



HAL
open science

Etude de la réponse environnementale et transgénérationnelle chez l'huitre creuse *Crassostrea* *gigas* : focus sur les mécanismes épigénétiques

Manon Fallet

► **To cite this version:**

Manon Fallet. Etude de la réponse environnementale et transgénérationnelle chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas* : focus sur les mécanismes épigénétiques. Génétique. Université de Perpignan, 2019. Français. NNT : 2019PERP0036 . tel-03059708

HAL Id: tel-03059708

<https://theses.hal.science/tel-03059708>

Submitted on 13 Dec 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale **ED 305**
Et de l'unité de recherche UMR 5244
Interactions Hôtes Pathogènes Environnements (IHPE)

Discipline : **BIOLOGIE**
Spécialité : **Evolution**

Présentée par
Manon Fallet

**Etude de la réponse environnementale et
transgénérationnelle chez l'huitre creuse
Crassostrea gigas.
Focus sur les mécanismes épigénétiques**

Soutenue le 12 décembre 2019 devant le jury composé de

Mme. Frédérique PITEL, DR2, INRA Toulouse	Rapporteur
Mme. Christine PAILLARD, DR CNRS, Brest	Rapporteur
M. Benoit PUJOL, CR CNRS, Perpignan	Examineur
Mme. Caroline MONTAGNANI, CR, Ifremer, Montpellier	Examineur
M. Guillaume MITTA, PR, UPVD, Perpignan	Examineur
Mme. Céline COSSEAU, MCF, UPVD, Perpignan	Directeur de thèse
M. Christoph GRUNAU, PR, UPVD, Perpignan	Co-directeur de thèse
M. Bruno PETTON, IR, Ifremer, Brest	Invité

A Yvonne Geoffray,



Remerciements

Ça y est, je touche au but et j'achève la rédaction de ce manuscrit de thèse ! Ces trois dernières années ont été intenses, passionnantes, souvent dures, mais toujours enrichissantes ! De nombreuses personnes m'ont accompagné durant ces trois ans. Parfois dans le cadre professionnel, m'aidant ainsi à réaliser les travaux présentés dans ce manuscrit et à me familiariser au monde de la recherche, parfois dans le domaine personnel, m'encourageant et me soutenant au quotidien. Certaines personnes ont également joué sur les deux tableaux. L'écriture de ces remerciements me touche énormément car c'est pour moi le moyen de vous montrer toute ma reconnaissance.

Tout d'abord, je souhaite remercier **Frédérique Pitel** et **Christine Paillard**. Merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et de prendre le temps d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier également **Benoit Pujol** et **Caroline Montagnani**. Benoit, on s'est rencontré alors que j'effectuais mon stage de master 2 à Toulouse et nos interactions bien que brèves, m'ont donné envie de t'avoir dans mon comité de suivi de thèse. Merci d'avoir été d'aussi bon conseil pendant ces réunions annuelles ! Caroline, merci aussi pour ton implication et le suivi de mes avancées via le CSI. Enfin, merci à vous deux d'avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance de thèse.

Guillaume Mitta, merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire IHPE, merci pour tes encouragements pendant mon stage de master 2 effectué parmi vous, et après durant ma thèse. Les discussions avec toi font « mal au cerveau » mais je n'en regrette aucunes. Elles m'ont permis de mieux m'approprier mon sujet de thèse et de prendre de la hauteur quant à mes résultats. Merci également d'avoir accepté d'être présent à ma soutenance en tant qu'examineur.

Bruno, merci de ton accueil chaleureux lors de mes visites à Argenton ! Un grand merci pour tout ton travail réalisé sur les huitres. Sans toi, rien de tout cela n'aurait été possible ! Ton énergie et ta passion font de toi une personne qu'il est impossible de ne pas remarquer. Je suis ravie de pouvoir te compter parmi nous à la soutenance.

Encore merci à vous six d'avoir accepté de lire ce manuscrit. J'espère que mes travaux de thèse vous inspireront et que nous pourrons en discuter très bientôt, en tout cas j'ai hâte !

Merci à **Olivier** et **Natacha Bies-Ethève** pour avoir participé à mon comité de suivi de thèse et m'avoir prodigué leurs conseils tout au long de ces trois années.

S'il est vrai que souvent une vocation naît de l'influence d'un professeur, il est clair que mon intérêt pour le monde passionnant et au combien complexe de l'épigénétique, je le dois à **Etienne Danchin**. Merci pour ce cours de (seulement) deux heures, pendant lesquelles je suis restée captivée ! Sans vous, je n'aurais pas réalisé cette thèse, merci de présenter avec autant de passion vos travaux.

Christoph, tu es la première personne du laboratoire que j'ai contactée, par mail, afin de réaliser une thèse à l'IHPE. Ce premier contact a été infructueux car vous aviez déjà un candidat pour le concours de l'école doctorale. Quelques mois plus tard, je t'ai recontacté et là... bingo, le processus a été enclenché pour l'année suivante ! Tu m'as dit à cette époque, que la persévérance était une vertu et que ma détermination serait appréciée par les membres du jury de l'école doctorale. J'espère qu'aujourd'hui, à la fin de ces trois années de thèse, tu n'as pas changé d'avis ! En tout cas, merci beaucoup de m'avoir offert cette opportunité et merci pour les différents échanges scientifiques que nous avons eu durant ma thèse. Je n'oublierai jamais ton talent pour les métaphores !

Céline, notre premier contact s'est effectué par Skype, suite à mon échange de mails avec Christoph. J'étais hyper stressée alors, et encore plus après lorsque je suis venue visiter le laboratoire quelques jours plus tard. Néanmoins, tu as su m'accueillir et me mettre à l'aise en me présentant les différentes

personnes avec qui, même si je ne le savais pas encore, j'allais partager mon quotidien pendant 3 ans (et même 4 si on compte le master !). Je tiens également à te remercier pour ton aide durant la thèse et ton soutien, surtout pendant cette dernière période de rédaction. Merci de ne pas m'avoir lâchée !

Benjamin, tu as co-encadré mon stage de master 2 avec Céline. Merci de m'avoir prise sous ton aile à cette époque. Merci aussi pour la suite, ta présence durant la thèse en tant que responsable de la vie de site, ton écoute de nos « petits » problèmes de doctorants, ta patience et ta gentillesse. Et bien sûr merci pour nos discussions récentes sur le priming immunitaire qui m'ont permis de réfléchir différemment à mes résultats !

David ou devrais-je dire, Monsieur Duval ! J'ai eu beaucoup de mal à m'adapter à votre côté pince-sans-rire, vous me mettiez très mal à l'aise au début de la thèse. Désormais, c'est complètement différent ! J'ai beaucoup apprécié vos conseils et votre soutien pendant mes périodes de doutes. Merci d'être venu nous soutenir au congrès des doctorants de l'UPVD, merci d'avoir toujours été disponible pour échanger scientifiquement ou simplement plaisanter. Vos visites inopinées et parfois (souvent !) démunies de but précis, dans le bureau des doctorants, nous permettaient de faire retomber la pression. Enfin, je vous suis très reconnaissante de m'avoir permis de donner des cours à l'IUT, sans vous je n'aurais pas eu cette chance, merci pour votre confiance !

Eve, je voudrais te remercier pour ton aide précieuse dans l'analyse de mes séquences de barcoding. Grâce à toi, phyloseq n'a (presque) plus de secrets pour moi ! Merci aussi pour ta bonne humeur quotidienne, ta disponibilité et ta capacité d'écoute. Merci de t'être à chaque fois prêtée au jeu des photos d'albums de fin de thèse, avec le sourire ! (Et désolée pour les photos, même si elles sont tops !).

Jérôme, Jérôme, Jérôme... tantôt sympathique, tantôt agaçant (oui, je t'en veux toujours pour tes commentaires sur le largage par SMS !), toujours enclin à discuter. J'ai beaucoup apprécié échanger avec toi, notamment pendant la pause de midi. Tu as toujours une anecdote sympa à raconter ! Merci de m'avoir aidé lors de la préparation de ma soutenance de master et merci pour ton ouverture d'esprit qui nous a permis d'avoir des conversations à la fois engagées et légères.

Julien Portela, un peu comme pour Jérôme, ce n'est pas pour rien que vous vous entendrez si bien ! Merci de ton ouverture d'esprit et de ta disponibilité. Merci de savoir être à l'écoute des autres. Essaie juste d'être plus gentil avec les hamsters et avec Cindy (non l'ordre n'a pas d'importance). Et sinon j'attends toujours tes fameuses lasagnes au saumon...

Les supers nanas : ~~Belle, Bulle et Rebelle~~, euh... non, **Anne, Diane et Sylvie** ! Franchement, vous êtes au top ! Merci de gérer avec brios toutes les paperasses des missions, états de frais et autres réjouissances administratives. Diane, désolée d'avoir si souvent sonné à la porte ces derniers temps...mais bientôt ça sera fini (même si j'aimais bien ton « petite Manon » quand tu te rendais compte que c'était (encore) moi). Sylvie, ta présence (trop brève) au labo a apporté une touche de légèreté et de bonne humeur en plus. J'espère de tout cœur que tu vas t'épanouir à ton nouveau poste ! Anne, à la fois rigolote et professionnelle, tu es l'exemple parfait illustrant qu'il est possible de bien travailler tout en gardant son « espièglerie ». J'espère pouvoir réussir aussi bien que toi à gérer les deux dans le futur. Merci d'être venue nous supporter avec tes pompons à ma thèse en 180 secondes ! Je veux voir ces pompons à ma soutenance !

Cristian et Ronaldo, mes chouchous du labo ! Quel plaisir de venir dans votre bureau. J'ai adoré venir t'embêter presque tous les matins Cristian (mais chut !!! on n'a pas le droit de te déranger le matin !). Tu as toujours été d'une patience exemplaire avec moi, même quand je venais te voir 10 fois par jour parce que Galaxy ou R ou Filezilla ou mon cerveau, ne fonctionnaient pas. Merci d'être resté proche de nous, les doctorants, et de venir aux soirées raclettes. Merci également (et c'est assez contradictoire) d'avoir partagé tes tutos Keto ! Promis, je m'y remets après la thèse (et je continuerai

de te surveiller à distance) ! **Ronaldo** Pépito, le soleil du Brésil au laboratoire, merci pour ta bonne humeur, ton sourire inébranlable et tes conseils en tant que post-doctorant. Te former au western était très sympa, merci d'en avoir profité pour m'apprendre quelques mots d'espagnol à la mode portugais-brésilienne, un bon combo ! Bon sinon, on se l'a fait quand cette soirée brésilienne ??

Richard, ta réputation te précède dans les couloirs de l'IHPE et il faut dire qu'elle te va comme un gant ! Merci de détendre l'atmosphère comme tu le fais si bien et merci d'avoir été si présent et disponible au sein du laboratoire (même si c'était juste pour prendre une boîte pour ranger les échantillons). Bien sûr, merci pour tes conseils en biologie moléculaire, biochimie, chimie, protéomique... Qu'est-ce que j'aurais bien pu faire sans toi ?? Merci de m'avoir enseigné le western avec Guillaume Tétreau et Anaïs, maintenant je suis devenue la formatrice en chef pour le western au labo. Désolée mais tu vas devoir de nouveau t'en occuper !

Jeff, sans toi le labo ne tournerait pas rond. D'ailleurs ça se voit quand tu n'es pas là ! Merci pour tous ce que tu fais afin de faciliter la vie du reste du personnel au laboratoire, merci pour ta disponibilité, toujours présent lorsqu'on ne trouve pas tel ou tel produit chimique au nom obscur. Merci également pour tes T-shirts, ils sont trop cools !

Anne Rognon, te croiser dans les couloirs ou pendant une pause-café a toujours été un bon moment. Merci d'avoir toujours pris un peu de temps pour me demander comment ça allait, même quand tu me disais que ça se voyait que j'étais fatiguée. Continue de respirer la joie de vivre et d'illuminer les journées des doctorants de passage.

Merci aux anciens, ceux qui m'ont accueilli dans leur bureau alors que je n'étais « qu'une stagiaire de M2 » : **Anais, Sylvain, Rodolfo, Julien** et **Kelly** ! Avoir partagé ce bureau avec vous a été une superbe expérience, j'espère avoir l'occasion de vous revoir tous !

Natchou Pitchou, j'ai une grosse pensée pour toi ainsi que pour Cécile. Merci de m'avoir aussi bien accueillie au laboratoire et de m'avoir intégrée à votre groupe de filles spécial potin. Natchou, après Julien et moi, il va falloir que tu te trouves un nouveau doctorant chouchou !

Cindouche, j'ai l'impression qu'on a toutes les deux beaucoup grandi et changé depuis qu'on est arrivées au laboratoire. J'envie ta spontanéité et ta franchise ! Merci d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments ! Continue à bien t'occuper de nos petits rongeurs et tiens-moi au courant de ta vie !

Kelly, tu as cru que tu n'aurais droit qu'à une seule phrase ?? Tu es la première personne avec qui j'ai réellement sympathisé en arrivant ici, ma première amie sur Perpignan ! Et pourtant le contexte de notre première conversation était assez étonnant ! Je pourrais écrire énormément de choses sur toi : qu'avoir partagé ce bureau avec toi a été un vrai bonheur, que j'ai adoré manipuler (parfois tard le soir) en ta compagnie, que j'ai apprécié chaque moment que nous avons partagé au sein du laboratoire et à l'extérieur... Tu as été mon mentor, comme tu te plaisais toi-même à le dire et quel mentor ! Je ne vais plus m'appesantir à ton sujet mais sache que tu es une personne que j'apprécie énormément et qui m'a beaucoup apporté. Garde ta bonne humeur et ta zen attitude !

