population, a modified O-antigen structure was shown to reduce strain recognition by oyster immune receptors (Oyanedel et al., 2020), unlike in other *Vibrio* that behave as opportunistic pathogens and colonize oysters by the active dampening of their cellular defenses (Oyanedel et al., 2023; Rubio et al., 2019). In addition, the oyster mucus proteins may confer immune tolerance. Indeed a number of secreted amidase PGRPs (peptidoglycan recognition proteins) have been identified in oyster mucus covering pallial organs (gill, mantle, labial palps) (Pales Espinosa et al., 2016). In many species, from insects to mammals, amidase PRGPs are capable of cleaving the bacterial cell-wall glycopeptides released by bacteria into non-immunogenic compounds. Thereby they control the intensity of the immune response and act as detoxifying enzymes (Zaidman-Rémy et al., 2006). Their secretion in oyster mucus is an important indication that they may participate in the maintenance of homeostasis at the immune-bacteria interface.

The immune system shapes the microbiota

Cellular defenses are highly potent in oysters. Oyster immune cells, the hemocytes, appear during gastrula-trochophore stages and they already express immune genes at the trochophore stage (15 h post fecundation, hpf), suggesting the initiation of the immune system (Song et al., 2016; Tirapé et al., 2007). However, at hatching (9 hpf), oyster larvae tend to be immune-depleted, which makes them more susceptible to infections. From the D-veliger larval stage (17 hpf), hemocytes perform phagocytosis (Song et al., 2016). In spat (> 2,5 weeks post fecundation) and adults, hemocytes circulate in hemolymph and infiltrate injured/infected tissues. They not only perform efficient phagocytosis but they produce important key antimicrobials (reactive oxygen and nitrogen species, antimicrobial peptides and proteins, hydrolases) capable of killing microbes both intracellularly and extracellularly (for review see (Bachere et al., 2015)) (figure 1, left panel). The potent

respiratory burst produced by hemocytes triggers a mechanism of ETosis by which hemocytes release DNA Extracellular Traps that contain antimicrobial histones and entrap bacteria, preventing them from disseminating outside the hemolymph or sites of injury (Poirier et al., 2014). Most oyster bacterial pathogens have evolved the capacity to escape oyster cellular defenses, either by evading phagocytosis (Labreuche et al., 2006) or by exerting cytotoxicity against hemocytes (Oyanedel et al., 2023; Rubio et al., 2019), thereby causing systemic infections (figure 1, right panel). Until now, such mechanisms of cytotoxicity have not been found in commensals. Instead non-pathogenic bacteria are contained in the circulation by hemocyte clumps (Rubio et al., 2019). This provides indirect evidence that hemocytes participate in keeping the commensal microbiota under control.

Antimicrobial peptides (AMPs) have been shown to combat infections in a broad number of species across the animal kingdom including marine invertebrates (Destoumieux-Garzón et al., 2016). However, it is only in the recent years that AMPs have been shown to play a key role in controlling microbiota hosted by metazoan hosts. The main families of antimicrobial peptides and proteins identified in oyster include CS$\alpha\beta$ defensins called *Cg*-Defs (they are highly conserved in metazoans including fungi, plants, arthropods, mollusks but they were lost in chordates), bactericidal/permeability increasing proteins (Cg-BPI) (they are found both in vertebrates and mollusks), and big defensins (*Cg*-BigDefs; they are found in chelicerates and mollusks). *Cg*-Defs and *Cg*-BPI are expressed by hemocytes and epithelial cells, contributing both to local and systemic responses (Schmitt et al., 2012b). *Cg*-BigDefs are expressed by oyster hemocytes only (Gerdol et al., 2020). Transcripts of *Cg*-Defs have been found in oyster embryos, however their expression increases significantly over the first larval stages, from hatching to D-veliger larval stage (Song et al., 2016). This indicates that AMPs may play a role at the immune-microbiota interface early during development. Oyster antimicrobial peptides and proteins have very distinct and complementary mechanisms of action, which enables them to target a broad diversity of microorganisms. *Cg*-Defs are ligands of lipid II that inhibit peptidoglycan synthesis; they are essentially active against Gram-positive bacteria (Schmitt et al., 2010). *Cg*-BPI, which efficiently binds LPS, creates membrane damages in Gram-negative bacteria (Gonzalez et al., 2007). *Cg*-BigDefs, which autoassemble and entrap bacteria in supramolecular structures called nanonets, have broad spectrum antimicrobial activities (Loth et al., 2019). Unlike in other species including species of mollusks (e.g. mussels, (Mitta et al., 2000)), AMPs in oyster are not expressed at high concentrations. Instead, they have highly diversified. This molecular diversity creates synergy and enlarges the spectrum of antimicrobial activities of oyster AMP families, particularly *Cg*-Defs and *Cg*-BigDefs (De San Nicolas et al., 2022; Schmitt et al., 2012a). Remarkably, the gene expansion and sequence diversification of *Cg*-BigDefs has also conferred specificity to members of this peptide family against bacteria belonging the oyster microbiota (De San Nicolas et al., 2022). Unlike in the scallop *Argopecten purpuratus* where only one big defensin gene has strong effects on the composition of the microbiota (González et al., 2020), *Cg*-BigDefs in oysters fine-tune the microbiota, probably through their very specific activities against members of the microbiota (De San Nicolas et al., 2022). Such a specificity has been recently discovered in AMPs from other animal phyla, *e.g.* in insects (Hanson et al., 2019).

While lectins have remained much less explored for their interactions with the oyster microbiota, they are highly diverse in oysters and abundant in the mucus covering oyster epithelial surfaces (Pales Espinosa et al., 2016). Lectins found in oyster mucus have been attributed to infiltrating hemocytes as well as to mucocytes and epithelial cells (Pales Espinosa et al., 2016). Among their diverse functions, lectins are involved in host–microbe interactions both in a parasitic or mutualistic context. For instance, C-type lectins in shrimp agglutinate bacteria selectively (Wongpanya et al., 2017) and they maintain the homeostasis of the intestinal and hemolymph microbiota (Wang et al., 2014; Zhang et al., 2021). In oysters, C-type lectins may participate in the control of pathogens as demonstrated for *Cg*CLec-3, which is expressed by hemocytes and agglutinates specific bacterial species (Song et al., 2019). The massive diversification of C-type lectins in the genome of *C.*

gigas (154 genes) (Zhang et al., 2012) indicates an uncovered diversity of putative functions, and putative specificities in the interaction with the microbiota.

The microbiota shapes the oyster immune system

Multicellular organisms exist as complex ecosystems, also known as holobionts, comprised of both the animal host and its associated microbiota (McFall-Ngai et al., 2013). Interactions between the host and its microbiota implies complex feedbacks. If the immune system orchestrates the maintenance of key features of the host-microbiota interactions and establishment of the microbiota community, the latter, in return, plays a critical role in the development, education and function of the immune system (Hooper et al., 2012; Jarchum and Pamer, 2011; Round and Mazmanian, 2009). The early life is recognized as a crucial window of opportunity during which microbial colonization sets appropriate immune development and establish the foundation for lifelong immunity. Studies in humans and in a vast array of vertebrates or invertebrate animals has demonstrated that colonization of complex microbiota or single symbionts in early life does not only impact the maturation of the mucosal and gut immune systems, but also modulates the systemic immune response (Ansaldo et al., 2021; Galindo-Villegas et al., 2012; Gensollen et al., 2016; Kelly and Salinas, 2017; Rader et al., 2019; Weiss et al., 2011)

(Carlson, 2020). In addition, compelling evidence suggests that early life environments can induce long-lasting changes in progenies' immune system and have critical impacts on health and disease. Notably, it has been shown that nonpathogenic microbial exposures during critical periods of development in mammals lead to a favorable imprint on immunity, promoting protective immunity that reduces risk of disease later in life (Arrieta et al., 2014).

