



BASES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DE LA MÉMOIRE IMMUNITAIRE INNÉE CHEZ L'HUITRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS

MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF INNATE IMMUNE MEMORY IN THE CUPPED OYSTER CRASSOSTREA GIGAS

Etablissement **Université de Montpellier**

École doctorale **GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau**

Spécialité **BDI - Biologie des Interactions**

Unité de recherche **IHPE - Interactions Hôtes-Pathogènes Environnements**

Encadrement de la thèse **Caroline MONTAGNANI (detailResp.pl?resp=21668)**

Financement du 02-10-2023 au 01-10-2026 *origine* **ED Gaia Employeur UM**

Concours GAIA

Début de la thèse le **1 octobre 2023**

Date limite de candidature (à 23h59) **1 juin 2023**

Mots clés - Keywords

immunité mémoire, mollusque marin, priming immunitaire, trans-générationnel, transcriptomique, protéomique
innate immune memory, marine mollusk, immune priming, transgenerational effect, transcriptomics, proteomics

Description de la problématique de recherche - Project description

Bien que l'utilisation de méthodes d'immunisation ait longtemps été considérée comme impossible chez les invertébrés, des recherches récentes ont montré que les huîtres pouvaient développer des mécanismes de mémoire immunitaire innée, aussi appelé priming immunitaire, permettant d'accroître ses défenses contre les agents pathogènes. Ces capacités immunitaires encore peu explorées chez les invertébrés offrent aujourd'hui la possibilité de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les mortalités récurrentes fragilisant actuellement la filière ostréicole française et mondiale. Dans ce contexte, l'objectif du projet de thèse est d'explorer les bases moléculaires et cellulaires du priming immunitaire antiviral mis en évidence au laboratoire pour en comprendre les mécanismes et les potentiels impacts sur la physiologie de l'huître en vue du développement de nouvelles méthodes prophylactiques pour soutenir durablement la filière ostréicole.

Although the use of immunization methods has long been considered impossible in invertebrates, recent research has shown that oysters can develop innate immune memory mechanisms, also called immune priming, allowing them to increase their defenses against pathogens. These immune capacities, still little explored in invertebrates, now offer the possibility of developing new strategies to fight against the recurrent mortalities currently weakening the French and global oyster farming industry. In this context, the objective of the thesis project is to explore the molecular and cellular bases of the antiviral immune priming demonstrated in the laboratory to understand the mechanisms and potential impacts on the physiology of the oyster with a view to develop new prophylactic methods to sustainably support the oyster farming industry.

Thématique / Domaine / Contexte

L'ostréiculture est un secteur socio-économique essentiel en Occitanie et en France (1^{er} producteur européen) qui doit cependant faire face à de nombreuses difficultés. Les mortalités récurrentes dues au virus OsHV-1 fragilisent cette filière depuis 2008 et pour lesquelles aucun traitement prophylactique ou thérapeutique n'existe à ce jour. Sur la base de résultats récents mettant en évidence la possibilité d'induire la mémoire immunitaire antivirale protégeant les huîtres contre OsHV-1 au sein et entre les générations, ce projet propose de comprendre quels sont les supports moléculaires et cellulaires de cette mémoire pour développer de nouvelles méthodes prophylactiques pour soutenir durablement cette filière, afin de promouvoir une aquaculture innovante et contribuer à la sécurité alimentaire.

Le projet vise à explorer les aspects originaux d'un domaine émergent et en pleine expansion de l'immunologie, la mémoire immunitaire innée encore appelée priming immunitaire ou immunité entraînée, dans l'un des principaux phylums d'invertébrés, les mollusques, où les études concernant ces mécanismes sont actuellement très rares. Comprendre ce nouvel aspect de l'immunologie chez les bivalves est d'une importance capitale à la lumière de la préoccupation mondiale de l'augmentation des épizooties affectant actuellement les

invertébrés marins constituant des menaces récurrentes pour de nombreuses espèces cultivées à travers le monde.