Aude, tu as été une des surprises de ma thèse ! Je ne m'attendais pas à te voir arriver dans notre bureau et puis hop ! Tu étais là et c'est comme si tu y avais toujours été ! Merci pour ta présence bienveillante et toujours positive pendant cette année que nous avons passée côte à côte dans le bureau. Merci pour tes conseils, ton soutien et tes encouragements ainsi que pour tes bougies parfumées et pour ton coaching sportif ! Je compte bien passer te voir au Maroc très prochainement !

Mademoiselle Huot, **Millou**, alors là encore, il y en a pour des heures pour écrire tout le bien que je pense de toi. Notre interaction quasi-symbiotique a connu quelques hauts et bas mais je n'en retiendrai que le meilleur : tu as aussi été une grosse surprise pour moi, je ne m'attendais pas à

rencontrer quelqu'un comme toi pendant ma thèse. Merci d'être venue quérir l'amitié de la timide que je suis, merci d'avoir été là et d'avoir partagé cette aventure qu'est la thèse. On a vécu au même moment les mêmes angoisses, les mêmes déceptions, les mêmes doutes mais également les mêmes joies, les mêmes moments de rire et de détente et je pense à présent, la même satisfaction d'être venue au bout de cette thèse ! Il n'est pas question qu'on se perde de vue pour la suite !

Les jeunots : **Nélia** Luviano, **Stephen** Mulero, **Damien** Lassale, **Chrystelle** Lasica, **Boris** Savassi, **Jean Delmotte** : bon courage à vous pour la suite ! Merci de m'avoir supportée dans le bureau (surtout à la fin !). Merci pour votre soutien et votre présence au quotidien ! **Nélia**, continue à t'impliquer comme tu le fais dans ton travail et reste positive, tu as toutes les cartes en mains pour réussir, ça ne fait aucun doute ! (Juste n'oublie pas ton portable aux toilettes et tout ira bien !). **Stephen**, je suis persuadée que tu ferais un très bon chercheur, tu possèdes à la fois les compétences techniques et les connaissances scientifiques ! J'ai été souvent impressionnée par ta maîtrise des divers outils informatiques et techniques moléculaires. **Chrystelle**, la gentillesse incarnée ! Merci pour tes petites attentions et bon courage pour la chronobiologie, j'ai l'impression que tu es déjà bien partie ! **Damien**, un petit mot pour toi mais chuuuuuuuuuuuuuuuuuuut, bon courage dans ta paternité et ta thèse, deux aventures que tu sauras mener de front ! **Boris**, t'entendre chantonner dans le bureau, ça va me manquer ! **Jean**, même si tu n'es pas dans notre bureau, c'est tout comme ! Bon courage à toi pour la suite et rendez-vous l'année prochaine à ta soutenance =).

Je n'oublie pas **Rémy** et **Luc**, les petits derniers, je vais bientôt vous laisser mon bureau. J'espère que vous vivrez d'aussi bons moments que moi dans ce petit espace qui est l'ancre des doctorants.

Les doctorants de Montpellier : **PLS**, je peux dire que j'aurais beaucoup pensé à toi en cette fin de thèse, tes initiales y sont peut-être pour quelque chose ^^ . C'était chouette de t'avoir parmi nous pendant un petit moment et de te montrer le western-blot (on aura bien galéré mais qu'est ce qu'on aura rigolé !). **Etienne**, on ne s'est pas croisés si souvent que ça mais les rares échanges que l'on aura eu m'ont laissé un très bon souvenir ! Bon courage pour la suite !

Je pense également à **Sayuri** et **Marta** qui ont ensoleillé mon été 2018 ! Vive les latinas ! J'espère vous revoir très bientôt, et Martatchie ne t'inquiète pas, on va débarquer chez toi avec Camille ! Je n'ai plus qu'une chose à vous dire, porque te vas !

Je souhaite remercier toutes les autres personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse : **Julien Delorgeril**, **Jean-Michel Escoubas**, **Rodolfo Rondon**, **David Roquis**, **Sébastien Comarmond**, **Agnès Vergnes**, **Ingo Bulla**, **Yannick Guegen** et **Jérémy Vidal-Dupiol**. J'ai également une grosse pensée pour l'ensemble du laboratoire IHPE (Perpignan et Montpellier confondus) ainsi que pour toute l'équipe du site expérimental d'Argenton. Merci à tous !

Dans un autre contexte, je souhaite remercier mes amis de plus ou moins longue date, ceux qui sont au loin mais toujours présents dans mon cœur :

- Les amis de Saint-Etienne qui ont continué à m'honorer de leur amitié malgré les années : **Pauline** et **Pauline**, **Kathy**, **Lauriane**, **Manu**, **Florence**, **Floriane**, **Camille**, **Alison**, **Damien**, **Bibou**, **Gaëlle**. Je vais passer vous faire un petit coucou très prochainement !

- les ptit's colloqs d'Avignon : **Anne-Line** et **Nico**. Ces trois mois (seulement...j'aurais dit beaucoup plus !!!) passés avec vous étaient supers, de même que les festivals d'Avignon et nos pérégrinations nocturnes ! Je vous fais des bisous et espère vous revoir bientôt avec, qui sait, peut être un petit-frère ou une petite sœur =).

- La bande de Toulouse : **Valentin** et **Florie**, **Martin**, **Kloug** (la bonne soirée), **Adélaïde**, **Jacky**, **Julien**, **Bastien**, **Cécé**, **Marine** et **Fred**. J'ai adoré ma vie à Toulouse et la quitter pour venir m'installer à Perpignan n'a pas été facile. Merci pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble !

Une petite pensée pour **Cyril**. Tu as aussi fait partie de mon aventure « thèse », merci d'avoir partagé mon enthousiasme pour l'épigénétique et de m'avoir poussé à continuer à chercher un financement de thèse après mon master à Toulouse.

- Les loulous montpellierains : **Kriver**, on va pouvoir se replonger dans le merveilleux monde de Geralt ! **Rémy**, merci d'avoir été là pendant ces 8 derniers mois, merci d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir soutenue ! Discuter avec toi et souvent déstabilisant, parfois difficile mais toujours intéressant. Je suis heureuse de t'avoir rencontré et de pouvoir te compter parmi mes amis !

- Les doctorants de l'UPVD, un énorme merci aux autres membres du bureau UPVDoc 2016-2017 : **Minou, Margot, Sarah, JR et Mathieu**, vous êtes au top les gars ! Une pensée pour ceux qui terminent également leur thèse : **Clément, Lantoine, Ari et Alicia** et pour ceux qui ont encore un peu de temps : **Eléonore** (merci pour le déménagement), **Mégane, Mélodie et Mélina**.

Une pensée également pour **Benjamin**, l'armure vivante et **Sylvain**, la personne la plus généreuse que je n'ai jamais rencontré, je te kiffe mon petit poulet.

Fabi !!!!! Bien sûr que tu as ta place dans mes remerciements !!!!! Comment dire ça simplement... Tu es une personne en or, toujours le cœur sur la main, toujours là pour les autres ! Je suis heureuse de te connaître et que malgré tout, on ait gardé le contact ! Merci pour tout mais s'il te plait arrête de faire à manger pour 50, tu vas finir par nous faire exploser ^^.

Sousou, tu sais déjà tout ce que je pense de toi. Cela va faire au moins 15 ans que l'on se supporte. Merci d'avoir été là pendant les moments les plus difficiles et les plus heureux de ma vie, d'être toujours là après toutes ces années. Tu es loin d'être juste un grominet parasite à mes yeux et je te considère comme une sœur !

Je tiens à remercier **mes parents** qui m'ont toujours soutenu même dans mes projets les plus farfelus, **mes frères** dont je suis très fière et qui sont toujours présents pour moi, et **mon grand-père** qui se demande sûrement pourquoi je me suis lancée dans une thèse mais me soutient quand même. Merci à vous d'être là et de veillez sur moi !

Enfin, mon dernier mot de remerciement te revient, **mamie**. Tu as été la meilleure mamie que l'on puisse avoir et je souhaite te dédier cette thèse. Tu m'as demandé un jour, un peu candidement, pourquoi je ne devenais pas coiffeuse ? J'aurais aimé que cette thèse t'apporte un élément de réponse et te fasse comprendre mon intérêt pour les sciences et le monde de la recherche. Je pense à toi.

Ma thèse en bref

Problématique générale : Quelle est la place de l'épigénétique dans l'évolution chez les mollusques ?



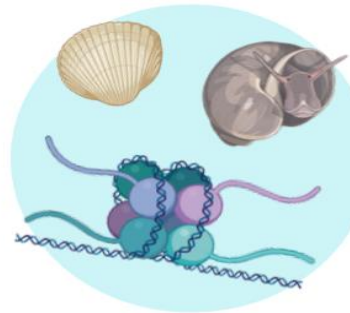
PARTIE 1 : INTRODUCTION = LES CONCEPTS CLEF

- L'évolution qu'est ce que c'est ?
- Théorie étendue de l'évolution, cadre conceptuel
- Application de la théorie étendue dans la réponse immunitaire de l'huître creuse

PARTIE 2 : CHAPITRE 1 = CADRE THEORIQUE ACTUEL, ET PROBLEMATIQUES RENCONTRÉES

Article 1 : Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks

--> Review théorique sur les connaissances actuelles et les problématiques rencontrées dans l'étude de l'épigénétique en tant que facteur évolutif chez les mollusques.



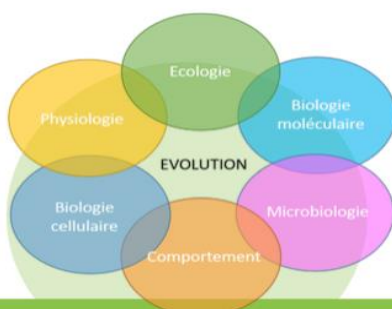
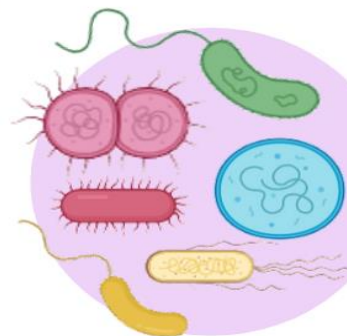
PARTIE 3 : CHAPITRE 2 = EFFET DE DEUX TYPES DE STRESS SUR LA RÉPONSE DES MULTI/TRANSGÉNÉRATIONNELLE DES HUITRES

Article 1 : Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome

--> Article écrit dans le cadre de la thèse de Rodolfo Rondon montrant l'implication d'un stress abiotique sur la descendance d'huîtres.

Article 2 : Transgenerational response of pacific oyster *Crassostrea gigas* to Pacific Oyster Mortality Syndrome after an early microbial exposure

--> Article comportant la majorité des résultats de ma thèse et montrant l'implication d'un stress biotique sur la résistance des d'huîtres à une maladie, sur plusieurs générations.



PARTIE 4 : CONCLUSION GENERALE

- Conclusion épigénétique des mollusques
- Importance des études intégratives
- Nécessité de continuer à étudier l'évolution et les mécanismes sous-jacents

Table des matières

_Toc22920437Table des illustrations	1
Liste des abréviations et sigles	2
Introduction générale	3
I. L'évolution biologique	3
1. Trois concepts clef : variabilité, transmission et adaptation	3
2. Vers une théorie étendue de l'Evolution	5
II. Théorie étendue de l'évolution.....	8
1. Héritabilité génétique.....	11
2. Héritabilité non-génétique.....	13
3. Le système d'héritabilité.....	33
4. Le double rôle de l'environnement	34
III. Application de la théorie étendue à l'huitre creuse <i>C. gigas</i>	40
1. Présentation du modèle	41
2. Pressions environnementales exercées sur les huitres	45
3. Le système immunitaire de l'huitre creuse <i>C. gigas</i>	47
IV. Objectifs de la thèse	53
Chapitre 1 : La place de l'épigénétique chez les mollusques	55
I. Introduction et principaux résultats.....	55
II. Article 1 : L'héritabilité épigénétique et les effets intergénérationnels chez les mollusques...56	
Chapitre 2 : Influence de différents types de stress sur la réponse multi/transgénérationnelle des huitres	113
I. Introduction et principaux résultats.....	113
1. La réponse à un stress abiotique : le diuron	113
2. Les effets d'un stress biotique : une exposition microbienne précoce	114
II. Article 1 : Effet d'une exposition parentale au diuron sur le méthylome de larves de l'huitre du Pacifique.....	116
III. Article 2 : Plasticité phénotypique adaptative transgénérationnelle de la résistance à l'infection de <i>Crassostrea gigas</i> lors d'une exposition microbienne précoce	150
Discussion.....	219
I. Rappels et discussion autour des principaux résultats	219
1. Chapitre 1 : La place de l'épigénétique chez les mollusques	219
2. Chapitre 2 : Influence de différents types de stress sur la réponse multi/transgénérationnelle des huitres	221
3. Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place du phénotype et sa transmission.....	228