As filter feeders, oysters evolve in a rich microbial environment, under constant interaction with pathogenic and commensal microorganisms. Specific bacterial communities are established from early developmental stages (from gametes to spats) with members that persist across multiple life stages and could be transmitted vertically or horizontally (Unzueta-Martínez et al., 2022). Since initiation of the immune system occurs early in the oyster development (Song et al., 2016), this early microbiota association raises numerous questions about its impact on the immune system maturation. In *C. gigas*, a recent study showed that an early larval exposure to a non-infectious environmental microbiota can induce a systemic immune response, conferring a protection against the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS) that is triggered by the OsHV-1 µVar virus (Fallet et al., 2022). Remarkably, this early exposure resulted in a lifelong and intergenerational increased immune competency that persisted far beyond the initial exposure. The exposure impacted the diversity and shifted the composition of the oyster microbiota. This phenomenon was supported by a long-term reprogramming of immune gene expression within and across generations, and notably correlated with differential expression of conserved pathogen recognition receptors (PGRP, lectins, scavenger receptors, TLR, RLR, macrophage receptor), innate immune pathways (IFN-TLR-JAK/STAT pathways) and antimicrobial effectors (TNF, proteinases, SOD, interferon-stimulated genes, AMPs). Moreover, this phenotype was associated with a metabolic shift and heritable changes in epigenetic signatures (DNA methylation patterns) that are reminiscent of mechanisms underlying innate immune memory response in mammals and plants (Fanucchi et al., 2021; Lindermayr et al., 2020). The hypothesis beyond this microbiota-induced memory is a continuous reshaping of cellular signaling pathways and microbiota, which resulted in long-term heritable epigenetic imprinting (figure 2, left panel). This study thus perfectly illustrates the continuous cross-talk between host and microbiota and its role in disease susceptibility or resilience.

This study is also echoes with emerging concepts on the impact of environmental signals, either biotic or abiotic, on epigenetic changes responsible for heritable phenotypic outcomes (Aristizabal et al., 2020; Turner, 2009)(Yin, 2019) and on innate immune memory formation (also known as trained immunity) (Fanucchi et al., 2021; Lindermayr et al., 2020; McCoy et al., 2019). In mammals and arthropods, commensal microbiota was shown to shape immune capacities, not only at early stages, and to have a systemic effect on the immune response, inducing enhanced resistance towards a vast array of unrelated pathogens (Holt et al., 2021; Huang et al., 2020)(Abt, 2012; Sansone, 2015; Ichinohe, 2011; Hoang, 2022; Napflin, 2016; Erttman, 2022). These findings are reminiscent of evidence of symbiont-mediated immune priming (reviewed in (Prigot-Maurice et al., 2022)) showing the impact of beneficial symbionts on immune capacities. In *C. gigas*, long-term immune priming capacities were evidenced either using non-pathogenic bacteria or viral mimic pre-conditioning (Clerissi et al., 2020; Wang et al., 2020). These data confirmed that non-pathogenic microbial exposures can promote the generation of protective immunity, further suggesting complex interactions between microbiota and immunity and the potential for specific members of oyster microbiota to drive innate immune memory and support increased survival capacities.

Fatal breakdown of homeostasis: loss of control of the microbiota

Homeostasis is crucial to maintain internal stability and balance in the face of fluctuating environmental conditions. Studies on cnidarians nicely illustrate that the stability of the association between a host and its microbiota is crucial for health (Bourne et al., 2016) and to cope with the environment (Baldassarre et al., 2022; Voolstra and Ziegler, 2020). In humans, microbiota dysbiosis leads to disease development and progression, through dysregulation of community composition, modulation of host immune response, and induction of chronic inflammation (Hou et al., 2022).

As oysters are both osmoconformers and eurythermal, the microbial communities they host are naturally exposed to significant changes in temperature and osmolarity over days and seasons, two key factors that control the composition of microbial communities, either directly or indirectly, by modulating oyster physiology and immunity. Not surprisingly, healthy oysters – which exhibit extended physiological limits – also tolerate important variations in the structure of their microbiota (see Homeostasis section above) (figure 2, left panel). At the metaorganism level (the holobiont), this plasticity may contribute to oyster adaptation to rapidly changing environmental conditions, as they experience in intertidial coastal marine systems, although this remains to be demonstrated. However, the balance between a fluctuating microbiota and an effective but still tolerant immune system is fragile. Like in other animal species, a compromised homeostasis can have detrimental effects on oyster health by creating an unfavorable environment for the beneficial microbial populations and promoting the often irreversible proliferation of harmful microorganisms. Thus, in some instances temperature fluctuations, changes in salinity, antibiotic exposure or nutrient availability alter oyster physiology in a way that it affects their ability to maintain a stable internal environment (reviewed in (King et al., 2019)). Thereby environmental factors can contribute to the breakdown of homeostasis (figure 2, right panel). Thus, the highly dynamic composition of oyster hemolymph microbiota can be indicative of major changes in oyster health status. For instance, heat stress decreases the stability of the hemolymph microbiota in *C. gigas*, resulting in increased mortality in response to infections (Lokmer and Wegner, 2015). Particularly, destabilization of the oyster hemolymph microbiota can facilitate infection by *Vibrio* (Lokmer et al., 2016a). Dramatic events are actually observed when an abiotic stress co-occurs with an exposure to a pathogen. For instance, marine heat waves, *i.e.* "discrete prolonged anomalously warm water events", enable proliferation of

Vibrio in oyster tissues and lead to mass mortality events (Green et al., 2019). Similarly, shifts in temperature control the fatal outcome of *V. aesturianus* infections in oyster (Lupo et al., 2020). In this particular case, the bacterial microbiota shifts from highly diversified to dominated by one single species (Lasa et al., 2019; Parizadeh et al., 2018).

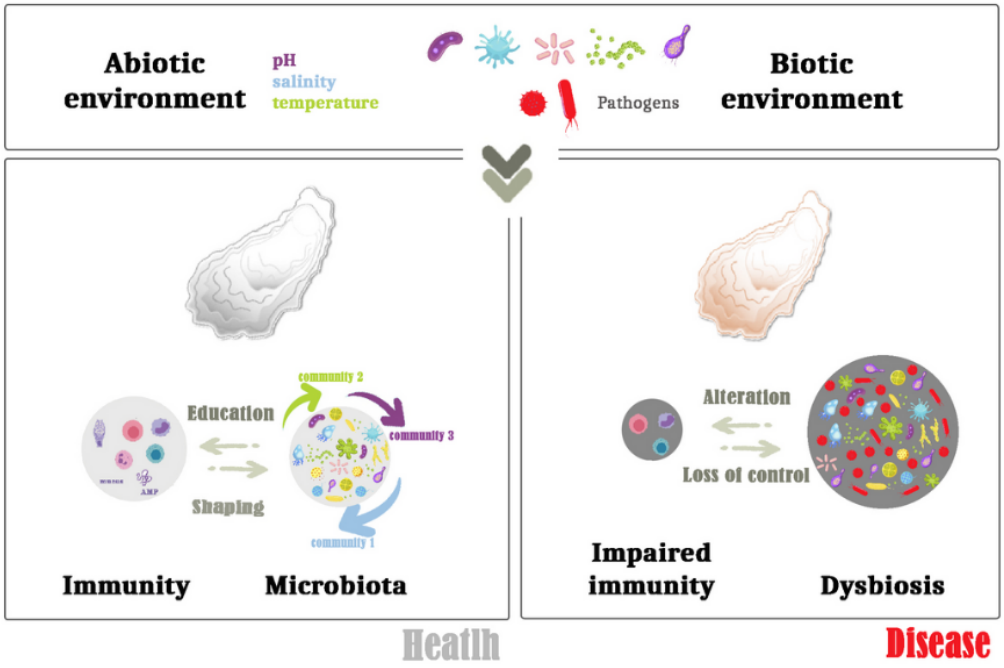


Figure 2. Environmental factors acting on the cross-talk between the oyster immune sytem and its microbiota.