Depuis 2008, la production de l'huître *Crassostrea gigas* est impactée par une maladie émergente polymicrobienne déclenchée par le virus OsHV-1 μ Var (ostreid herpes virus-1) affectant spécifiquement les stades précoces (des larves aux juvéniles) (Segarra et al., 2010 ; de Lorgeril et al., 2018). Si aucun traitement n'est disponible pour lutter contre cette maladie, des solutions ont été développées basées sur de nouvelles pratiques culturales ou la sélection génétique. Ces pratiques consistent notamment à immerger de plus grandes quantités d'huîtres pour faire face aux mortalités massives en milieu naturel. La présence de grandes quantités d'animaux moribonds dans le milieu contribue à l'enrichissement de l'eau de mer environnante en virus et en bactéries opportunistes. Elles facilitent ainsi la circulation du virus et des bactéries favorisant la propagation de cette maladie et augmentent le risque d'induire de nouvelles émergences de variants du virus. Ces pratiques induisent également une modification des communautés microbiennes en période d'épidémie, ce qui constitue une menace sur la biodiversité microbienne marine (Richard et al., 2017-2019). Par ailleurs, la sélection génétique peut nuire à la diversité génétique des huîtres et compromettre leur résilience face à de futures maladies (Azéma, 2015). Ces solutions ne sont donc pas sans conséquences sur la durabilité de cette ressource alimentaire et l'élaboration de nouvelles solutions est aujourd'hui nécessaire pour stabiliser cette filière.

Au cours de la dernière décennie, un nombre croissant de travaux a montré que le système immunitaire inné était lui aussi capable de développer des mécanismes de mémoire immunitaire chez les vertébrés (Netea et al., 2019), les invertébrés et les plantes (Melillo, 2018 ; Milutinovic, 2016 ; Lanz-Mendoza et al., 2022). En rupture avec les paradigmes longtemps acceptés, ces travaux ont montré que les invertébrés étaient aussi capables de mettre en œuvre une mémoire immunologique innée indépendante des anticorps appelée « priming immunitaire » (PI). Le PI permet de protéger les individus contre les agents pathogènes au sein d'une génération et à travers les générations (priming trans-générationnel ou TGIP). Chez l'huître, nous avons récemment montré qu'une molécule mimant la présence d'un virus, le poly(I:C) (Lafont et al., 2017-2019-2020), comme l'injection de particules virales inactivées (brevet déposé en 2020) génèrent une protection à long terme induisant jusqu'à 100 % de survie face à OsHV-1, bloquant sa réplication. En limitant la présence de pathogènes dans l'environnement sans toucher au patrimoine génétique des huîtres, le PI pourrait contribuer à enclencher un cercle vertueux pour protéger durablement cette ressource et les écosystèmes conchylicoles exploités.

Jusqu'à présent, les observations existantes de la mémoire immunitaire chez les invertébrés sont principalement phénoménologiques, avec un design expérimental extrêmement hétérogène selon les taxons d'invertébrés étudiés. De nombreuses études sur les vertébrés, les invertébrés et les plantes indiquent un rôle clé de la reprogrammation transcriptomique, épigénétique et métabolique à long terme des cellules immunitaires innées qui apparaît comme un dénominateur commun du PI à travers les espèces (Lanz-Mendoza et Contreras-Garduno, 2022). Ces similarités soutiennent la notion de conservation ou de convergence des processus de mémoire immunitaire innée, plaidant pour la possibilité que l'immunité entraînée soit un processus biologique ancestral qui a évolué pour la protection d'organismes multicellulaires dépourvus de réponses immunitaires adaptatives. Cependant, la compréhension de ses fondements mécanistiques reste actuellement très fragmentaire chez les invertébrés. Ainsi, une compréhension claire des mécanismes moléculaires et/ou cellulaires sous-jacents est aujourd'hui nécessaire.

L'accumulation d'informations disponibles chez l'huître creuse (génomome complet disponible et récemment réassemblé ; mise en évidence du PI intra et inter-générationnel, identification des voies immunitaires antivirales) (Lafont et al., 2017-2019 ; Green et al., 2015 ; Fallet et al., 2022) font de cette espèce un modèle pertinent pour obtenir une vision intégrée des mécanismes de PI chez les mollusques.

Objectifs

Caractériser et comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents les phénomènes de mémoire immunitaire innée chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* par des approches intégratives 'multi-omiques' (RNAseq, single cell RNAseq, protéomique) pour identifier les supports de cette mémoire et son impact (potentiels trade-offs) sur la fitness de l'huître en vue de son application.