4. Interactions entre génome et épigénome	232
II. Résultats supplémentaires	234
1. Caractéristiques générales du méthylome des huitres	234
2. Certaines phases du développement sont plus sensibles aux stimuli environnementaux	235
Réflexions générales	237
I. L'épigénétique dans l'évolution adaptative des mollusques.....	237
II. Importance des effets transgénérationnels dans la réponse aux changements globaux	238
Références bibliographiques	240
Annexes.....	281
Glossaire.....	290
Résumé.....	296

Table des illustrations

Figure 1 : Une nouvelle équation de l'évolution.....	9
Figure 2 : L'évolution adaptative dans la nouvelle théorie de l'évolution.....	10
Figure 3 : Les différents mécanismes intervenant dans l'héritabilité non génétique	11
Figure 4 : Le paysage épigénétique de Waddington.....	15
Figure 5 : De sa position à sa constitution, zoom sur la chromatine	16
Figure 6 : Les différents porteurs de l'information épigénétique	17
Figure 7 : Les voies de méthylation et déméthylation de l'ADN	20
Figure 8 : Exemples de modifications biochimiques des histones.....	22
Figure 9 : Exemple de couleurs chromatiniennes.....	23
Figure 10 : Vue globale du noyau cellulaire et de son organisation.....	24
Figure 11 : La reprogrammation épigénétique chez les mammifères	27
Figure 12 : Les différents types de transmission de l'information épigénétique	29
Figure 13 : Les effets du microbiote intestinal sur l'hôte	30
Figure 14 : Un exemple de norme de réaction.....	35
Figure 15 : Application de la théorie de l'évolution étendue à mes travaux de thèse sur <i>C. gigas</i>	40
Figure 16 : Schéma de l'anatomie de l'huître creuse	41
Figure 17 : Schéma représentant le cycle de vie de l'huître creuse	42
Figure 18 : Les différentes maladies subies par les huîtres produites en France, depuis 1950	46
Figure 19 : L'évolution des taux de mortalité des huîtres <i>C. gigas</i> juvéniles (6-18 mois)	47
Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes de l'immunité innée chez <i>C. gigas</i>	51
Figure 21 : Principe de la conversion de l'ADN au bisulfite.....	114
Figure 22 : Illustration du mécanisme de priming immunitaire dans un monocyte humain.....	227
Figure 23 : Lien entre méthylation de l'ADN et expression des gènes mise en évidence lors de l'expérience d'exposition à la microflore environnementale.....	231
Figure 24 : Relations entre génome et épigénome dans le cancer.....	233
Figure 25 : Schéma illustrant les principaux résultats obtenus dans le cadre de l'étude sur l'exposition à la microflore envrionnementale.....	234
Tableau 1 : Définition des termes clefs pour la lecture du manuscrit.....	39

Liste des abréviations et sigles

- 5mC** = 5 Méthylcytosine.
5-fC = 5-formyl cytosine.
5-caC = 5-carboxylcytosine.
5-hmC = 5-hydroxyméthylcytosine
4mC = N4 méthylcytosine.
6mA = N6 Méthyladénine.
6-hmA = 6-hydroxyméthyladénine.
6-fA = 6-formyl adénine.
ADN = Acide DésoxyriboNucléique.
ANR = Agence Nationale de la Recherche
ARN = Acide Ribonucléique.
ARNm = ARN messager.
BER = Base Excision Repair.
CenH3 = Expressed Centromere Specific Histone 3.
CG = enchainement dans la molécule d'ADN d'un nucléotide portant une cytosine puis d'un portant une guanine.
CGI =
CHG = enchainement dans la molécule d'ADN d'un nucléotide portant une cytosine puis de n'importe quel nucléotide excépté un avec une guanine (H = tout sauf G), puis d'une guanine.
CHH = enchainement dans la molécule d'ADN d'une cytosine puis de deux nucléotides sans guanine (H).
CNV = Variation du nombre de copies (Copy Number Variation).
CpG = cf. CG mais où on représente également la liaison phosphate (p).
DECIPHER = Déchiffrage des maladies multifactorielles : cas des mortalités de l'huitre
DMR = Région Différentiellement Méthylée (Differentially Methylated Region).
DNMT = DNA Methyltransferase.
dsRNA = ARN double brin (double stranded RNA).
F1 = Première génération
F2 = Deuxième génération
F3 = Troisième génération
GIMEPEC = Génotoxicité, Immunotoxicité et rÉprotoxicité des PEsticides chez *Crassostrea gigas*.
H3K4me3 = triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3.
H3K36me3 = triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3.
H3K27me3 = triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3.
H3K9ac = acétylation de la lysine 9 de l'histone H3.
H4ac = acétylation de l'histone H4.
hcsiARN = petit ARN interférent hétérochromatique (heterochromatic small interfering RNA).
IHPE = Interactions-Hôtes-Pathogènes-Environnement.
IRF = Facteurs régulateurs de l'intéféron (interferon regulatory factors).
ISGS = Gènes stimulés par l'interféron (Interferon stimulated genes).
JAK/STAT = Kinases Janus/Transducteurs de signal et activateurs de transcription (Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription).
Jmj = Histone deméthylase Jumonji.
lncRNA = longs ARNs non codants (long non coding RNA).
miRNA = micro ARN (micro RNA).
NF-κB = Facteur nucléaire-kappa B (nuclear factor-kappa B).
PAMP = Profils moléculaires associés aux agents pathogènes (Pathogen-associated Molecular Patterns).
piRNA = ARN interagissant avec PIWI (PIWI RNA).
POMS = Syndrome de mortalité de l'huitre du Pacifique (Pacific Oyster Mortality Syndrome).
PRP = Protéines de reconnaissance de motifs (Pattern Recognition Proteins).
PRR = Récepteurs de reconnaissance de motifs (Pattern Recognition Receptors).
RdDM = méthylation de l'ADN guidée par l'ARN (RNA-directed DNA méthylation).
RNAi = ARN interférent (interfering RNA).
SAR = System Acquired Resistance.
siRNA = petit ARN interférent (small interfering RNA).
SNP = Polymorphisme de nucleotides individuels (Single Nucleotide Polymorphisms).
STING = Stimulateur des genes de l'interferon (stimulator of interferon genes).
TAD = Domaines Topologiquement Associés.
TDG = Thymine DNA glycolase.
TE = Element Transposable (Transposable Element).
TET = Ten-Eleven Translocation.
TLR = Récepteurs de type Toll (Toll-like receptors).
TRANSGIGAS = Acquisition de résistances TRANs-générationnelles chez l'huitre creuse *Crassostrea GIGAS* : implication de la composante épigénétique
ZFP57 = Protéine à doigt de zinc (Zinc Finger Protein 57).

Introduction générale

« Rien n'a de sens en biologie, si ce n'est à la lumière de l'évolution »

Theodosius Dobjansky, 1937

I. L'évolution biologique

L'évolution en biologie est le processus par lequel la vie sur Terre a changé, depuis son émergence il y a plus de 4 milliards d'années, jusqu'à donner la biodiversité* actuelle (Weiss, 2018). C'est un ensemble de changements, subis au cours des temps géologiques par les organismes vivants, ayant pour résultat l'apparition de nouvelles formes de vie (Zimmer, 2012). L'évolution est définie dans de nombreux manuels scolaires et universitaires comme : « Modification génétique* d'une population d'organismes » (Raven et al., 2012). Cette définition issue de la synthèse moderne de l'évolution (Huxley, 1942) est le fruit d'années de réflexions, d'expérimentations et de découvertes qui ont révolutionné le monde de la biologie. Néanmoins, à l'heure actuelle, de nombreuses études mettant en avant l'implication de mécanismes non-génétiques dans l'adaptation, parfois de façon transgénérationnelle, rendent cette définition incomplète. Cette première partie de la thèse a pour objectif de définir les concepts sur lesquels repose l'étude de l'évolution, ainsi que la nécessité de la mise en place d'une nouvelle théorie de l'évolution.

1. Trois concepts clef : variabilité, transmission et adaptation

A. La variabilité des caractères

Le **phénotype*** est l'ensemble des caractères exprimés par un individu (morphologiques, physiologiques et comportementaux). Il peut être défini comme le corps transitoire qui porte l'empreinte des environnements et des expériences que le corps a rencontrés mais dont les caractéristiques ne peuvent pas être transmises directement à la descendance (Bonduriansky & Day, 2018). La **diversité phénotypique** est l'ensemble des caractères pouvant être présents dans une population. L'étude de l'évolution va reposer sur l'observation de cette diversité phénotypique qui va pouvoir varier au cours de la vie des individus mais également sur plusieurs générations en cas de transmission héréditaire de l'information à l'origine du phénotype. Enfin pour qu'une modification phénotypique ait une valeur évolutive, il faut qu'elle puisse être transmise à la descendance. Ainsi seuls les changements dans le phénotype, transmis aux générations suivantes et donc **héréditaires** sont susceptibles de jouer un rôle dans l'évolution.

B. La Transmission

Tous les organismes vivants ont la particularité de pouvoir se reproduire en donnant naissance à des descendants possédant des caractéristiques similaires (Bonduriansky & Day, 2018). Les populations et les espèces biologiques sont donc constituées d'individus tous uniques, mais présentant des similarités et capables de transmettre une partie de leurs caractéristiques individuelles à leurs descendants (Godfrey-Smith, 2009). Descendants et parents se ressemblent et le patron de ressemblance parents-enfants est l'**hérédité***. L'**héritabilité*** est la proportion de la variabilité phénotypique due à des changements dans les facteurs héréditaires. Cette transmission de trait peut avoir lieu au niveau d'un individu : transmission mitotique d'une modification cellulaire (dans ce cas on a bien une transmission de la cellule mère à la cellule fille) ; ou au niveau d'une population : transmission entre individus via la reproduction par exemple. Cette transmission des caractères est fondamentale pour le processus évolutif. Sans transmission, l'apparition d'un nouveau trait ne touchera que l'individu qui en est porteur et n'aura pas de conséquence en matière d'évolution des populations. Sur le phénotype d'un individu, qu'il soit transmissible ou non, vont s'exercer des pressions environnementales qui vont parfois donner lieu à un phénotype alternatif. C'est pour définir la partie transmissible des caractéristiques des organismes (Peirson, 2013) que Johannsen en 1909, introduit les termes de **génotype*** et de **phénotype** (Johannsen, 1909). A l'époque, l'ADN n'a pas encore été découvert et sont appelés « gènes » de potentiels éléments cellulaires héréditaires portant les caractéristiques des individus.

C. L'adaptation

L'environnement exerce des pressions sur les individus qui vivent en son sein. Ces pressions peuvent être de différentes sources : biotiques* (émises par d'autres organismes vivants) comme abiotiques* (non liées à des organismes vivants, exemple : pressions physico-chimiques). L'ensemble des pressions environnementales exercées sur les individus est appelé **sélection naturelle*** (Darwin, 1859). Pour qu'un organisme puisse survivre et se reproduire dans un écosystème*, il faut qu'il y soit adapté. En d'autres termes, il est nécessaire qu'il soit capable de tirer parti de son environnement : d'y puiser les sources de nutriments nécessaires à sa croissance et son développement, qu'il puisse s'y déplacer afin de rencontrer ses congénères (dans le cas d'une reproduction sexuée) ou qu'il ait la possibilité de disséminer sa semence (dans le cas d'organismes sessiles) mais également qu'il ait des moyens lui permettant d'échapper à ses prédateurs potentiels. La mesure de l'**adaptation*** d'un organisme à un environnement donné est estimée par sa **fitness** ou **valeur sélective*** (capacité de survie multipliée par le nombre de descendants) (Thomas et al., 2016). L'adaptation est donc un processus évolutif dynamique qui permet la survie et la reproduction des organismes dans un environnement. Une adaptation peut alors être définie comme « structure, physiologie ou

comportement particulier favorable à la survie et à la reproduction d'un organisme dans un milieu donné » (Raven et al., 2012). L'adaptation d'un organisme, d'une population voire même d'une espèce, ne peut pas exister sans diversité au niveau des caractères et/ou de leur expression.

L'évolution est possible sans adaptation, lorsqu'un caractère nouveau apparaît et qu'il ne modifie pas la fitness de son porteur, alors ce caractère est neutre au niveau de la sélection naturelle. En revanche, l'évolution adaptative nécessite que la variabilité phénotypique transmissible ait une influence sur son porteur et lui procure un avantage reproducteur.

En conclusion, l'évolution repose sur deux notions clef : la **variabilité** et la transmission **héritable**. Mais des changements évolutifs peuvent être neutres sur le plan de la sélection naturelle. L'évolution adaptative nécessite les trois mécanismes : **variabilité**, **transmission** et **adaptation**. Ainsi les changements évolutifs adaptatifs peuvent être définis comme : « le résultat d'une compétition entre les individus, qui diffèrent les uns des autres via des caractéristiques hérissables, pour des ressources limitées. A travers la sélection naturelle, les lignées s'adaptent doucement et divergent les unes des autres, certaines s'éteignent tandis que d'autres peuvent éventuellement devenir de nouvelles espèces. » (Jablonka & Lamb, 2011). Les changements évolutifs observés dans la nature fascinent l'espèce humaine depuis l'Antiquité, mais pour étudier l'évolution, il a fallu définir un cadre conceptuel abordant les différentes sources de changements hérissables. Ce cadre théorique fait actuellement l'objet d'un remaniement afin d'intégrer de nouveaux mécanismes hérissables dans la définition de l'évolution. Certaines questions sous-jacentes à l'intégration de ces nouveaux éléments sont au cœur de cette thèse.