One emblematic example of biotic and abiotic factors triggering dysbiosis and oyster death is the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), which is both polymicrobial and multifactorial (Petton et al., 2021, 2015). Important changes in the microbiota occur in response to infection with the OsHV-1 µVar virus when the seawater temperature raises above 16°C: the bacterial groups which are normally the most abundant tend to decrease while some rare and opportunistic species proliferate, particularly *Vibrio* (King et al., 2019) and *Arcobacter* (Lasa et al., 2019). Elucidating the sequence of events involved in POMS disease development by comparing resistant and susceptible oyster families revealed the central role played by microbiota homeostasis breakdown on the pathogenesis process (de Lorgeril et al., 2018b). The infection by OsHV-1 µVar triggers an immune-compromised state that induces microbiota dysbiosis and subsequent bacteraemia, ultimately leading to oyster death. Fatal dysbiosis is accompanied by invasion of the connective tissue by opportunistic bacteria and in particular *Vibrio* and *Arcobacter*, which are consistently associated with oyster death (Clerissi et al., 2023). The virus alters antibacterial defences by infecting hemocytes and compromising their function. OsHV-1 µVar alters more particularly AMP expression, which coincides with microbiota dysbiosis and loss of control of microbial communities 24 h after viral infection (de Lorgeril et al., 2018b). The sequence of events leading to dysbiosis and oyster death is conserved across infectious environments (Mediterreanean, Atlantic) and oyster genetic backgrounds (Clerissi et al., 2023). Moreover, using a combination of amplicon sequencing and metatranscriptomics, a core pathobiota assemblage was identified; it colonizes oysters during the secondary bacterial infection of oysters in POMS. Not only bacteria of the genera *Arcobacter* and *Vibrio*, but also *Amphritea, Marinobacterium, Marinomonas, Oceanospirillum* and *Pseudoalteromonas*, together represented up to 40% of the bacterial gene expression at the onset of oyster mortality. The transcriptional response of the pathobiota was conserved between environments with in particular an increase in translation and central metabolism processes, which might be involved in oyster tissue colonization. These bacterial genera overexpressed different metabolic pathways, reflecting differential use of the nutritive sources provided by

the diseased oyster host. This functional complementarity may explain the conservation of the POMS pathobiota.

Implications for applied Perspectives

Probiotics

Because of the versatility of oyster microbiota and the rapid disturbance of host genotype – microbial community associations upon external stress, it is has been argued that microbiota may be difficult to manipulate and use to improve oyster resistance to disease (Wegner et al., 2013). While this is certainly true, a number of results still argue in favor of a such a perspective. Indeed, oyster families with contrasting susceptibility to the POMS disease harbor different microbiota compositions (Clerissi et al., 2020; Dupont et al., 2020; King et al., 2019). Bacterial taxa Colwelliaceae, Cyanobacteria (Subsection III, family I), and Rhodobacteraceae are indeed significantly associated with oysters resistant to POMS disease (Clerissi et al., 2020). Such correlative approaches may help identify potential beneficial bacteria to be used in prophylactic measures.

A probiotic is by the definition of the Food and Agriculture Organization (FAO), a "live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confers a health benefit on the host" (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2016). The use of probiotic strains is already developed for animal production, and it is considered a promising eco-responsible and prophylactic alternative to antibiotics (Getachew, 2016). Probiotics can compete with pathogens by producing diverse antimicrobial substances (AMPs, antioxidant molecules), modulating the innate immune system, interfering with communication systems (quorum quenching effect), producing beneficial metabolites, and helping for nutrient adsorption (Khademzade et al., 2020). Regarding probiotics for oyster farming, two of the above strategies are being developed: the direct competition with pathogens and the modulation of the innate immune system (Yeh et al., 2020). For example, exposure of *C. gigas* larvae to *Pseudoalteromonas sp.* able to inhibit the growth of *V. coralliilyticus* improved larval survival during *V. coralliilyticus* infection (Madison et al., 2022). Similarly, the administration of *Streptomyces sp.* strains RL8 to juvenile *Crassostrea sikamea* oysters induced significantly higher weight gain and increased antioxidant activity (García-Bernal et al., 2019).

Microbial education & Immune priming

Another promising use of natural microorganisms as a tool to fight infectious diseases consists in educating the host immune system during its ontogenesis. It is expected that focusing on this crucial developmental stage will result in lifelong and eventually transgenerational beneficial immune properties. This microbial education has been illustrated in fish (Galindo-Villegas et al., 2012) and mollusks (Fallet et al., 2022). More studies will be critical for understanding basic mechanisms of early life host-microbiome interactions and bases of developmental plasticity of the immune system in oysters and how they may be translated into applications. It will require to further explore how this cross talk between host and microbiota is established during development, emphasizing critical temporal windows, and precisely define the contributions of specific microbial species of oyster origin to early life immune imprinting and conditioning of later health and disease. The recent study on the impact of oyster microbiota on immune capacities helped identify taxa and species overrepresented in exposed oysters (Rhodobacteraceae, Halomonadaceae, Shewanellaceae, and Oceanospirillaceae) that could help develop microbiome-based therapeutics applied at early life (Fallet et al.,

2022). Elucidating the exact molecular relationship between microbe-derived metabolites, host immune signaling pathways, epigenetic modifications and host physiology will also be essential. Collectively, all this information could help identifying microbiota species or key regulators that could be used to modulate immune responses and will support inform disease mitigating strategies.

In addition, a growing body of evidence supports the notion that the innate immune system shows memory traits providing a survival advantage within and across generations (Gourbal et al., 2018). In mollusks and oysters, data are accumulating revealing the existence of immune plasticity and memory capacities (Fallet et al., 2022; Lafont et al., 2020, 2019; Yang et al., 2021). Building on these properties could help design pseudo-vaccination strategies based on nonpathogenic microbial exposures to promote the generation of protective immunity on individuals and on their offspring.

Acknowledgments

Please acknowledge anyone who contributed to the study but did not meet the authorship criteria. Please also list the source of funding for each author (and also enter this during the submission process).