Méthode

Sur la base de méthodologies de priming obtenus dans le cadre du projet ANR PRIMOYSTER (ANR-22-CE20-0017, 2022-2026 ; « Investigation of immune priming in Oyster to prevent the Pacific Oyster Mortality Syndrome ») auquel le projet sera adossé, nous proposons de mettre en œuvre des approches intégratives pour identifier des mécanismes immunitaires encore inexplorés chez les huîtres. Le projet de thèse sera structuré en 3 axes complémentaires :

(1) Identification des bases moléculaires du priming antiviral

Des modifications transcriptomiques de gènes liés à l'immunité consécutives au priming par le poly(I:C) ou en réponse à l'interaction précoce du microbiote larvaire avaient été mis en évidence chez l'huître (récepteurs de reconnaissance de pathogènes, DSCAM, FREP, voies Toll et de l'interféron) (Lafont et al., 2020 ; Fallet et al., 2022). Pour aller plus loin dans l'identification des mécanismes moléculaires mis en jeu, des processus biologiques (immunité, métabolisme) impactés par le PI, nous réaliserons dans ce premier axe des approches parallèles de transcriptomique et de protéomique globales. Des échantillonnages seront réalisés au cours d'expériences de priming intra et trans-générationnels. Des animaux à différents stades de développement susceptible au virus OsHV-1 seront traités par un immuno-stimulant (virus inactivé), selon la méthodologie mise en place dans la première année de l'ANR PRIMOYSTER, et échantillonnés à différents temps post-priming puis au cours d'une infection par le virus. Des animaux non stimulés seront utilisés comme contrôles. Des tests de priming trans-générationnels seront également réalisés et des échantillonnages effectués sur les descendants d'animaux immuno-stimulés à différents stades de développement. Ces travaux seront réalisés grâce à l'expertise et au support des infrastructures d'élevage de l'Ifremer au sein de l'unité ASIM (la Tremblade). Les analyses transcriptomiques seront réalisées par la méthode de RNAseq (séquençage global de l'ARN), à l'aide de méthodologies et de pipelines bioinformatiques déjà développées par notre laboratoire et utilisés en routine. La disponibilité du génome de OsHV-1 permettra d'explorer en parallèle l'expression des gènes du virus pour quantifier l'impact du PI sur le contrôle de la réplication du virus. L'approche protéomique sera réalisée à l'aide de la méthode nano LC-MS/MS pour une analyse quantitative sans a priori.

(2) Identification des bases cellulaires du priming antiviral

Plusieurs études suggèrent également la participation des cellules immunitaires des invertébrés dans le PI, notamment chez les huîtres (Li et al., 2017). De plus, les données préliminaires obtenues au laboratoire semblent montrer que le priming par le poly(I:C) induit un

changement dans les populations hémocytaires. Cependant, la manière dont les informations du PI sont enregistrées et stockées reste une question ouverte. Pour répondre à cette question, nous prélèverons des hémocytes chez des huitres juvéniles immuno-stimulées ou non à différents temps post-priming et post-infection. L'application récente de la technologie scRNAseq sur les hémocytes d'huitres par le laboratoire IHPE (E. Vignal et al., publication en prep.) nous aidera à déterminer si le PI peut conduire à la différenciation ou à l'activation de populations spécifiques d'hémocytes ainsi que son impact sur les fonctions cellulaires. Cette technique a permis chez diverses espèces d'invertébrés d'analyser l'hétérogénéité des hémocytes grâce à des analyses de regroupement de gènes. Pour cela, nous bénéficierons des connaissances approfondies de notre consortium sur les interactions hémocytes-pathogènes. Ces travaux nous permettront de mettre en évidence si le PI peut cibler des voies immunitaires spécifiques et résulte de la reprogrammation des cellules immunitaires.

(3) Identification de l'impact du priming antiviral sur la fitness de l'huitre

Dans ce troisième axe, nous explorerons l'impact du PI sur la santé globale et la fitness des huitres. Les potentiels coûts physiologiques du PI doivent être pris en compte pour comprendre les limites potentielles de son application future en ostréiculture. Si l'équilibre entre les coûts et les avantages du PI chez l'huitre n'ont pas encore été explorés, des études menées sur d'autres invertébrés ont suggéré l'existence d'un coût du PI (trade-off) sur différents traits de fitness. Chez les invertébrés, des études antérieures ont déjà souligné les compromis potentiels liés au PI, notamment sur les processus exigeants en nutriments tels que la reproduction, la croissance et éventuellement d'autres traits d'histoire de vie. Pour tester ces potentiels effets résiduels, nous évaluerons l'impact du PI sur les performances des huitres (mesures d'indices de développement larvaire, capacités de croissance, succès reproducteur) à travers les stades de vie mais aussi à travers les générations, chez les descendants d'huitres immuno-stimulées.