2. Vers une théorie étendue de l'Evolution

Les réflexions concernant la notion d'évolution et l'existence d'une origine commune pour toutes les espèces vivantes ont émergé à travers de nombreux penseurs, différentes époques et différentes régions du monde. Mais ces idées ont souvent été réfutées par manque de preuves concrètes, ou alors elles se sont heurtées au dogme religieux. Ce n'est qu'au 18^{ème} siècle que les premières théories évolutionnistes, s'appuyant sur des observations, des exemples, et une argumentation claire, voient le jour.

A. Les premières théories évolutionnistes

a. Lamarck et le transformisme

Le naturaliste Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829) fut le premier à émettre dans « Philosophie zoologique » en 1809 (de Lamarck, 1809), une théorie scientifique de l'évolution : le **transformisme***. Il explique notamment que les espèces vont pouvoir se transformer en fonction de

leur environnement et de leurs besoins et qu'elles vont transmettre leurs nouveaux caractères acquis, de génération en génération, donnant lieu à une plus grande complexité et diversité d'espèces.

b. Darwin et la sélection naturelle

La **sélection naturelle** introduite par Darwin en 1859, émise de façon concomitante par Alfred Russel Wallace (1823-1913), fit grand bruit et révolutionna le monde de la biologie. En réalité dans son livre « De l'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle » (Darwin, 1859), ce n'est pas une théorie mais un ensemble de théories qu'il expose (Mayr, 1993) : (1) il admet la notion d'évolution et la théorie que les organismes se transforment au cours du temps. (2) Il émet l'hypothèse d'une ascendance commune et donc d'un ancêtre commun à tous les organismes vivants. (3) Il émet également la théorie de la multiplication des espèces et donc de la naissance d'espèces filles par isolement ou effet greffe. (4) Il expose aussi la théorie du gradualisme et le fait que les espèces changent progressivement et non pas de façon subite et enfin (5) il expose sa théorie de la sélection naturelle, processus entraînant la sélection par l'environnement des individus présentant les phénotypes les plus avantageux. Les idées de Darwin associées à la pertinence des indices collectés durant ses voyages et illustrant son discours ont entraîné un florilège de réactions. Si les théories de l'évolution, de l'ascendance commune et de la multiplication des espèces furent aisément adoptées, la question des mécanismes sous-jacents devint alors le nouveau mystère à éclaircir (Mayr, 1993).

c. Néo-Darwinisme

La théorie du transformisme de Lamarck s'est heurtée à de nombreuses critiques. Friedrich Léopold August Weismann (1834-1914) fit des observations de la division cellulaire et de la méiose* qui le conduisirent à émettre sa théorie sur la continuité du plasma germinatif : les organismes sont constitués de cellules somatiques qui assurent les fonctions vitales et de cellules germinales* qui transmettent l'information héréditaire (Winther, 2001). Les cellules germinales ne sont pas affectées par ce qu'expérimentent les cellules somatiques et ne peuvent donc pas être modifiées en fonction. Il réfuta alors la théorie du transformisme de Lamarck et l'hérédité des caractères acquis, théorie que Darwin n'avait quant à lui pas réfutée, ainsi est né le **Néo-Darwinisme** (Haig, 2007).

B. L'essor de la génétique

a. Découverte des bases de l'hérédité

Johann Gregor Mendel (1822-1884) et ses travaux sur l'hérédité via des croisements de pois permirent la découverte des lois de l'hérédité. Le biologiste William Bateson (1861-1926) introduit le terme génétique en référence à l'étude de l'hérédité en 1905. Et en 1909, le botaniste Wilhelm Johannsen (1857-1927) argue que la transmission des caractéristiques physiques, de génération en génération, est due à des petits éléments présents dans la cellule et utilise alors le terme gène comme

support de l'hérédité sur lequel les caractéristiques de l'organisme seraient spécifiées. En 1919, Phoebus Levene (1869-1940) découvre que les nucléotides* sont constitués d'une base, d'un ose* et d'un groupement phosphate et il suggère que l'**acide désoxyribonucléique** (ADN) est en fait une succession de nucléotides reliés les uns aux autres par leur groupe phosphate, les bases se succédant de façon répétées. Les travaux de Thomas Hunt Morgan (1866-1945) sur les croisements de drosophiles eurent quant à eux une portée majeure car ils confirmèrent la génétique mendélienne et permirent la découverte de l'implication des chromosomes dans l'hérédité. A la même époque, Ronald Aylmer Fisher (1890-1962) réconcilie statistique et génétique mendélienne en définissant les bases de la génétique des populations. Cette période vit d'autres travaux notables comme ceux de John Burdon Sanderson Haldane (1892-1964) qui étudia les populations de phalène du bouleau et démontra la rapidité d'action de la sélection naturelle, ou encore ceux de Sewall Wright (1889-1988) qui fut à l'origine du concept de dérive génétique*.

La découverte de l'implication de l'ADN dans l'hérédité débute en 1928 avec le travail de Frederick Griffith (1879-1941) sur les pneumocoques. Il infeste des souris avec des pneumocoques lisses virulents (mort des souris) et des pneumocoques rugueux avirulents (survie des souris). Mais lorsqu'il infeste une souris avec des bactéries lisses tuées par la chaleur et des bactéries rugueuses vivantes, il constate que la souris meurt et il retrouve dans la souris des bactéries lisses vivantes. Il en conclut qu'une propriété des bactéries lisses tuées a pu transformer les bactéries rugueuses. Il appellera ce composant bactérien le principe transformant (Lewin, 1999). Ses travaux furent repris en 1944 par Oswald Avery (1877-1955) qui purifia le principe transformant de Griffith et qui après l'avoir traité avec différentes enzymes* parvint à démontrer que seule une digestion de l'ADN empêche la transformation des bactéries rugueuse en lisses, démontrant que l'ADN est le support de l'hérédité et faisant le lien entre ADN et gènes. La structure en double hélice de l'ADN fut quant à elle découverte en 1953 par James Watson (né en 1928), Francis Crick (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958).

b. Théorie synthétique de l'évolution

En 1942, naît la **théorie synthétique de l'évolution** (ou théorie moderne de l'évolution), sous la plume de Julian Huxley (1887-1975) qui parvint à combiner génétique des populations et génétique mendélienne, sélection naturelle et hérédité dans une seule et même théorie de l'évolution. Cette théorie présente l'évolution et l'adaptation comme des processus lents, issus de mutations* génétiques aléatoires sur lesquelles la sélection naturelle va effectuer un tri en avantageant dans un environnement donné, les individus les plus adaptés (Huxley, 1942). Les progrès de la biologie moléculaire qui ont eu lieu par la suite, notamment la découverte de la structure de l'ADN, ont permis de conceptualiser cette théorie et de l'étoffer. Dans la théorie synthétique de l'évolution, le gène est l'unité de base et, en 1972, Bowman illustre l'importance de la génétique dans la mise en place du

phénotype. Son équation est un exemple parfait montrant le poids criant donné à la génétique dans la théorie synthétique de l'évolution :

$$\textit{Phénotype} = \textit{Génotype} \times \textit{Environnement}$$

d'après Bowman, 1972 et influencé par Haldane, 1946

Dans cette équation, seule l'interaction entre le génotype d'un individu et son environnement entraîne la mise en place du phénotype. Pour qu'un phénotype change, il y a alors nécessité d'avoir un changement génétique et/ou un changement d'environnement.

c. « Missing heritability » et variabilité non génétique

Au cours des années 2000, de nombreuses études visant à calculer la proportion d'un caractère héritable due aux gènes ont permis de mettre en évidence une inadéquation entre l'estimation et la réalité. Ainsi pour certains caractères comme la taille, l'autisme ou encore la schizophrénie, l'étude des variants génétiques liés à ces traits n'a pas permis d'expliquer 100% de l'héritabilité (Maher, 2008; Trerotola et al., 2009) conduisant à la demande de nombreux auteurs d'une révision de la théorie de l'évolution afin d'y incorporer, outre la génétique, d'autres mécanismes pouvant jouer un rôle dans la mise en place du phénotype et sa transmission entre générations (Pigliucci, 2007; Danchin & Wagner, 2010; Jablonka & Lamb, 2014; Laland et al., 2014; Jablonka & Noble, 2019). A l'heure actuelle, de plus en plus de travaux visant à mettre en évidence le rôle de facteurs non-génétiques dans la mise en place du phénotype et dans l'évolution sont publiés. Néanmoins l'importance de ses nouveaux facteurs de variabilité dans l'évolution reste encore controversée.

Au sein des facteurs de variabilité soumis à débats sont considérés tous les mécanismes non génétiques, donc non liés à une modification de la séquence d'ADN, permettant de générer des variants phénotypiques transmissibles entre générations (Bonduriansky & Day, 2009; Bonduriansky, 2012; Laland et al., 2015). Mécanismes génétiques et non-génétiques ont été regroupés sous le terme « **d'héritabilité inclusive** » (Danchin & Wagner, 2010; Danchin et al., 2011) et « **système d'héritabilité** » (Cosseau et al., 2017) ou encore « **héritabilité étendue** » (Bonduriansky & Day, 2018).

Suivant cette volonté de lier héritabilité génétique et non-génétique dans une seule et même théorie de l'évolution, la **théorie étendue de l'évolution** a été proposée (Pigliucci & Muller, 2010; Dickins & Rahman, 2012; Laland et al., 2015).

II. Théorie étendue de l'évolution

« *L'exclusivité était une source de faiblesse* »

Yves Delage et Marie Goldsmith, 1909,

À propos des naturalistes de l'époque défendant tel ou tel mécanisme comme étant la cause unique des changements évolutifs.

Les travaux présentés dans cette thèse se veulent inscrits dans une démarche intégrative et se situent donc à l'intersection entre variabilité génétique et variabilité non-génétique dans la mise en place du phénotype. Tous les concepts ainsi étudiés peuvent être représentés sous la forme d'un système d'équations.

L'évolution biologique repose sur l'apparition de variants phénotypique et leur transmission aux générations suivantes (voir I.1), dans cette thèse, l'équation suivante est ainsi proposée :

$$\mathbf{Evolution = variabilité \times transmission}$$

Depuis l'essor de travaux mettant en évidence l'importance de la variabilité non-génétique, l'équation de Bowman a été modifiée afin d'intégrer tous les mécanismes connus pouvant générer de la variabilité phénotypique :

$$\Delta \text{ phénotypique} = (\Delta \text{ génétique} \times \Delta \text{ non génétique}) \times \text{environnement}$$

avec Δ = la variabilité

La variabilité phénotypique d'un individu ou d'une population est donc le résultat de l'interaction entre sa composante génétique et sa composante non-génétique qui sont toutes deux influencées par l'environnement. L'information variable doit ensuite être transmise entre générations. Dans ce cas, la variabilité phénotypique transmise est le résultat de la part de la variabilité génétique héritable couplée à la part de la variabilité non-génétique héritable. Ces deux sous-ensembles étant reliés au sein d'un système d'héritabilité sur lequel, l'environnement intervient (Cosseau et al., 2017):

$$\Delta \text{ phénotypique transmise} = \underbrace{(\Delta \text{ héritable génétique} \times \Delta \text{ héritable non génétique})}_{\text{Système d'héritabilité}} \times \text{environnement}$$

avec Δ = la variabilité

Dans ce cas, au sein de ce manuscrit, une nouvelle conceptualisation de l'évolution est suggérée sous la forme de l'équation (Figure 1) :

$$\mathbf{Evolution = variabilité \times transmission}$$

$$\Delta \text{ phénotypique} = (\Delta \text{ génétique} \times \Delta \text{ non génétique}) \times \text{environnement}$$

$$\Delta \text{ phénotypique transmise} = \underbrace{(\Delta \text{ héritable génétique} \times \Delta \text{ héritable non génétique})}_{\text{Système d'héritabilité}} \times \text{environnement}$$

Figure 1 : Une nouvelle équation de l'évolution.

Une nouvelle équation prenant en compte dans le cadre de la théorie étendue de l'évolution, à la fois les systèmes d'héritabilité génétique et non génétique comme générateurs de variabilité phénotypiques.

Modifié d'après Danchin & Wagner, 2010 et Cosseau et al., 2017.

Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution adaptative, un troisième paramètre entre en jeu donnant l'équation suivante :

$$\mathbf{Evolution\ adaptative = variabilité \times transmission \times adaptation}$$

La variabilité phénotypique héritable et adaptative peut donc être écrite de la sorte :

$$\Delta\ \mathbf{phénotypique\ adaptative\ transmise = (Système\ d'héritabilité) \times environnement \times adaptation}$$

L'adaptation est représentée par la survie et le nombre de descendants du ou des individus porteurs du phénotype en question. Survie et nombre de descendants vont dépendre de l'environnement dans lequel, le ou les individus porteurs du phénotype vont vivre. Un phénotype peut être adaptatif dans un environnement donné et non adaptatif dans un autre. Dans cette thèse, l'adaptation est alors définie par l'équation suivante :

$$\mathbf{Adaptation = (survie \times nombre\ de\ descendants) \times environnement}$$

Dans ce cas, on constate que l'environnement va jouer un double rôle dans la transmission des variants phénotypiques adaptatifs : un rôle inductible sur le système d'héritabilité et un rôle sélectif dans le cadre de l'adaptation (Figure 2).

$$\mathbf{Evolution\ adaptative = variabilité \times transmission \times adaptation}$$
$$\Delta\ \mathbf{phénotypique\ adaptative\ transmise = (Système\ d'héritabilité) \times environnement \times adaptation}$$
$$\mathbf{Adaptation = (survie \times nombre\ de\ descendants) \times environnement}$$

Figure 2 : L'évolution adaptative dans la nouvelle théorie de l'évolution.