References

Ansaldo, E., Farley, T.K., Belkaid, Y., 2021. Control of Immunity by the Microbiota. Annu. Rev. Immunol. 39, 449–479. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-112348

Aristizabal, M.J., Anreiter, I., Halldorsdottir, T., Odgers, C.L., McDade, T.W., Goldenberg, A., Mostafavi, S., Kobor, M.S., Binder, E.B., Sokolowski, M.B., O'Donnell, K.J., 2020. Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 117, 23261–23269. https://doi.org/10.1073/pnas.1820838116

Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Amenyogbe, N., Brown, E.M., Finlay, B., 2014. The Intestinal Microbiome in Early Life: Health and Disease. Front. Immunol. 5. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00427

Bachere, E., Rosa, R.D., Schmitt, P., Poirier, A.C., Merou, N., Charriere, G.M., Destoumieux-Garzon, D., 2015. The new insights into the oyster antimicrobial defense: Cellular, molecular and genetic view. Fish Shellfish Immunol 46. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.040

Baldassarre, L., Ying, H., Reitzel, A.M., Franzenburg, S., Fraune, S., 2022. Microbiota mediated plasticity promotes thermal adaptation in the sea anemone Nematostella vectensis. Nat Commun 13, 3804. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31350-z

Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Nature Reviews Microbiology 9, 356–368. https://doi.org/10.1038/nrmicro2546

Bourne, D.G., Morrow, K.M., Webster, N.S., 2016. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. Annu. Rev. Microbiol. 70, 317–340. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440

Braun, P.C., Brousseau, D.J., Lecleir, G.R., 2019. Microbial Inhibition by Bacteria Isolated from Pallial Cavity Fluids and Associated Mucus of the Eastern Oyster Crassostrea virginica (Gmelin). Journal of Shellfish Research 38, 565. https://doi.org/10.2983/035.038.0307

Broderick, N.A., Buchon, N., Lemaitre, B., 2014. Microbiota-Induced Changes in Drosophila melanogaster Host Gene Expression and Gut Morphology. mBio 5, e01117-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01117-14

Brousseau, D.J., Braun, P.C., Harper-Leatherman, A.S., Sullivan, E., Baglivo, J.A., 2014. Antimicrobial Activity in the Pallial Cavity Fluids of the Oyster Crassostrea virginica (Gmelin) from a Highly Impacted Harbor in Western Long Island Sound. Journal of Shellfish Research 33, 719–725. https://doi.org/10.2983/035.033.0306

Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.M., Gueguen, Y., Dégremont, L., Mitta, G., Toulza, E., 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. Frontiers in Microbiology 11, 1–11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00311

Clerissi, C., Luo, X., Lucasson, A., Mortaza, S., de Lorgeril, J., Toulza, E., Petton, B., Escoubas, J.-M., Dégremont, L., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Jacq, A., Mitta, G., 2023. A core of functional complementary bacteria infects oysters in Pacific Oyster Mortality Syndrome. anim microbiome 5, 26. https://doi.org/10.1186/s42523-023-00246-8

de Lorgeril, J., Escoubas, J.M., Loubiere, V., Pernet, F., Le Gall, P., Vergnes, A., Aujoulat, F., Jeannot, J.L., Jumas-Bilak, E., Got, P., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Bachère, E., 2018a. Inefficient immune response is associated with microbial permissiveness in juvenile oysters affected by mass mortalities on field. Fish and Shellfish Immunology 77, 156–163. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.027

de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Pérignon, A., Régler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018b. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. Nature Communications 9, 4215–4215. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3

De San Nicolas, N., Asokan, A., Rosa, R.D., Voisin, S.N., Travers, M.-A., Rocha, G., Dantan, L., Dorant, Y., Mitta, G., Petton, B., Charrière, G.M., Escoubas, J.-M., Boulo, V., Pouzadoux, J., Meudal, H., Loth, K., Aucagne, V., Delmas, A.F., Bulet, P., Montagnani, C., Destoumieux-Garzón, D., 2022. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. Marine Drugs 20, 745–745. https://doi.org/10.3390/md20120745

Desriac, F., El Harras, A., Simon, M., Bondon, A., Brillet, B., Le Chevalier, P., Pugnière, M., Got, P., Destoumieux-Garzon, D., Fleury, Y., 2020. Alterins Produced by Oyster-Associated Pseudoalteromonas Are Antibacterial Cyclolipopeptides with LPS-Binding Activity. Marine drugs 18, 630–630. https://doi.org/10.3390/md18120630

Desriac, F., Le Chevalier, P., Brillet, B., Leguerinel, I., Thuillier, B., Paillard, C., Fleury, Y., 2014. Exploring the hologenome concept in marine bivalvia: Haemolymph microbiota as a pertinent source of probiotics for aquaculture. FEMS Microbiology Letters 350, 107–116. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12308

Destoumieux-Garzón, D., Rosa, R.D., Schmitt, P., Barreto, C., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G., Gueguen, Y., Bachère, E., 2016. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 371. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0300

Duperron, S., Gaudron, S.M., Rodrigues, C.F., Cunha, M.R., Decker, C., Olu, K., 2012. An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea (preprint). Biodiversity and Ecosystem Function: Marine. https://doi.org/10.5194/bgd-9-16815-2012

Dupont, S., Lokmer, A., Corre, E., Auguet, J.-C., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Tanguy, G., Pecqueur, D., Salmeron, C., Guillou, L., Desnues, C., La Scola, B., Bou Khalil, J., de Lorgeril, J., Mitta, G., Gueguen, Y., Escoubas, J.-M., 2020. Oyster hemolymph is a complex and dynamic ecosystem hosting bacteria, protists and viruses. Animal Microbiome 2. https://doi.org/10.1186/s42523-020-00032-w

Escoubas, J.-M., Gourbal, B., Duval, D., Green, T.J., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., Montagnani, C., 2016. Immunity in Molluscs, Academic P. ed, Encyclopedia of immunobiology. Elseviers Ltd, Oxford. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.12004-1

Fallet, M., Montagnani, C., Petton, B., Dantan, L., de Lorgeril, J., Comarmond, S., Chaparro, C., Toulza, E., Boitard, S., Escoubas, J.-M., Vergnes, A., Le Grand, J., Bulla, I., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., Grunau, C., Mitta, G., Cosseau, C., 2022. Early life microbial exposures shape the Crassostrea gigas immune system for lifelong and intergenerational disease protection. Microbiome 10, 1–21. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01280-5

Fanucchi, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Mhlanga, M.M., 2021. The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. Immunity 54, 32–43. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.011

Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2016. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.

Franzenburg, S., Walter, J., Künzel, S., Wang, J., Baines, J.F., Bosch, T.C.G., Fraune, S., 2013. Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, E3730-E3738-E3730–E3738. https://doi.org/10.1073/pnas.1304960110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1304960110

Galindo-Villegas, J., García-Moreno, D., de Oliveira, S., Meseguer, J., Mulero, V., 2012. Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109. https://doi.org/10.1073/pnas.1209920109

García-Bernal, M., Medina-Marrero, R., Campa-Córdova, Á.I., Mazón-Suástegui, J.M., 2019. Growth and antioxidant response of juvenile oysters Crassostrea sikamea and Crassostrea corteziensis treated with Streptomyces strains. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 71, 1993–1998. https://doi.org/10.1590/1678-4162-11225

Garland, C.D., Nash, G.V., McMeekin, T.A., 1982. Absence of surface-associated microorganisms in adult oysters (Crassostrea gigas). Appl Environ Microbiol 44, 1205–1211. https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1205-1211.1982

Gensollen, T., Iyer, S.S., Kasper, D.L., Blumberg, R.S., 2016. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. Science 352, 539–544. https://doi.org/10.1126/science.aad9378

Gerdol, M., Schmitt, P., Venier, P., Rocha, G., Rosa, R.D., Destoumieux-Garzón, D., 2020. Functional Insights From the Evolutionary Diversification of Big Defensins. Frontiers in Immunology 11, 1–16. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00758

Getachew, T., 2016. A Review on Effects of Probiotic Supplementation in Poultry Performance and Cholesterol Levels of Egg and Meat.

Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugnière, M., Roquet, F., Escoubas, J.-M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Sauné, L., Bulet, P., Bachère, E., 2007. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the Crassostrea gigas Cg-BPI. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 17759–17764. https://doi.org/10.1073/pnas.0702281104

González, R., Gonçalves, A.T., Rojas, R., Brokordt, K., Rosa, R.D., Schmitt, P., 2020. Host Defense Effectors Expressed by Hemocytes Shape the Bacterial Microbiota From the Scallop Hemolymph. Frontiers in Immunology 11, 1–13. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599625

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G.J.M., Van Der Meer, J.W.M., Conrath, U., Netea, M.G., 2018. Innate immune memory: An evolutionary perspective. Immunol Rev 283, 21–40. https://doi.org/10.1111/imr.12647

Green, T.J., Siboni, N., King, W.L., Labbate, M., Seymour, J.R., Raftos, D., 2019. Simulated Marine Heat Wave Alters Abundance and Structure of Vibrio Populations Associated with the Pacific Oyster Resulting in a Mass Mortality Event. Microbial Ecology 77, 736–747. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1242-9

Gros, O., Elisabeth, N.H., Gustave, S.D.D., Caro, A., Dubilier, N., 2012. Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid Codakia orbiculata (Mollusca: Bivalvia): Symbiont acquisition in lucinid clams. Environmental Microbiology 14, 1584–1595. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02748.x

Hanson, M.A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., Lemaître, B., 2019. Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach (eLife (2019) 8 PII: e48778). eLife 8, 1–24. https://doi.org/10.7554/eLife.48778

Harwood, C.S., Canale-Parola, E., 1984. ECOLOGY OF SPIROCHETES. Ann. Rev. Microbiol. 38.

Hines, I.S., Markov Madanick, J., Smith, S.A., Kuhn, D.D., Stevens, A.M., 2023. Analysis of the core bacterial community associated with consumer-ready Eastern oysters (Crassostrea virginica). PLoS ONE 18, e0281747. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281747

Holt, C.C., Bass, D., Stentiford, G.D., van der Giezen, M., 2021. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. Journal of Invertebrate Pathology 186, 107387. https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387

Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336, 1268–1273. https://doi.org/10.1126/science.1223490

Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J., Chen, Z.-S., 2022. Microbiota in health and diseases. Sig Transduct Target Ther 7, 135. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4

Huang, Z., Zeng, S., Xiong, J., Hou, D., Zhou, R., Xing, C., Wei, D., Deng, X., Yu, L., Wang, H., Deng, Z., Weng, S., Kriengkrai, S., Ning, D., Zhou, J., He, J., 2020. Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. Microbiome 8, 32. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00802-3

Jarchum, I., Pamer, E.G., 2011. Regulation of innate and adaptive immunity by the commensal microbiota. Current Opinion in Immunology 23, 353–360. https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.001

Kelly, C., Salinas, I., 2017. Under Pressure: Interactions between Commensal Microbiota and the Teleost Immune System. Front. Immunol. 8, 559. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00559

Kennedy, Victor S., Newell, Roger I. E., Eble, Albert F., Leffler, Merrill (Production editor), Harpe, Sandy Rodgers (Designer), 1996. The eastern oyster Crassostrea virginica.

Khademzade, O., Zakeri, M., Haghi, M., Mousavi, S.M., 2020. The effects of water additive *Bacillus cereus* and *Pediococcus acidilactici* on water quality, growth performances, economic benefits, immunohematology and bacterial flora of whiteleg shrimp *(Penaeus vannamei* Boone, 1931) reared in earthen ponds. Aquac Res 51, 1759–1770. https://doi.org/10.1111/are.14525

King, W.L., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2019. Oyster disease in a changing environment: Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment. Marine Environmental Research 143, 124–140. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007

King, W.L., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K.R., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2020. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. FEMS Microbiology Ecology 96, fiaa054. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa054

Labreuche, Y., Soudant, P., Goncalves, M., Lambert, C., Nicolas, J., 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 & Comparative Immunology 30, 367–379. https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.003

Lafont, M., Goncalves, P., Guo, X., Montagnani, C., Raftos, D., Green, T., 2019. Transgenerational plasticity and antiviral immunity in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) against Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). Developmental & Comparative Immunology 91, 17–25. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.022

Lafont, M., Vergnes, A., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Haffner, P., Petton, B., Chaparro, C., Barrachina, C., Destoumieux-Garzon, D., Mitta, G., Gourbal, B., Montagnani, C., 2020. A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, Crassostrea gigas. mBio

11, 1–17. https://doi.org/10.1128/mBio.02777-19

Lasa, A., di Cesare, A., Tassistro, G., Borello, A., Gualdi, S., Furones, D., Carrasco, N., Cheslett, D., Brechon, A., Paillard, C., Bidault, A., Pernet, F., Canesi, L., Edomi, P., Pallavicini, A., Pruzzo, C., Vezzulli, L., 2019. Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. Environmental Microbiology 21, 4548–4562. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14750

Lindermayr, C., Rudolf, E.E., Durner, J., Groth, M., 2020. Interactions between metabolism and chromatin in plant models. Molecular Metabolism 38, 100951. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.015

Liu, X., Nagy, P., Bonfini, A., Houtz, P., Bing, X.-L., Yang, X., Buchon, N., 2022. Microbes affect gut epithelial cell composition through immune-dependent regulation of intestinal stem cell differentiation. Cell Reports 38, 110572. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110572

Lokmer, A., Goedknegt, M.A., Thieltges, D.W., Fiorentino, D., Kuenzel, S., Baines, J.F., Mathias Wegner, K., 2016a. Spatial and temporal dynamics of pacific oyster hemolymph microbiota across multiple scales. Frontiers in Microbiology 7, 1–18. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01367

Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J.F., Wegner, K.M., 2016b. The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. Environmental Microbiology 18, 970–987. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13163

Lokmer, A., Wegner, K.M., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. ISME Journal 9, 670–682. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160

Loth, K., Vergnes, A., Barreto, C., Voisin, S.N., Meudal, H., Silva, D., Bressan, A., Bulet, P., Touqui, L., Delmas, A.F., Destoumieux-Garzón, D., 2019. The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets Karine. mBio 10:e01821-19. https://doi.org/10.1128/mBio.01821-19

Lupo, C., Dutta, B., Petton, S., Ezanno, P., Tourbiez, D., Travers, M., Pernet, F., Bacher, C., 2020. Spatial epidemiological modelling of infection by Vibrio aestuarianus shows that connectivity and temperature control oyster mortality. Aquacult. Environ. Interact. 12, 511–527. https://doi.org/10.3354/aei00379

Madison, D., Schubiger, C., Spencer, L., Mueller, R.S., Lagdon, C., 2022. A marine probiotic treatment against the bacterial pathogen Vibrio coralliilyticus to improve the performance of Pacific (Crassostrea gigas) and Kumamoto (C. sikamea) oyster larvae. BioRxiv. https://doi.org/: https://doi.org/10.1101/2022.05.09.491202