Résultats attendus - Expected results

Le projet permettra à la fois à comprendre les aspects fondamentaux de l'immuno-stimulation via le priming immunitaire et de repousser les frontières de la connaissance pour envisager des solutions biotechnologiques innovantes. De plus, en utilisant une approche intégrative inédite de technologies de pointe (transcriptomique, protéomique, épigénomique, métabolomique) dans le cadre de ce projet de thèse et du projet ANR Primoyster auquel il sera adossé, nous prévoyons de démêler les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces processus. L'analyse combinée de ces approches associées aux approches menées en parallèle par les partenaires du consortium de l'ANR Primoyster permettront de donner une vision intégrée des mécanismes clés conduisant à une immuno-stimulation intra ou transgénérationnelle. Nous explorerons ainsi les mécanismes, identifierons les voies immunitaires mises en jeu, les coûts potentiels de cette méthode pour aborder toutes ses limites potentielles, pour à terme permettre sa mise en œuvre dans les éclosiers et élevages d'huitres, et mettre en place une méthode respectueuse de l'environnement pour lutter contre les maladies. Ce projet veut démontrer l'apport essentiel d'une recherche finalisée pour formuler des réponses aux grands enjeux actuels relatifs à la santé des invertébrés marins et la sécurisation de ces ressources alimentaires.

Références bibliographiques

- Azema, P., Travers, M.A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., Degremont, L., 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Vet Res* 46, 139.
- 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-Garzon, D., Bachere, E., 2018. Inefficient immune response is associated with microbial permissiveness in juvenile oysters affected by mass mortalities on field. *Fish Shellfish Immunol* 77, 156-163.
- Green, T.J., Raftos, D., Speck, P., Montagnani, C., 2015. Antiviral immunity in marine molluscs. *J Gen Virol* 96, 2471-2482.
- 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, 85.
- Lafont, M., B. Petton, A. Vergnes, M. Pauletto, A. Segarra, B. Gourbal, and C. Montagnani. 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Sci Rep* 7:13143.
- Lafont, M. et al. Transgenerational plasticity and antiviral immunity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Dev Comp Immunol* 91, 17-25, doi:10.1016/j.dci.2018.09.022 (2018).
- 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, doi:10.1128/mBio.02777-19.
- Lanz-Mendoza, H., Contreras-Garduno, J., 2022. Innate immune memory in invertebrates: Concept and potential mechanisms. *Dev Comp Immunol* 127, 104285.
- Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., Boraschi, D., 2018. Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. *Front Immunol* 9, 1915.
- Milutinovic, B., Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. *Semin Immunol* 28, 328-342.
- Netea, M.G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L.A.B., Schultze, J.L., 2019. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* 25, 13-26.
- Richard, M., Bec, B., Vanhuyse, C., Mas, S., Parin, D., Chantalat, C., Le Gall, P., Fiandrino, A., Lagarde, F., Mortreux, S., Ouisse, V., Rolland, J.L., Degut, A., Hatey, E., Fortune, M., d'Orbcastel, E.R., Messiaen, G., Munaron, D., Callier, M., Oheix, J., Derolez, V., Mostajir, B., 2019. Changes in planktonic microbial components in interaction with juvenile oysters during a mortality episode in the Thau lagoon (France). *Aquaculture* 503, 231-241.
- Richard, M., Bourreau, J., Montagnani, C., Ouisse, V., Le Gall, P., Fortune, M., Munaron, D., Messiaen, G., Callier, M.D., d'Orbcastel, E.R., 2017. Influence of OSHV-1 oyster mortality episode on dissolved inorganic fluxes: An ex situ experiment at the individual scale. *Aquaculture* 475, 40-51.
- Segarra, A., Pepin, 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 Res* 153, 92-99.

Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

La thèse sera dirigée par Caroline Montagnani (cadre de recherche Ifremer, directrice adjointe de l'UMR Interactions Hôtes Pathogènes Environnements) : spécialiste de l'immunité chez les invertébrés marins et de la mémoire immunitaire innée chez l'huître. Elle coordonne actuellement un projet ANR (Primoyster-ANR-22-CE20-0017) visant à explorer les bases moléculaires du priming antiviral chez l'huître et co-coordonne depuis 2019 avec B. Morga les projets relatifs à l'application du priming immunitaire pour la protection des huîtres en ferme ostréicole.