Finalement ici l'évolution adaptative est conceptualisée en tant que la variabilité phénotypique adaptative qui va être transmise, représentée sous la forme :

$$\Delta\ \mathbf{phénotypique\ adaptative\ transmise = Système\ d'héritabilité \times E\ inductible \times (Survie \times nb\ descendants) \times E\ sélectif}$$

Avec E = environnement

C'est cette dernière équation qui sera utilisée dans la suite du manuscrit pour illustrer la théorie étendue de l'évolution. Au sein de l'hérédité non-génétique se place par exemple la transmission culturelle (Figure 2) illustrant la possibilité d'une transmission des caractères acquis. La théorie étendue de l'évolution réconcilie donc **Néo-Darwinisme** et **Lamarckisme** en juxtaposant deux composantes de la variabilité héritables au sein d'un même système d'héritabilité : l'héritabilité génétique et l'héritabilité non-génétique. Seront surtout développés dans cette introduction, les

parties concernant l'**épigénétique*** et le **microbiote*** car ces deux mécanismes ont été particulièrement étudiés durant au cours de ces trois années de thèse (Figure 3).

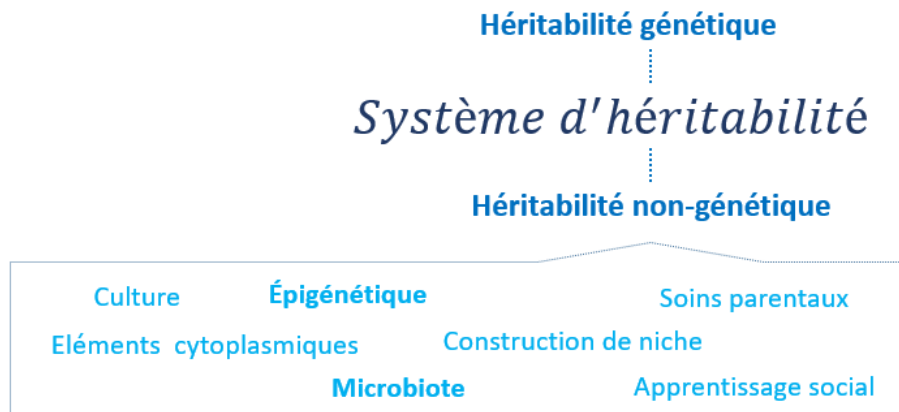


Figure 3 : Les différents mécanismes intervenant dans l'héritabilité non génétique.

1. Héritabilité génétique

La molécule d'ADN, formée de deux chaînes complémentaires de nucléotides enroulées en une double hélice, est présente dans le noyau des cellules de tous les organismes vivants et est la base de la vie sur Terre. En effet, la succession de nucléotides constituant la molécule d'ADN est le mode d'emploi de fonctionnement de nos cellules. Ces enchainements de nucléotides dans un ordre très précis vont permettre aux cellules de stocker l'information nécessaire au bon fonctionnement des organismes vivants. On appelle gènes les segments d'ADN qui sont impliqués dans la synthèse des protéines et déterminent ainsi un caractère précis d'un organisme (Lewin, 1999). Le **génotype** est l'ensemble des gènes et de l'information qui y est codée, qu'un individu porte, et qui peuvent être transmis à sa descendance (Bonduriansky & Day, 2018).

A. Les différentes formes de variabilité génétique

a. Mutations et polymorphismes de nucléotides individuels

L'apparition de modifications (**mutations**) dans la séquence nucléotidique des gènes peut conduire à des modifications structurales des protéines et des enzymes ainsi codées, entraînant la genèse de phénotypes variés. Par exemple, une mutation survenue sur le gène codant pour l'hémoglobine* est responsable de la modification de la structure des globules rouges entraînant la maladie de la drépanocytose*. Ces mutations qui ne touchent qu'un seul nucléotide sont nommées polymorphismes de nucléotides individuel ou « single nucleotide polymorphisms » (**SNPs**). Outre l'apparition de nouvelles protéines, les mutations peuvent rendre des gènes inactifs, gènes que l'on appelle **pseudogènes***, bloquant la synthèse des protéines associées. Autrefois uniquement

considérées comme aléatoires et spontanées, les mutations peuvent désormais être ciblées et induites artificiellement grâce à différentes technologies comme notamment la technologie CRISPR-cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats-cas9) (Doudna & Charpentier, 2014). Cette technologie a été adaptée du système de défense naturellement présent chez les bactéries pour se défendre contre les virus. Lorsqu'une bactérie détecte de l'ADN viral, elle va générer des acides ribonucléiques (ARNs) correspondants qui vont se fixer sur l'ADN viral et vont recruter la protéine cas9. Cette protéine va ensuite couper l'ADN viral. Cette méthode permet de cibler les séquences d'ADN et de les couper ainsi que d'y insérer d'autres fragments d'ADN et va permettre par exemple, d'étudier directement la fonction des gènes.

b. Variation du nombre de copies de gènes et réarrangements chromosomiques

La variation du nombre de copies ou « Copy Number Variation » (CNVs) produit un nombre variable de copies de certains gènes par rapport à un génome de référence (Volker et al., 2010). Ce phénomène apparaît lorsque certaines portions du génome sont dupliquées. Un CNV est une copie d'un fragment d'ADN d'au moins un kilobases (Freeman et al., 2006). Les CNVs peuvent comporter des régions codantes entraînant une duplication de ces gènes. De telles duplications peuvent participer à l'apparition de nouveaux caractères, les nouvelles copies du gène pouvant elles aussi subir des mutations (Raven et al., 2012).

Mutations et variations de séquences peuvent avoir des effets sur les chromosomes. Ainsi, on peut observer des remaniements au sein des chromosomes. Au cours de la division cellulaire des cassures chromosomiques peuvent avoir lieu suite à une délétion, une duplication ou encore une translocation d'une partie du génome entraînant le plus souvent une aberration de structure chromosomique. Les chromosomes peuvent entrer en interaction les uns avec les autres ce qui peut être à l'origine de fusions chromosomiques ou de transferts et/ou de duplications de régions géniques d'un chromosome à d'autres, ceci entraînant la possibilité de l'acquisition de nouvelles fonctions biologiques (Raven et al., 2012). Parfois, ce sont des chromosomes entiers qui sont dupliqués ou perdus entraînant un nombre anormal de chromosomes dans la cellule (aneuploïdie*). Ceci peut arriver via une non-séparation de chromosomes homologues ou de chromatides pendant la méiose.

c. Éléments transposables

Les éléments transposables* (TEs) sont des fragments d'ADN mobiles qui vont pouvoir se déplacer de façon aléatoire dans le génome en passant d'un locus* à un autre (McClintock, 1948). Le mouvement de ces morceaux d'ADN va se faire par duplication, on parle alors de transposons. Ou bien, cela, peut également être dû à l'intermédiaire d'un ARN, on parle alors de retrotransposons (Fedoroff, 2012). Les éléments transposables sont très mutagènes, leur insertions pouvant causer des mutations

dans les régions codantes ou régulatrices (Schrader & Schmitz, 2019). Ils sont également impliqués dans certains réarrangements chromosomiques (Gray, 2000) et ont été montrés comme impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (Döring & Starlinger, 1984). Les éléments transposables peuvent donc contribuer fortement à la génération de variants génétiques potentiellement adaptatifs (Schrader & Schmitz, 2019).

d. Transmission des variants génétiques

Les caractéristiques génétiques des cellules sont transmises à l'identique au cours de la mitose* : une cellule se divisant et donnant deux cellules filles possédant la même information génétique. Ainsi des variations génétiques vont pouvoir se propager au sein d'un organisme, on parle alors d'**héritabilité mitotique**. De même lors de la reproduction, une partie de l'information génétique de chaque parent (ou d'un seul lors d'une reproduction asexuée) est transmise à la descendance via les gamètes, c'est l'**héritabilité méiotique**. Ainsi la transmission des caractéristiques génétiques s'effectue des parents aux enfants. Lors des événements de transduction, de réplication et de réparation de l'ADN, des erreurs peuvent survenir avec un taux variable selon les organismes, produisant l'apparition de mutations. Ainsi, 10^{-8} gènes mutants par épisode de réplication apparaissent chez les bactériophages de type T2 ; en moyenne, 10^{-7} cellules mutantes sont créés par division cellulaires chez les bactéries ; et entre $2 \cdot 10^{-5}$ et $7 \cdot 10^{-5}$ gamètes mutants sont produits parmi la totalité des gamètes chez la drosophile et l'Homme (Thomas et al., 2016).

2. Héritabilité non-génétique

L'héritabilité non-génétique également appelée « soft-inheritance » (Mayr, 1982) est le résultat de la variabilité non-génétique transmissible aux générations suivantes (Dickins & Rahman, 2012). Parmi ces facteurs de variabilité transmissible ont été identifiés : l'épigénétique, le microbiote, le comportement, l'apprentissage social et la culture (van der Post & Hogeweg, 2009; Reader, 2016), les effets parentaux (Kirkpatrick & Lande, 1989), la transmission d'hormones* (Smiseth et al., 2011), la transmission d'anticorps* (Baintner, 2007) et la transmission de niche (Odling-Smee, 2007).

A. Epigénétique

a. Naissance de l'épigénétique

L'origine de l'épigénétique remonte à l'Antiquité et aux questionnements à propos de l'évolution de l'œuf jusqu'à un organisme possédant des tissus différenciés. A l'époque, Aristote s'est beaucoup intéressé à l'embryologie et à mis en évidence le développement graduel de l'œuf qui sera plus tard appelé « épigenesis » (Van Speybroeck et al., 2006). A l'inverse, d'autres penseurs tels Galen de Pergamos (129-200) croyaient en l'existence dans l'œuf de l'organisme préformé qui se

développerait petit à petit (Van Speybroeck et al., 2006). Plus tard et jusqu'à la révolution scientifique, le préformationnisme reste le courant de pensée dominant et un de ses exemples criant fut la théorie de l'animalculisme* (Van Speybroeck et al., 2006) émise en 1694 par Nicolas Hartsoeker (1656-1725) qui suivit la découverte du spermatozoïde par Antoni Van Leewenhoek (1632-1723) en 1677 (Karamanou et al., 2010), et dans laquelle le spermatozoïde contiendrait l'organisme entier sous la forme d'un homoncule*. L'idée de la préformation restera majoritaire jusqu'au XIX^{ème} siècle. En 1651, William Harvey (1578-1657) reprend la théorie de l'épigenèse d'Aristote en constatant qu'au cours du développement de l'œuf, de nouvelles structures apparaissent (Van Speybroeck et al., 2006). En 1891, Hans Driesch (1867-1941) étudie le développement des œufs d'oursins et constate que même lorsqu'il sépare les blastomères*, ceux-ci continuent de se développer et que chacun peut donner un embryon (Sander, 1992). Cette découverte porte un coup au préformationnisme qui est définitivement abandonné avec la découverte de l'induction d'un signal chimique produit par les tissus cellulaires qui entraîne la différenciation des tissus adjacents : l'induction embryonnaire découverte par Hilde Mangold (1869-1941) (Spemann & Mangold, 1924).

Au début du 20^{ème} siècle, l'idée que des éléments comme les gènes puissent être le support de toute la variabilité phénotypique et la génétique mendélienne, ne firent pas l'unanimité. Ces idées furent notamment rejetées par les biostatisticiens comme le mathématicien Karl Pearson (1857-1936) pour qui un tel support ne pouvait pas expliquer toute la variabilité observée au sein des populations. Et en 1917, Thomas Hunt Morgan énonce un paradoxe qui sera repris des années plus tard : « Si les caractères de l'individus sont déterminés par les gènes, pourquoi toutes les cellules d'un organisme ne sont-elles pas identiques ».

Victor Jollos (1887-1941) mis en évidence en 1921, un phénomène de transmission non génétique qu'il appela Dauermodifikationen (Brandt, 2008). Ainsi il exposa des lignées de paramécies, génétiquement identiques, à des contraintes environnementales comme des métaux lourds ou des chocs thermiques. Il découvrit que ses paramécies développaient une résistance à ces toxines*, ceci sur une centaine de générations même lorsque le stimulus fut supprimé dans les générations suivantes. En revanche, ces modifications phénotypiques finissent par disparaître plusieurs générations après la suppression du facteur stressant (Brandt, 2008). Ses travaux n'eurent malheureusement pas un franc succès car ils se heurtèrent aux tendances du moment sur le « tout génétique ». Néanmoins, les résultats de Victor Jollos apportèrent une nouvelle pierre à l'édifice et de nombreux chercheurs en déduisirent un phénomène d'hérédité cytoplasmique.