Marra, A., Hanson, M.A., Kondo, S., Erkosar, B., Lemaitre, B., 2021. Drosophila Antimicrobial Peptides and Lysozymes Regulate Gut Microbiota Composition and Abundance. mBio 12. https://doi.org/10.1128/mBio.00824-21

McCoy, K.D., Burkhard, R., Geuking, M.B., 2019. The microbiome and immune memory formation. Immunol Cell Biol 97, 625–635. https://doi.org/10.1111/imcb.12273

McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C.G., Carey, H.V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A.H., Kremer, N., Mazmanian, S.K., Metcalf, J.L., Nealson, K., Pierce, N.E., Rawls, J.F., Reid, A., Ruby, E.G., Rumpho, M., Sanders, J.G., Tautz, D., Wernegreen, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 3229–3236. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110

Miani, M., Le Naour, J., Waeckel-Enée, E., Verma, S. chand, Straube, M., Emond, P., Ryffel, B., van Endert, P., Sokol, H., Diana, J., 2018. Gut Microbiota-Stimulated Innate Lymphoid Cells Support β-Defensin

14 Expression in Pancreatic Endocrine Cells, Preventing Autoimmune Diabetes. Cell Metabolism 28, 557-572.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.012

Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzet, M., Roch, P., 2000. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. Journal of Cell Science 113, 2759–2769.

Offret, C., Gauthier, O., Despréaux, G., Bidault, A., Corporeau, C., Miner, P., Petton, B., Pernet, F., Fabioux, C., Paillard, C., Le Blay, G., 2023. Microbiota of the Digestive Glands and Extrapallial Fluids of Clams Evolve Differently Over Time Depending on the Intertidal Position. Microb Ecol 85, 288–297. https://doi.org/10.1007/s00248-022-01959-0

Offret, C., Paulino, S., Gauthier, O., Château, K., Bidault, A., Corporeau, C., Miner, P., Petton, B., Pernet, F., Fabioux, C., Paillard, C., Blay, G.L., 2020. The marine intertidal zone shapes oyster and clam digestive bacterial microbiota. FEMS Microbiology Ecology 96, fiaa078. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa078

Oyanedel, D., Labreuche, Y., Bruto, M., Amraoui, H., Robino, E., Haffner, P., Rubio, T., Charrière, G.M., Le Roux, F., Destoumieux-Garzón, D., 2020. Vibrio splendidus O-antigen structure: a trade-off between virulence to oysters and resistance to grazers. Environmental Microbiology 00. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14996

Oyanedel, D., Lagorce, A., Bruto, M., Haffner, P., Morot, A., Dorant, Y., de La Forest Divonne, S., Delavat, F., Inguimbert, N., Montagnani, C., Morga, B., Toulza, E., Chaparro, C., Escoubas, J.-M., Labreuche, Y., Gueguen, Y., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Petton, B., Degremont, L., Tourbiez, D., Pimparé, L.-L., Leroy, M., Romatif, O., Pouzadoux, J., Mitta, G., Roux, F.L., Charrière, G.M., Travers, M.-A., Destoumieux-Garzón, D., 2023. Cooperation and cheating orchestrate *Vibrio* assemblages and polymicrobial synergy in oysters infected with OsHV-1 virus. BioRxiv. https://doi.org/10.1101/2023.02.11.528104

Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K.M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Arzul, I., 2022. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. Current Opinion in Biotechnology 73, 225–232. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.026

Pales Espinosa, E., Koller, A., Allam, B., 2016. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, Crassostrea virginica. Journal of Proteomics 132, 63–76. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018

Parizadeh, L., Tourbiez, D., Garcia, C., Haffner, P., Dégremont, L., Le Roux, F., Travers, M.A., 2018. Ecologically realistic model of infection for exploring the host damage caused by Vibrio aestuarianus. Environmental Microbiology 20, 4343–4355. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14350

Petton, B., Bruto, M., James, A., Labreuche, Y., Alunno-Bruscia, M., Le Roux, F., 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, 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00686

Petton, B., Destoumieux-Garzon, D., Pernet, F., Toulza, E., de Lorgeril, J., Degremont, L., Mitta, G., 2021. The Pacific Oyster Mortality Syndrome , a Polymicrobial and Multifactorial Disease : State of Knowledge and Future Directions. Frontiers in Immunology 12, 1–10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630343

Pimentel, Z.T., Dufault-Thompson, K., Russo, K.T., Scro, A.K., Smolowitz, R.M., Gomez-Chiarri, M., Zhang, Y., 2021. Microbiome Analysis Reveals Diversity and Function of *Mollicutes* Associated with the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. mSphere 6, e00227-21. https://doi.org/10.1128/mSphere.00227-21

Poirier, A.C., Schmitt, P., Rosa, R.D.R.D., Vanhove, A.S., Kieffer-Jaquinod, S., Rubio, T.P., Charriere, G.M., Destoumieux-Garzon, D., 2014. Antimicrobial Histones and DNA Traps in Invertebrate Immunity: EVIDENCES IN CRASSOSTREA GIGAS. Journal of Biological Chemistry 289, 24821–24831. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576546

Prigot-Maurice, C., Beltran-Bech, S., Braquart-Varnier, C., 2022. Why and how do protective symbionts impact immune priming with pathogens in invertebrates? Developmental & Comparative Immunology 126, 104245. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104245

Rader, B., McAnulty, S.J., Nyholm, S.V., 2019. Persistent symbiont colonization leads to a maturation of hemocyte response in the *Euprymna scolopes* / *Vibrio fischeri* symbiosis. MicrobiologyOpen 8. https://doi.org/10.1002/mbo3.858

Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol 9, 313–323. https://doi.org/10.1038/nri2515

Rubio, T., Oyanedel, D., Labreuche, Y., Toulza, E., Luo, X., Bruto, M., Chaparro, C., Torres, M., de Lorgeril, J., Haffner, P., Vidal-Dupiol, J., Lagorce, A., Petton, B., Mitta, G., Jacq, A., Le Roux, F., Charrière, G.M., Destoumieux-Garzón, D., 2019. Species-specific mechanisms of cytotoxicity toward immune cells determine the successful outcome of Vibrio infections. Proceedings of the National Academy of Sciences 201905747–201905747. https://doi.org/10.1073/pnas.1905747116

Scanes, E., Parker, L.M., Seymour, J.R., Siboni, N., Dove, M.C., O'Connor, W.A., Ross, P.M., 2021a. Microbiomes of an oyster are shaped by metabolism and environment. Sci Rep 11, 21112. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00590-2

Scanes, E., Parker, L.M., Seymour, J.R., Siboni, N., King, W.L., Danckert, N.P., Wegner, K.M., Dove, M.C., O'Connor, W.A., Ross, P.M., 2021b. Climate change alters the haemolymph microbiome of oysters. Marine Pollution Bulletin 164, 111991. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.111991

Scanes, E., Parker, L.M., Seymour, J.R., Siboni, N., King, W.L., Wegner, K.M., Dove, M.C., O'Connor, W.A., Ross, P.M., 2021c. Microbiome response differs among selected lines of Sydney rock oysters to ocean warming and acidification. FEMS Microbiology Ecology 97, fiab099. https://doi.org/10.1093/femsec/fiab099

Schmitt, P., Lorgeril, J.D., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzón, D., Bachère, E., 2012a. Expression, tissue localization and synergy of antimicrobial peptides and proteins in the immune response of the oyster Crassostrea gigas. Developmental and Comparative Immunology 37, 363–370. https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.01.004

Schmitt, P., Rosa, R.D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2012b. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. Frontiers in Microbiology 3, 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00160