Un co-encadrement sera assuré avec M. Benjamin Morga (chercheur Ifremer, unité Adaptabilité et Santé des Invertébrés Marins, La Tremblade, France), spécialiste en santé animale notamment des mollusques marins. Ses travaux de recherche sont focalisés sur le virus OsHV-1 et son hôte l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ses travaux visent notamment à détecter le virus dans son environnement, caractériser sa diversité génétique, comprendre les interactions avec son hôte et développer des moyens de lutte contre le virus OsHV-1. Il co-coordonne depuis 2019 des projets relatifs à l'application du priming immunitaire pour la protection des huîtres en ferme ostréicole. Le projet comportera une partie expérimentale réalisée au laboratoire ASIM (La Tremblade).

Le projet bénéficiera également de la collaboration de E. Vignal (MCF UM, IUT de Montpellier), spécialiste en immunologie et biologiste cellulaire, actuellement responsable au laboratoire du développement de la technologie de single cell RNAseq sur les hémocytes de bivalves marins.

Des réunions hebdomadaires seront réalisées entre les co-encadrants et le doctorant pour un suivi réguliers et continu des avancements et une co-construction du projet de thèse.

Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

Le projet se déroulera au sein de l'UMR IHPE (Interactions Hôtes Pathogènes Environnements) basée à l'université de Montpellier avec des missions récurrentes au laboratoire ASIM (Ifremer, Adaptation et santé des Invertébrés Marins, La Tremblade) où se dérouleront les expérimentations sur l'huître à large échelle. Toutes les ressources matérielles de l'UMR IHPE et du laboratoire ASIM nécessaires au développement de ce projet de thèse (infrastructures expérimentales, laboratoires P2, ressources bioinformatiques et génomiques) seront mises à la disposition du candidat. Le projet bénéficiera de l'expertise et de l'environnement nécessaires à l'accompagnement de la formation du candidat disponibles au sein de l'UMR IHPE et du laboratoire ASIM (immunité, biologie moléculaire, transcriptomique, épigénomique, écologie microbienne, protéomique, maîtrise expérimentale du modèle) ou au sein du réseau collaboratif mis en place dans le cadre du projet ANR Primoyster auquel le projet de thèse s'adossera financièrement.

Ouverture Internationale

Les résultats du projet seront d'une importance fondamentale pour une large communauté scientifique internationale travaillant sur les maladies des huîtres et plus largement, sur les maladies menaçant les invertébrés d'intérêt écologique, économique clés. Ces travaux apporteront une contribution nouvelle et essentielle à la durabilité de la filière ostréicole qui aura des portées régionale, nationale et internationale.

Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

Nous nous attacherons à une diffusion rapide des avancées, des connaissances et de leur exploitation dans le cadre de ce projet. Notre approche originale et intégrative nous aidera à publier nos résultats dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture de haut niveau et à les présenter lors de conférences internationales traitant de questions immunologiques fondamentales et de problématiques spécifiques à l'aquaculture.

Collaborations envisagées

Le projet bénéficiera du réseau collaboratif mis en place dans le cadre de l'ANR Primoyster. Les phases d'expériences de terrain et d'échantillonnages seront réalisées en collaboration avec le laboratoire Ifremer ASIM (La Tremblade). Des collaborations seront établies avec des scientifiques et comités professionnels bien établis en région Occitanie (UMR MARBEC et Laboratoire Ifremer environnement côtier de Sète, CRCM, cepalmar).

Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

Le candidat devra être titulaire d'un master dans les domaines des interactions hôtes-pathogènes, de la génomique, de la biologie marine ou de l'immunologie. Des connaissances en biologie moléculaire et en bioinformatique seront également nécessaires et une expérience de laboratoire dans ces domaines est fortement recommandée. Une expérience dans l'expérimentation animale chez les invertébrés ou modèles marins sera un également grandement appréciée. Le candidat doit pouvoir être mobile pour mettre en place les expérimentations et échantillonnages nécessaires au projet en collaboration avec le laboratoire ASIM. Ce projet s'inscrivant dans un projet intégratif et collaboratif multidisciplinaire, le candidat devra être curieux d'autres domaines de recherche et avoir de bonnes capacités de communication.

The candidate must hold a master's degree in the fields of host-pathogen interactions, genomics, marine biology or immunology. Knowledge of molecular biology and bioinformatics will also be required and laboratory experience in these fields is highly recommended.

Experience in animal experimentation in invertebrates or marine models will also be greatly appreciated. The candidate must be able to be mobile to set up the experiments and sampling necessary for the project in collaboration with the ASIM laboratory. As this project is part of an integrative and collaborative multidisciplinary project, the candidate must be curious about other areas of research and have good communication skills.

Dernière mise à jour le 24 février 2023