C'est de la volonté de lier embryogénèse et génétique qu'est née l'épigénétique. Conrad Hal Waddington s'est intéressé à la génétique du développement et c'est dans cette optique qu'il a créé en 1942 le terme épigénétique (Waddington, 1942). Il définit à l'époque l'épigénétique comme l'ensemble des événements menant à la mise en place de la génétique du développement.

L'épigénotype serait alors l'ensemble des processus environnementaux intervenant à l'interphase du génotype et du phénotype. Il formula plus tard le concept de paysage épigénétique, représentation métaphorique du destin d'une cellule en fonction des gènes (Figure 4). Ce paysage prend la forme d'une colline vallonnée en haut de laquelle est placée une bille. La bille est la cellule qui va glisser le long de la pente de la colline, et selon les gènes (les creux et les bossent dus

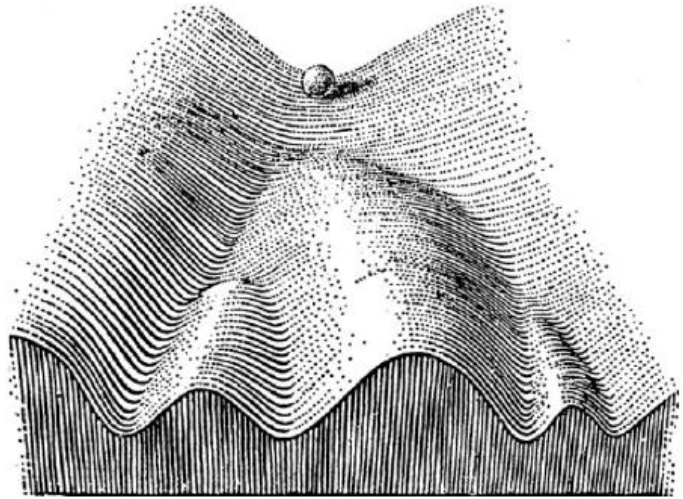


Figure 4 : Le paysage épigénétique de Waddington (Waddington, 1957)

aux reliefs de la colline), qui va atteindre son destin cellulaire, irréversible, en bas de la pente. De ses travaux sur la drosophile, il met également en évidence le concept d'assimilation génétique : en exposant des œufs de drosophiles à de la vapeur d'éther, il crée des mouches possédant deux thorax. Puis en sélectionnant artificiellement les mouches modifiées sur 20 générations successives, il parvient à obtenir des mouches présentant naturellement un double thorax. La sélection agit donc sur le phénotype et entraîne son assimilation génétique (Waddington, 1953).

A la fin du XXème siècle, deux hypothèses existent quant au devenir des cellules durant l'ontogénèse*. Soit au cours du développement, les cellules en se différenciant perdent une partie de leurs gènes, soit ces gènes sont sous-exprimés dans les cellules adultes. Dans les années 1970, John Gurdon (né en 1933) et Ron Laskey (né en 1945) travaillent sur des œufs de crapauds de *Xenopus laevis*, non fertilisés auxquels ils enlèvent le noyau. En transférant dans ces œufs des noyaux de cellules d'adulte, ils parviennent à générer des têtards bien développés, faisant la démonstration de la reprogrammation des gènes de cellules adultes dans l'œuf (Gurdon et al., 1975; Gurdon, 2009). En 1975, le premier mécanisme épigénétique est découvert via l'implication de la méthylation* de l'ADN dans l'inactivation du chromosome X (Riggs, 1975).

A cette époque, tous les regards sont focalisés sur la génétique mais quelques auteurs continuent cependant à s'intéresser à l'héritabilité au sens large. En 1990, John Maynard Smith publie l'article « Models of a dual Inheritance System » dans lequel il défend l'idée que les animaux, plantes et champignons possèdent deux systèmes d'héritabilité : celui qui est basé sur la transmission de l'ADN, et un second qu'il nomme système d'héritabilité épigénétique, et qui permettrait l'héritabilité cellulaire au cours de l'ontogénèse (Maynard Smith, 1990). L'épigénétique reste alors cantonnée au domaine du développement et la majorité des efforts de recherche reste tournée vers la génétique jusqu'à l'émergence du problème de la « missing heritability » (voir paragraphe 2.c. « Missing heritability » et variabilité non génétique).

Actuellement, un grand nombre d'études mettant en jeu l'implication de mécanismes épigénétiques dans la mise en place de phénotypes ont été publiées (Foret et al., 2012; Flores et al., 2013; Riviere et al., 2013; Herman & Sultan, 2016). Via les différents domaines de recherche dans lesquels l'épigénétique a été impliquée au cours des années, différentes définitions de l'épigénétique ont vu le jour (Nicoglou & Merlin, 2017). Dans le présent manuscrit, l'épigénétique est définie comme **l'étude des changements d'expression de gènes, réversibles et héréditaires mitotiquement et ou méiotiquement via les parents ou des ancêtres plus anciens, sans modification dans la séquence d'ADN des gènes** (d'après Holliday & Pugh, 1975). Les modifications épigénétiques doivent être transmises entre générations et doivent conférer un avantage reproducteur pour qu'elles puissent jouer un rôle dans l'évolution adaptative. Actuellement, la place de l'épigénétique dans la théorie étendue de l'évolution reste discutée par certains scientifiques du fait du manque de connaissances concernant les mécanismes moléculaires permettant à l'environnement de modifier l'épigénome ainsi que les mécanismes permettant la transmission des marques épigénétiques aux générations suivantes.

b. La structure chromatinienne

Chez les organismes eucaryotes*, l'ADN génomique est situé dans le noyau des cellules où il est empaqueté, en présence de protéines et d'ARN, pour former la chromatine (Figure 5) : un complexe d'ADN et de protéines formant les chromosomes des eucaryotes (Raven et al., 2012). La chromatine est classiquement structurée grâce aux nucléosomes* qui sont des octamères protéiques composés d'histones* : deux copies de H2A, H2B, H3 et H4 autour desquelles sont enroulées entre 145 et 147 paires de base d'ADN (Kornberg, 1974) (Figure 5).

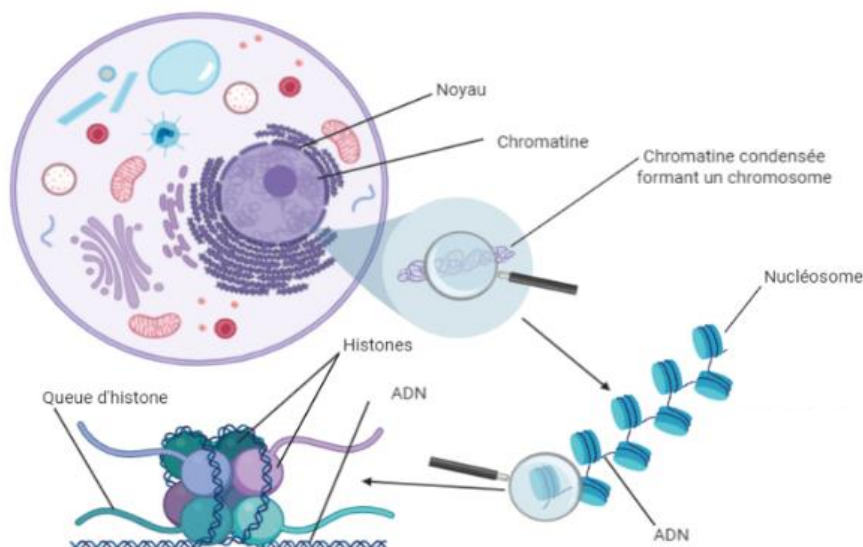


Figure 5 : De sa position à sa constitution, zoom sur la chromatine.

La chromatine située dans le noyau des cellules eucaryotes est composée d'un enchainement de nucléosomes qui sont eux-mêmes constitués d'un ensemble d'histones et d'ADN enroulé autour.

Schéma réalisé via bioRENDER : www.BIORENDER.com

Ces histones sont appelées *core* histones et sont celles principalement retrouvées au sein des nucléosomes. Cependant, il peut arriver qu'elles soient remplacées par des variants d'histones (voir partie sur les modifications et les variants d'histone I.1.c.) Les nucléosomes sont reliés les uns aux autres par de courts fragments d'ADN appelés ADN de lien ou *linker DNA*. Les fibres chromatiniennes sont alors constituées d'une succession de nucléosomes connectés les uns aux autres. La structure de la chromatine est dynamique et très importante pour la régulation de l'expression des gènes, la réplication et la réparation de l'ADN.

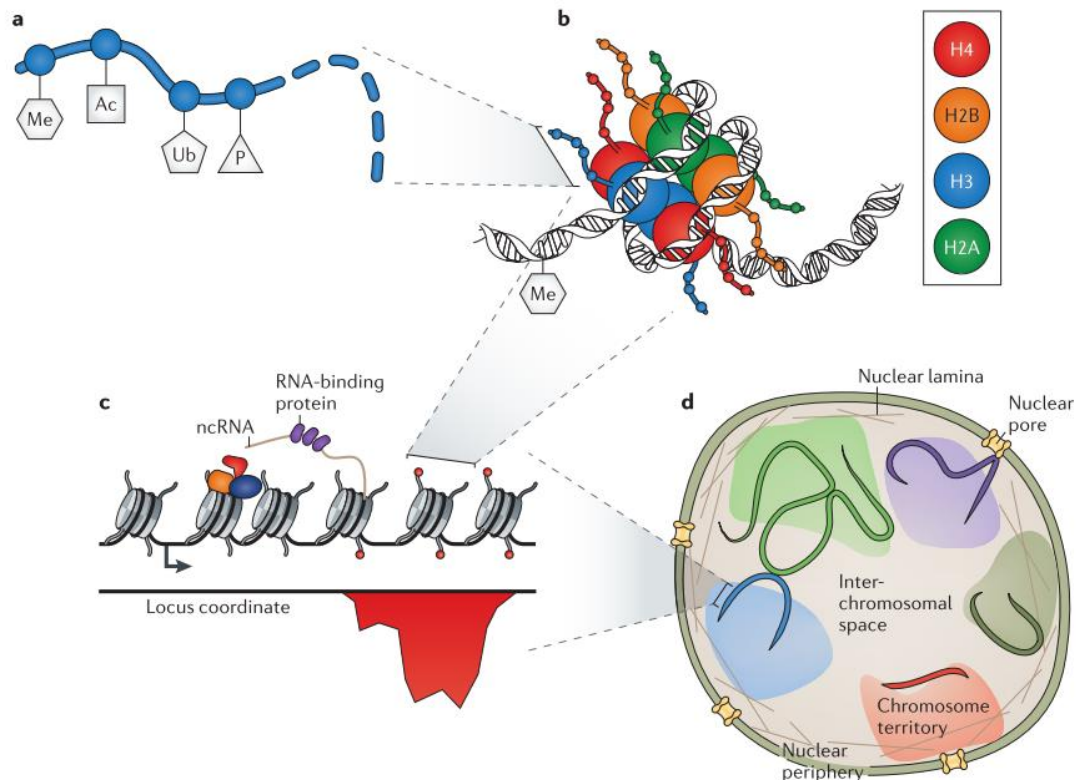


Figure 6 : Les différents porteurs de l'information épigénétique.

Les terminaisons amines des histones peuvent porter des modifications chimiques (a). Ces modifications influencent la liaison des protéines de régulation à l'ADN. Les histones peuvent également être remplacés par des variants. L'ADN génomique peut avoir des bases modifiées comme la méthylation de la cytosine (b). La position des nucléosomes sur l'ADN influence l'accessibilité de celui-ci aux facteurs de transcription et des brins d'ARN peuvent également se placer entre l'ADN et les facteurs de transcription limitant l'expression des gènes cibles (c). Dans le noyau, selon leur position, les nucléosomes des chromosomes peuvent interagir les uns avec les autres et/ou avec les protéines membranaires (d).

Figure tirée de Keung et al, 2015

A l'heure actuelle, quatre porteurs de l'information épigénétique ont été identifiés : l'ajout de composés chimiques sur l'ADN, les modifications et variants d'histones, les ARN non codants et l'organisation à l'intérieur du noyau ou topologie du noyau. Tous ces mécanismes vont agir directement ou indirectement sur la structure de la chromatine entraînant ainsi des changements dans l'expression des gènes. Ces différents mécanismes s'expriment à des échelles variées sur la chromatine et peuvent même agir sur les gènes, post-transcription (ARN non codants). Leurs niveaux d'action au sein du noyau cellulaire sont représentés sur la Figure 6.

c. Les porteurs de l'information épigénétique

Modifications chimiques de l'ADN

La principale modification de l'ADN étudiée à l'heure actuelle est la méthylation de l'ADN qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur un des carbones de certaines bases azotées de l'ADN.

Chez les procaryotes*, trois patrons de méthylation de l'ADN sont rencontrés : la cytosine* est impliquée dans deux d'entre eux ; donnant une 5 méthylcytosine (5mC) (Doskočil & Šormová, 1965) ou une N4 méthylcytosine (4mC) (Ehrlich et al., 1985, 1987). La méthylation est alors portée respectivement par le carbone 5 ou le carbone 4 de la cytosine. La troisième possibilité est la méthylation de l'adénine* en N6 méthyladénine (6mA) (Dunn & Smith, 1958). Les 5mC et 4mC ont comme rôle majeur la protection contre les enzymes de restrictions tandis que la 6mA joue un rôle dans la correction des erreurs de réplication (Marinus, 2010) et la sous-expression des transposons au cours du développement chez les eucaryotes (Zhang et al., 2015). Ces modifications sont induites par l'action des adénine-N6 and cytosine-N4 et cytosine-N5 méthyltransférases (Jeltsch, 2002).