Schmitt, P., Wilmes, M., Pugniere, M., Bachere, E., Sahl, H., Schneider, T., Destoumieux-Garzon, D., 2010. Insight into Invertebrate Defensin Mechanism of Action. J. Biol. Chem. 285, 29208–29216. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143388

Song, X., Wang, H., Xin, L., Xu, J., Jia, Z., Wang, L., Song, L., 2016. The immunological capacity in the larvae of Pacific oyster Crassostrea gigas. Fish & Shellfish Immunology 49, 461–469. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.009

Song, X., Xin, X., Wang, H., Li, H., Zhang, H., Jia, Z., Liu, C., Jiang, S., Wang, L., Song, L., 2019. A single-CRD C-type lectin (CgCLec-3) with novel DIN motif exhibits versatile immune functions in Crassostrea gigas. Fish & Shellfish Immunology 92, 772–781. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.001

Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F., Boulo, V., 2007. Expression of immune-related genes in the oyster Crassostrea gigas during ontogenesis. Developmental & Comparative Immunology 31, 859–873. https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.005

Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J.M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Romero, J., 2014. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis* , *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. FEMS Microbiol Ecol 88, 69–83. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12270

Turner, B.M., 2009. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. Phil. Trans. R. Soc. B 364, 3403–3418. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0125

Unzueta-Martínez, A., Scanes, E., Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W., Bowen, J.L., 2022. Microbiomes of the Sydney Rock Oyster are acquired through both vertical and horizontal transmission. anim microbiome 4, 32. https://doi.org/10.1186/s42523-022-00186-9

Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., Pruzzo, C., 2018. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (Crassostrea gigas) and the Mediterranean Mussel (Mytilus galloprovincialis) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). Microb Ecol 75, 495–504. https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6

Voolstra, C.R., Ziegler, M., 2020. Adapting with Microbial Help: Microbiome Flexibility Facilitates Rapid Responses to Environmental Change. BioEssays 42, 2000004. https://doi.org/10.1002/bies.202000004

Wang, W., Wang, L., Liu, Z., Song, X., Yi, Q., Yang, C., Song, L., 2020. The involvement of TLR signaling and anti-bacterial effectors in enhanced immune protection of oysters after Vibrio splendidus pre-exposure. Developmental & Comparative Immunology 103, 103498. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103498

Wang, X.-W., Xu, J.-D., Zhao, X.-F., Vasta, G.R., Wang, J.-X., 2014. A Shrimp C-type Lectin Inhibits Proliferation of the Hemolymph Microbiota by Maintaining the Expression of Antimicrobial Peptides. Journal of Biological Chemistry 289, 11779–11790. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552307

Wegner, K.M., Volkenborn, N., Peter, H., Eiler, A., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. BMC Microbiology 13. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-252

Weiss, B.L., Wang, J., Aksoy, S., 2011. Tsetse Immune System Maturation Requires the Presence of Obligate Symbionts in Larvae. PLoS Biol 9, e1000619. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000619

Wongpanya, R., Sengprasert, P., Amparyup, P., Tassanakajon, A., 2017. A novel C-type lectin in the black tiger shrimp Penaeus monodon functions as a pattern recognition receptor by binding and causing bacterial agglutination. Fish & Shellfish Immunology 60, 103–113. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.042

Yang, W., Tran, N.T., Zhu, C.-H., Yao, D.-F., Aweya, J.J., Gong, Y., Ma, H.-Y., Zhang, Y.-L., Li, G.-L., Li, S.-K., 2021. Immune priming in shellfish: A review and an updating mechanistic insight focused on cellular and humoral responses. Aquaculture 530, 735831. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735831

Yeh, H., Skubel, S.A., Patel, H., Cai Shi, D., Bushek, D., Chikindas, M.L., 2020. From Farm to Fingers: an Exploration of Probiotics for Oysters, from Production to Human Consumption. Probiotics and Antimicrobial Proteins 12, 351–364. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09629-3

Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.-S., Blanot, D., Oh, B.-H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B., 2006. The Drosophila Amidase PGRP-LB Modulates the Immune

Response to Bacterial Infection. Immunity 24, 463–473. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.012

Zhang, Guofan, Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, Jiafeng, Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, Shoudu, Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Yingxiang, Li, Na, Wang, Jinpeng, Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, Hailong, Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, Shu, Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, Junyi, Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, Ning, Qian, L., Zhang, Guojie, Li, Yingrui, Yang, Huanming, Liu, X., Wang, Jian, Yin, Y., Wang, Jun, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490, 49–54. https://doi.org/10.1038/nature11413

Zhang, Y.-X., Zhang, M.-L., Wang, X.-W., 2021. C-Type Lectin Maintains the Homeostasis of Intestinal Microbiota and Mediates Biofilm Formation by Intestinal Bacteria in Shrimp. The Journal of Immunology 206, 1140–1150. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000116

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

Valorisations:

- **Publications scientifiques:**

(1) De San Nicolas N, Asokan A, Rosa RD, Voisin SN, Travers MA, Rocha G, Dantan L, Dorant Y, Mitta G, Petton B, Charrière GM, Escoubas JM, Boulo V, Pouzadoux J, Meudal H, Loth K, Aucagne V, Delmas AF, Bulet P, Montagnani C, Destoumieux-Garzón D. Functional Diversification of Oyster Big Defensins Generates Antimicrobial Specificity and Synergy against Members of the Microbiota. Mar Drugs. 2022 Nov 26;20(12):745. doi: 10.3390/md20120745. PMID: 36547892; PMCID: PMC9786018.

(2) De San Nicolas.N, Jouault A, Asokan A, Touqui L,El Fannassi I, Romatif O, Loth K, Aucagne V, Delmas AF, Bulet P, Montagnani C, Charrière GM, Destoumieux-Garzón D. Teichoic acids play a key role in the antibacterial activity of big defensins against Staphylococcus aureus. *En preparation.*

(3) Destoumieux-Garzón D, Montagnani C, Escoubas JM, Dantan L, De San Nicolas N, Travers MA, Toulza E, Mitta G, Cosseau C, Cross-talk and mutual shaping between the immune system and the microbiota during an oyster's life. Philosophical transactions B. *En preparation.*

- **Communications:**

(1) De San Nicolas.N., Asokan A, Voisin SN, Delmas AF, Aucagne V, Travers MA, Garcia C, Dantan L, Cosseau C, Touqui L, Charrière GM, Rosa RD, Montagnani C, Bulet P & Destoumieux-Garzón D. Role og Big défensins in the control of oyster microbiota. Aux journées MuFoPAM 2021, le 28 et 29 octobre 2021 à Marseille. *(Présentation d'un poster).*

(2) Asokan, A., N. de San Nicolas, H. Meudal, K. Loth, D. Destoumieux-Garzón, A. F. Delmas and V. Aucagne (2022). CONGRES Enabling the synthesis of hydrophobic proteins using NCL-labile solubilizing tags: a case study of Crassostrea gigas big defensin 3. 22nd GFPP / BPGM5, French-Belgian Joint Meeting, Port Leucate, France, 29 MAI 3 JUIN 2022. hal-03976595v1.