La 5mC et la 6mA sont également présentes chez les eucaryotes. On les retrouve ainsi chez différentes espèces d'algues, de champignons, de protozoaires ou de plantes supérieures (Iyer et al., 2015) ainsi que chez certains animaux comme les *C. elegans* (Greer et al., 2015) et *D. melanogaster* (Zhang et al., 2015).

Néanmoins, pour la majorité des autres animaux, la méthylation est exclusivement présente sur le carbone 5 de la cytosine pour donner de la 5-méthylcytosine. Cette méthylation peut être présente sur des sites CG, CHG et CHH mais elle est retrouvée en plus forte proportion au niveau des sites CG (Feng et al., 2010). De plus chez les eucaryotes, les patterns de méthylation de l'ADN sont très diversifiés. Ainsi il existe quatre différents types de méthylation de l'ADN : (1) le génome est très faiblement méthylé, (2) le génome est faiblement méthylé, (3) le génome est globalement fortement méthylé, (4) la méthylation est de type mosaïque, c'est-à-dire présentant des zones fortement méthylées séparées par des zones non méthylées (Aliaga et al., 2019). Chez les mammifères, la grande majorité des espèces présentent une méthylation globale du génome (3) (Tweedie et al., 1997; Jones & Takai, 2001; Aliaga et al., 2019). Cette caractéristique est également retrouvée chez de nombreuses espèces de plantes, de poissons, quelques mollusques, insectes et amphibiens (Tweedie et al., 1997; Feng et al., 2010; Aliaga et al., 2019). Au sein de ce patron de méthylation globale, l'ADN est méthylé dans les transposons et les éléments génétiques mobiles, qui sont alors réduits au silence (Jones & Takai, 2001; Feng et al., 2010), les régions intergéniques et les unités transcriptionnelles incluant les exons* et les introns*. En revanche, il n'y a pas ou peu de méthylation dans les îlots CpG situés dans des régions promotrices (Bird, 1986). Une hyperméthylation de ces îlots CpG peut moduler l'expression des gènes en induisant une inhibition de l'expression (Bird, 1986; Costello et al., 2000). La méthylation de l'ADN influence des traits importants comme la réparation et la stabilité de l'ADN, l'inactivation du

chromosome X (Jones & Takai, 2002), les gènes à empreinte (Li et al., 1994), la pluripotence des cellules germinales et le développement des cellules souches (Sasaki & Matsui, 2008).

A l'inverse, chez de nombreuses autres espèces vivantes comprenant des insectes, des nématodes, des plathelminthes, quelques mollusques, la totalité des champignons, et certaines algues et plantes, la méthylation de l'ADN est globalement faible voire très faible dans le génome (type (2) et (1)) (Tweedie et al., 1997; Feng et al., 2010; Aliaga et al., 2019). Parmi ces organismes, la méthylation semble impliquée dans des mécanismes différents. Chez les champignons et les plantes, la méthylation quel que soit le contexte, est uniquement observée au niveau des éléments répétés (Zemach et al., 2010). Chez les algues possédant ces patrons de méthylation (1) et (2), comme *Chlamydomonas*, les cytosines méthylées sont présentes dans les trois contextes (CG, CHG et CHH) au niveau des gènes et uniquement dans les dinucléotides CG des transposons (Feng et al., 2010). Chez les insectes comme l'abeille, les éléments répétés ne sont pas méthylés et la méthylation de l'ADN est uniquement retrouvée dans les gènes (Feng et al., 2010).

Enfin le type (4) est retrouvé chez certaines espèces d'insectes, de plathelminthes, de mollusques et quelques plantes ainsi que chez *Ciona intestinalis* (Tweedie et al., 1997; Feng et al., 2010; Aliaga et al., 2019). Chez ces organismes, la régulation de l'expression des gènes par l'hyperméthylation des promoteurs* est pauvrement illustrée (Feng et al., 2010; Olson & Steven B Roberts, 2014b; Saint-Carlier & Riviere, 2015) et les éléments répétés ainsi que les régions intergéniques sont rarement méthylés (Simmen et al., 1999; Feng et al., 2010; Schaefer, 2010; Falckenhayn et al., 2013). A l'inverse, le corps des gènes est hautement méthylé (Zemach et al., 2010).

La méthylation des cytosines est assurée par des enzymes : les ADN méthyltransférases (DNMTs) qui existent sous trois catégories. Les DNMT1 servent à la maintenance de la méthylation. Les DNMT3 assurent la méthylation de novo. Enfin les DNMT2 ne méthylent pas l'ADN mais l'ARN. Ces enzymes sont très conservées au sein des eucaryotes. Chez certaines plantes, il existe également des méthyltransférases spécifiques (*plant-specific CHG méthyltransférases* ou CMTs) tandis que les champignons possèdent des ADN méthyltransférases nommées dim-2 (Zemach et al., 2010). Certains ARN non codants peuvent également intervenir dans la méthylation de l'ADN comme les hcsiARNs chez les plantes.

La méthylation de l'ADN est réversible (Figure 7). Elle peut être supprimée lors de la réplication de l'ADN ou par l'intermédiaire d'enzymes. Chez les eucaryotes, la 5mC est effacée par des enzymes : les TET (*Ten-Eleven Translocation*) qui vont chimiquement modifier les méthylcytosines, les TDG (*Thymine DNA glycolase*) ou encore des enzymes impliquées dans la voie métabolique des BER (*Base Excision Repair*) qui vont remplacer les cytosines modifiées par des cytosines simples. L'oxydation d'une 5-mC par les TET va donner une 5-hydroxyméthylcytosine (Tahiliani et al., 2009), une base nucléique pyrimidique* présente en grande quantité dans les cellules nerveuses (Kriaucionis & Heintz,

2009; Globisch et al., 2010) et les cellules germinales des mammifères (Gu et al., 2011) et à l'inverse très peu présente dans les cellules tumorales (Thomson & Meehan, 2017). Des études sur les cellules souches embryonnaires ont mis en évidence l'implication possible de la 5hmC dans la régulation de l'expression des gènes via une association avec des protéines régulatrices ou en jouant un rôle dans la conformation de la chromatine via un lien avec des modifications d'histones (Pastor et al., 2011; Szulwach et al., 2011).

L'action des TET sur la 5-hmC va ensuite donner une 5-formyl cytosine (5-fC), qui à son tour donnera naissance à une 5-carboxylcytosine (5-caC) après action des TET. 5-fC et 5-caC vont être remplacées par des cytosines via l'action des TDG ou des BER (Figure 7). Les implications possibles des différents produits de la dégradation de la cytosine méthylée, autre que la 5-hmC, n'ont actuellement pas été élucidées mais la 5-fc et la 5-caC sont présentes en plus grande quantité dans le cerveau et les cellules souches embryonnaire des souris, ce qui laisse supposer qu'elles pourraient également jouer un rôle régulateur.

Tout comme la 5mC, la 6mA peut être supprimée via l'action d'oxygénases de la famille des AlkB qui vont agir comme déméthylases de l'adénine (Figure 7). Les sous-produits issus de l'action de ces enzymes sont la 6-hydroxyméthyladénine (6-hmA) et la 6-formyl adénine (6-fA) dont les éventuelles implications en tant que marques épigénétiques n'ont pas encore été élucidées (Iyer et al., 2015).

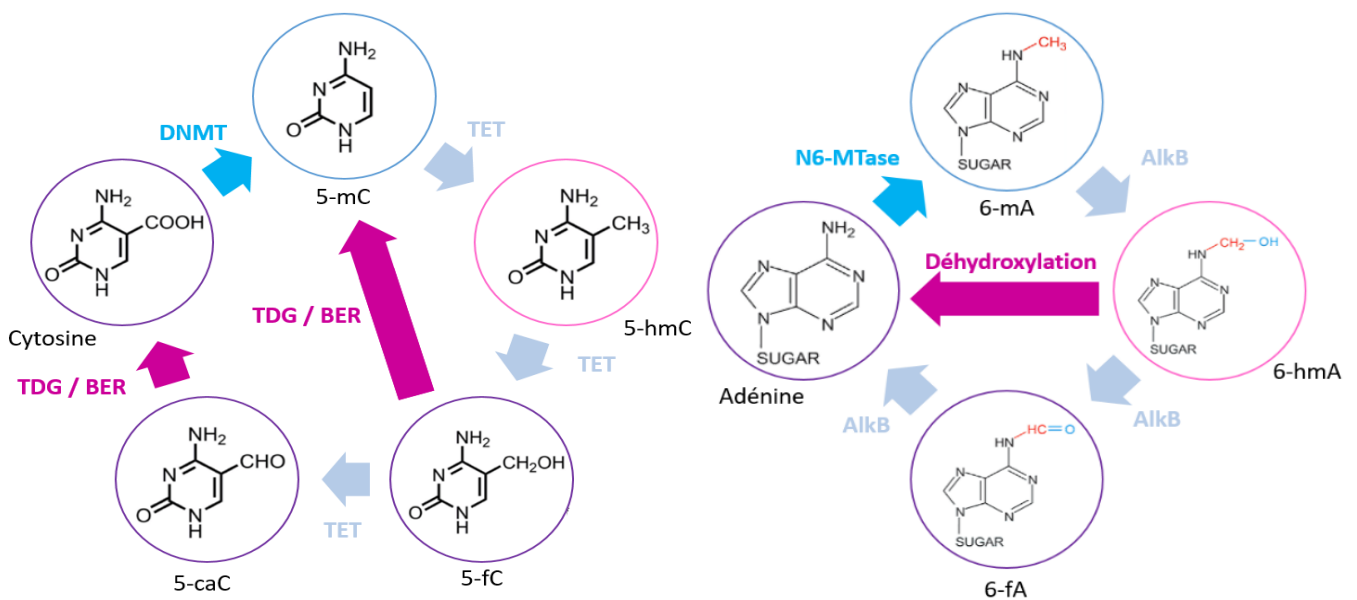


Figure 7 : Les voies de méthylation et déméthylation de l'ADN. D'après Shi et al, 2017 et Iyer et al, 2015.

Modifications d'histones et histones variants

Les différentes structures que peut prendre la chromatine vont dépendre de l'incorporation de variants d'histones et/ou de l'ajout de modification post-traductionnelles des queues d'histones ou terminaisons amines. En effet, tout comme l'ADN peut porter des modifications chimiques, les histones peuvent avoir leurs terminaisons amines modifiées. Ainsi une histone peut porter des marques variables comme de la méthylation, de l'acétylation*, de l'ubiquitination*, de la citrullination* (aussi appelée déimination), de la sumoylation*, de la neddylation*, de la glycosylation*, de la phosphorylation* ou encore de l'ADP ribosylation*. La méthylation des histones se produit surtout au niveau des lysines* qui peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées et des arginines* qui peuvent être mono ou di-méthylées. La phosphorylation et l'acétylation des histones entraînent une diminution de leur charge positive ce qui a pour conséquence de réduire les interactions entre ADN et histones. Cela rend la chromatine moins compacte et facilite l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription*. L'ubiquitination induit un changement de la conformation générale du nucléosome, qui va alors modifier les interactions intra-nucléosomiques et/ou les interactions avec d'autres complexes liés à la chromatine. L'ubiquitination des histones est impliquée dans la transcription, la maintenance de la structure chromatinienne et la réparation de l'ADN (Cao & Yan, 2012). La sumoylation agit de façon similaire à l'ubiquitination et a été montrée comme impliquée dans la répression de la transcription (Shiio & Eisenman, 2003). La citrullination réduit les liaisons hydrogène et induit une structure chromatinienne plus lâche (Wang et al., 2009). La neddylation de l'histone H4 est quant à elle impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN (Ma et al., 2013). L'ADP ribosylation intervient notamment au cours de la réparation de l'ADN où tous les histones se retrouvent ADP-rybosylés à la suite de dommage sur l'ATP (Messner & Hottiger, 2011). Elle est aussi impliquée dans la transcription des gènes, notamment au cours d'une infection, où l'ADP ribosylation des histones entraîne l'activation des gènes impliqués dans la réponse anti-inflammatoire des macrophages (Messner & Hottiger, 2011; Martinez-Zamudio & Ha, 2012).

Les modifications des histones sont catalysées par un panel d'enzymes, certaines agissant sur l'établissement des modifications et d'autres à l'inverse, contribuant à la suppression des modifications. Ainsi, on retrouve notamment des méthyltransférases et déméthylases, des acétyltransférases* et déacétylases, des histonases, des ribolases et des déribosylases, des ubiquitinases et déubiquitinases, ainsi que des kinases et des phosphatases (Zhang & Reinberg, 2001; Simone & Peserico, 2011). D'autres protéines interviennent dans la mise en place de modifications d'histone. Les eucaryotes possèdent des protéines comme celles du groupe Trithorax et celles du groupe Polycomb (Schuettengruber et al., 2007) qui vont former des complexes d'action en lien avec d'autres protéines comme par exemple les acétylases. Les protéines Trithorax vont induire la tri-

méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) ou la méthylation de H3K36 ainsi que l'acétylation de H3K27, des marques communément liées à l'activation des gènes (Schuettengruber et al., 2007). Les protéines du groupe Polycomb vont quant à elle plutôt participer à l'inactivation des gènes (Schuettengruber et al., 2007). Ainsi chez la drosophile, l'action de protéines du groupe Polycomb agit sur la mise en place de triméthylation sur la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) entraînant un resserrement de la chromatine et l'inhibition des gènes associés (Ciabrelli et al., 2017) (Figure 8).