(3) De San Nicolas, N., R. Rosa, C. Montagnani and D. Destoumieux-Garzon (2022). Functional diversity of oyster big defensins (project DEPTH). KIM Sea & Coast 2022 Days, Sète, France, 27-28 sept 2022. *(Présentation orale).*

(4) De San Nicolas N, Asokan A, Rosa RD, Voisin SN, Travers MA, Rocha G, Aucagne V, Garcia C, Dantan L, Charrière GM, Escoubas JM, Boulo V, Delmas AF, Bulet P, Montagnani C, & Destoumieux-Garzón D. Functional diversification of Big defensins and the shaping of oyster microbiota. Au 7th International Symposium on Antimicrobial peptides, AMP2022, du 7 au 9 novembre 2022, Institut Pasteur, Paris, France. hal-03976756v1. *(Présentation orale).*

(5) De San Nicolas, N., C. Montagnani, G. Charrière, M. A. Travers, J. M. Escoubas, O. Romatif, V. Boulo, Y. Dorant, E. Toulza and D. Destoumieux-Garzón (2023). WORKSHOP IHPE-Antimicrobial peptides in oyster health and disease. Workshop Mollusques marins - santé - environnement, 13 & 23/03/2023.

Formations suivies dans le cadre de la these :

- Ecole thématique PAMOMICS (du 09/05/2022 au 14/05/2022)
- Metabarcoding 2021 (du 13/12/2021 au 18/12/2021)
- MOOC Ethique de la recherche (01/12/2021)
- MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (01/09/2021)
- Communication scientifique en Anglais (du 18/10/2021 au 27/01/2022)

Co-Encadrememement :

Stagiaire de 1ère année en Master Igenerie Biomoléculaire et nanobiotechnologie (IBION-TEC) à l'Université de Montpellier (Imanne El fannassi). Encadrant principal Guillaume Charrière.

Enseignement :

- Intervention en Master IMHE, Université de Montpellier, Unité d'enseignement HAA938V. Rôle des microorganismes dans le fonctionnement des écosystèmes en 2021. (1,5 h de cours magistraux)
- Intervention en Master IMHE, Université de Montpellier, Unité d'enseignement HAA923V. Interactions des micro-organismes avec l'homme, les animaux et les plantes en 2022. (1,5 h de cours magistraux)
-

Responsabilité au laboratoire :

- Membre élue au Conseil de Laboratoire (collège A Chercheurs et Enseignants-Chercheurs, sous-collège non-permanents).
- Membre de la Cellule Parité et Qualité de Vie au Travail (QVT).

-

Résumé : Diversité fonctionnelle et mécanisme d'action des Big défensines, peptides antimicrobiens de l'huître *Crassostrea gigas*. Les Big défensines sont une famille de peptides antimicrobiens (AMPs) répandus chez les mollusques qui se caractérisent par une structure originale comprenant un domaine C-terminal de type β-défensine lié à un domaine N-terminal hydrophobe sans homologie avec des protéines connues. Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, sept gènes codant des Big défensines ont été identifiés. Cependant, le rôle de la diversification des Big défensines reste à élucider d'un point de vue fonctionnel. Des études récentes ont révélé une fonction potentielle des Big défensines chez l'huître dans le contexte du Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), une maladie polymicrobienne qui affecte les élevages depuis 2008. L'inhibition observée de l'expression de certaines *Cg*-BigDefs chez les huîtres sensibles à la maladie a en effet suggéré que les *Cg*-BigDefs pourraient jouer un rôle dans le contrôle du microbiote. Mes travaux de thèse ont porté sur (1) l'étude de la diversification fonctionnelle des *Cg*-BigDefs, et notamment leur rôle dans le contrôle du microbiote de *C. gigas* et (2) l'étude du mécanisme d'action de *Cg*-BigDef1. Grâce à la synthèse totale de *Cg*-BigDef1 et *Cg*-BigDef5 et à la constitution d'une collection de bactéries cultivables du microbiote de *C. gigas*, nous avons pu montrer que la diversification des *Cg*-BigDefs a permis d'élargir le spectre d'activité de cette famille d'AMPs. Ceci se vérifie au travers d'une diversification des cibles (souches bactériennes sensibles) et d'activités synergiques entre variants de la famille des *Cg*-BigDefs. La modulation fine du microbiote de l'huître par les *Cg*-BigDefs a pu être vérifiée *in vivo* par métabarcoding 16S pour *Cg*-BigDef1. La recherche des cibles moléculaires de *Cg*-BigDef1 a été entreprise chez *Staphylococcus aureus*. A l'aide de méthodes complémentaires et innovantes (chimie click, microscopie à haute résolution et utilisation de mutants isogoniques), nous avons montré que les acides teichoïques (polymères clés de la paroi cellulaire) de *S. aureus* jouent un rôle déterminant dans l'activité antibactérienne de *Cg*-BigDef1. L'interaction avec les acides teichoïques fait intervenir le domaine N-terminal de *Cg*-BigDef1 qui rapproche le domaine C-terminal de la paroi bactérienne. Ces différents résultats permettent aujourd'hui de mieux comprendre la diversité structurale des Big défensines d'un point de vue fonctionnel et fournissent des informations sur leur rôle dans le façonnage du microbiote de l'huître et sur les mécanismes d'action qui sous-tendent leurs activités antibactériennes.
Mot clés : Peptides antimicrobiens, Big défensine, Crassostrea gigas, microbiote, mécanisme d'action
Abstract: Functional diversity and mechanism of action of Big defensins, antimicrobial peptides from the oyster *Crassostrea gigas*. Big defensins are a family of antimicrobial peptides (AMPs) widespread in molluscs, characterized by a unique structure comprising a β-defensin-like C-terminal domain linked to a hydrophobic N-terminal domain with no homology to known proteins. In the oyster *Crassostrea gigas*, seven genes encoding Big defensins have been identified. However, the role of Big defensin sequence diversification remains to be elucidated from a functional point of view. Recent studies have revealed a potential function for Big defensins in oysters in the context of the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS), a polymicrobial disease that has been affecting farms since 2008. The observed inhibition of the expression of certain *Cg*-BigDefs in oysters susceptible to the disease has indeed suggested that *Cg*-BigDefs could play a role in controlling the microbiota. My thesis work focused on (1) studying the functional diversification of *Cg*-BigDefs, and in particular their role in controlling the microbiota of *C. gigas*, and (2) investigating the mechanism of action of *Cg*-BigDef1. Thanks to the total synthesis of *Cg*-BigDef1 and *Cg*-BigDef5 and the establishment of a collection of culturable bacteria from the microbiota of *C. gigas,* we have been able to show that the sequence diversification of *Cg*-BigDefs has broadened the spectrum of activity of this family of AMPs. This is evidenced by a diversification of targets (susceptible bacterial strains) and synergistic activities between variants of the *Cg*-BigDefs family. The fine modulation of oyster microbiota by Cg-BigDefs was verified *in vivo* by 16S metabarcoding for *Cg*-BigDef1. The search for molecular targets of *Cg*-BigDef1 was undertaken in *Staphylococcus aureus.* Using complementary and innovative methods (click chemistry, high-resolution microscopy and isogonic mutants), we have shown that teichoic acids (key cell wall polymers) from *S. aureus* play a decisive role in the antibacterial activity of *Cg*-BigDef1. The interaction with teichoic acids involves the N-terminal domain of Cg-BigDef1, which brings the C-terminal domain into contact with the bacterial wall. These various results provide a better understanding of the structural diversity of Big defensins from a functional point of view, and provide information on their role in shaping the oyster microbiota and the mechanisms of action underlying their antibacterial activities.
Keywords : Antimicrobial peptides, Big defensin, *Crassostrea gigas*, microbiota, mechanism of action