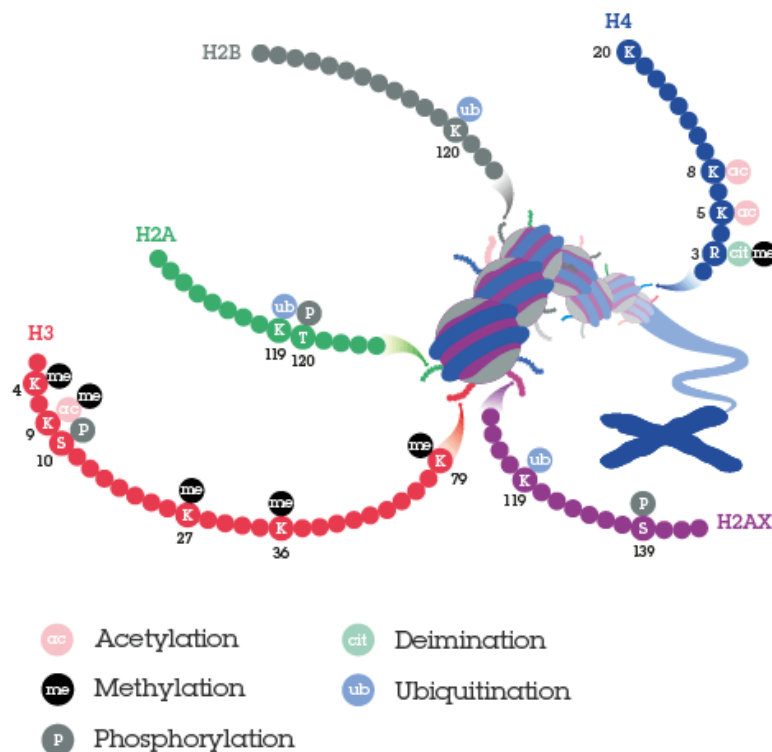


Figure 8 : Exemples de modification biochimiques des histones.
Issu de Abcam (<https://www.abcam.com/epigenetics/histone-modifications>)

Les modifications post-traductionnelles des histones interagissent les unes avec les autres, leurs effets peuvent s'annuler ou s'additionner. On peut donc parler d'un code histone complexe qui régit la structure chromatinienne de façon étroite (Gardner et al., 2011). De façon générale, ce n'est pas une marque mais un ensemble de marques qui va agir sur la conformation de la chromatine dans un contexte génomique particulier.

Certaines des marques d'histones sont bien étudiées tandis que les effets de certaines autres restent non élucidés. Ainsi la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est impliquée dans la régulation de la structure chromatinienne et l'expression génique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Demartino et al., 2002) et chez l'Homme (Heintzman et al., 2007). Les marques H3K9me2, H3K9me3 et H4K20me3 sont associées à une chromatine fermée (hétérochromatine) et à la répression des gènes (Guete & Santoro, 2012). Les marques H3K9ac et H4ac sont quant à elles liées à l'activation des gènes.

L'ensemble des modifications structurelles possibles de la chromatine est nommé états chromatiniens ou couleurs chromatiniennes (Gardner et al., 2011; Delandre & Marshall, 2019) (Figure 9).

Les histones peuvent subir des modifications de leurs terminaisons amines mais elles peuvent également être remplacées par des variants d'histones. Ces variants sont utilisés en remplacement lorsque des *core* histones seraient manquantes dans un nucléosome. Ils peuvent également être recrutés à des endroits génomiques précis. Ces variants d'histones sont retrouvés chez de nombreuses espèces et sont hautement conservés, mettant en évidence la forte nécessité de leur implication dans divers processus tels que la régulation de l'expression génique au cours du développement (H2A.Z) ou la mise en place du kinétochore* pendant la mitose et la méiose (CenH3) (Luger et al., 2013).

	Chromatin states	Roles	Histone marks
Permissive	"Yellow" chromatin	Cellular housekeeping / metabolism genes	H3K36me3 (?)
	TrxG-associated (Trithorax)	Developmentally active genes	H3K4me1,3 H3K27ac
Repressive	HP1-associated heterochromatin	Pericentric heterochromatin / terminal differentiation	H3K9me2,3
	PcG-associated (Polycomb)	Developmentally repressed genes	H3K27me3
	"Black" chromatin	Neuronal development	Unknown

Figure 9 : Exemples de couleurs chromatiniennes.
Tableau résumant les couleurs chromatiniennes et les marques d'histones associées chez la drosophile.
Figure tirée de Delandre & Marshall, 2019

Topologie des noyaux

L'organisation à l'intérieur des noyaux des animaux est faite de façon précise et structurée via l'action d'ARNs non codants et de complexe protéiques de modification des histones et de remodelage de la chromatine. Chaque niveau de l'architecture chromatinienne constitue un facteur régulant les interactions physiques entre éléments régulateurs et promoteurs des gènes. Les pliures de la chromatine divisent celles-ci en plusieurs domaines (Figure 9) appelés Domaines Topologiquement Associés (TADs) dans lesquels les régions chromatiniennes vont largement interagir (Harley & Ritter, 2002; Filion et al., 2011; Sexton et al., 2012; Alexander & Lomvardas, 2014). Ces TADs constituent des sous-unités de réplication et d'expression génique dont les cinétiques sont propres à chaque TADs (Filion et al., 2011). De plus, chaque TADs possède son propre panel de marques épigénétiques qui

varie d'un type cellulaire à un autre. Ces domaines sont séparés par des frontières limitant les interactions entre chromosomes de domaines différents. Néanmoins, un deuxième niveau d'organisation spatiale constitue des super-domaines (Figure 10) qui s'assemblent pour former des territoires chromosomiques (Figure 10) dans lesquels la chromatine est très mobile. Chaque chromosome occupe donc une position particulière dans le noyau. Au sein de ces territoires chromosomiques, les gènes peuvent donc être en interaction (Cremer et al., 1996; Meaburn & Misteli, 2014). Enfin la position des chromosomes au sein du noyau détermine la qualité de l'accès des gènes aux facteurs de transcription (Lanctôt et al., 2007). De la place des chromosomes dans le noyau va donc dépendre l'activité d'un gène donné (Kurz et al., 1996; Cremer et al., 2006; Szczerbal et al., 2009). Par conséquent, selon sa position, un gène peut être sur ou sous-régulé. Les protéines associées aux gènes sont également mobiles dans le noyau et peuvent entraîner des changements de conformation de l'ADN comme des boucles chromatiniennes* qui peuvent au sein d'un même TAD, exclure certains gènes de l'activité du TAD (Cremer & Cremer, 2001; Bantignies & Cavalli, 2011). Une telle mobilité permet une plasticité dans l'expression des gènes, notamment entre les différents types cellulaires.

Des études sur *Arabidopsis*, qui possède un petit génome compact, ont révélé que l'organisation du noyau cellulaire serait différente chez les plantes. En effet, il n'existe pas de TAD chez *Arabidopsis* mais certaines régions présentent des gènes fortement exprimés et des interactions entre régions chromatiniennes sont observées sur des courtes et des longues distances chromosomiques. Ces caractéristiques sont à étudier sur d'autres espèces de plantes possédant un génome de taille supérieure. Enfin l'existence de boucles chromatiniennes a été mise en évidence à la fois chez *Arabidopsis* et chez le maïs.

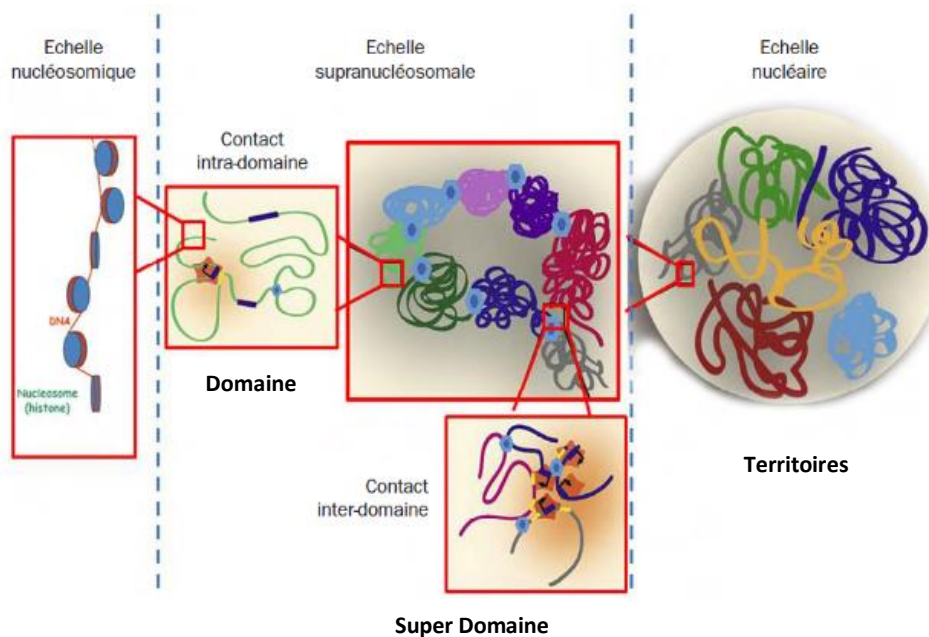


Figure 10 : Vue globale du noyau cellulaire et de son organisation.

Le noyau cellulaire est subdivisé en domaines, supers domaines et territoires chromosomiques.

Tirée de du cahier *Prospectives en Epigénétique, Ecologie et Evolution* du CNRS, novembre 2018.

Par ailleurs, des interactions entre deux allèles d'un même locus peuvent survenir au sein du génome. Un allèle peut alors induire une modification épigénétique héritable sur l'autre allèle, on parle alors de paramutation*. L'allèle paramuté devient ensuite à son tour paramutable et donc capable de transmettre la modification (Ciabrelli et al., 2017).

ARN non codants

Une grande partie du génome est transcrite mais ne donne pas naissance à des protéines (Nowak, 1994). Des ARN non-codants peuvent intervenir dans la régulation de la chromatine. Ces ARN serviraient notamment à guider les protéines ciblant la chromatine à des régions génomiques spécifiques. Les ARNs non-codants existent sous une grande variété de formes et jouent des rôles variés dans la régulation génétique. Les longs ARNs non codants (lncRNAs) sont des séquences qui dépassent les 200 nucléotides. Ces lncRNAs peuvent induire des modifications de la chromatine via le recrutement de complexes de remodelage de chromatine. Ils sont aussi capables de réguler la transcription en agissant comme co-facteurs*, interagissant avec les complexes d'initiation ou recrutant des protéines de liaison qui vont à leur tour inhiber les protéines agissant sur les marques d'histones. Finalement, les lncRNAs peuvent participer à la régulation post-transcriptionnelle en interagissant avec des acides ribonucléiques messagers (ARNm) (Mercer et al., 2009; Mercer & Mattick, 2013). Ce type d'interactions entre séquences d'ARN ont conduit à la découverte des mécanismes de l'interférence par ARN* (RNAi) qui consistent en l'interférence entre un ARN simple ou double brin (dsRNA) et un ARNm (Rocheleau et al., 1997). En effet, l'injection d'un ARN anti-sens, va se lier de façon complémentaire sur un ARNm cible, induisant l'inactivation de l'ARNm dans la cellule (Guo & Kemphues, 1995). Le pathway RNAi implique des petits ARNs (Mello & Conte Jr, 2004) qui sont une classe d'ARNs d'une taille inférieure à 30 nucléotides. Les petits ARNs comprennent les miRNAs, les siRNAs et les ARNs interagissant avec PIWI. Les miRNAs sont des séquences d'ARN d'environ 22 nucléotides de long (Starega-roslan et al., 2011) qui agissent épigénétiquement en sous-régulant des ARNm cibles, en s'y liant complètement ou de façon partielle, entraînant une suppression de la traduction* ou encore la dégradation de l'ARNm concerné (Chuang et al., 2007). Les miRNAs jouent un rôle dans la conformation de la chromatine car il a été démontré qu'ils sont capables de se lier aux histones déacétylase chez la souris (Tuddenham et al., 2006). Ils sont aussi soupçonnés d'être capables de cibler les DNMTs (Rajewsky, 2006) et sont impliqués dans la mise en place de la méthylation de l'ADN chez Arabidopsis (Bao et al., 2004). Les petits ARNs interférant (siRNAs) ont une taille comprise entre 21 et 25 nucléotides. Ils vont essentiellement s'associer à leur ARN complémentaire et induire son clivage (Verdel et al., 2009) ou s'apparier à la séquence d'ADN cible afin d'empêcher sa liaison avec des facteurs de transcription et ainsi induire la mise au silence du gène (Buhler et al., 2006). Une classe particulière de siRNAs, les petits ARNs interférant hétérochromatique (hcsiARNs pour heterochromatic

small interfering RNA) sont présents uniquement chez les plantes. Ils sont impliqués dans la voie RdDM (*RNA-directed DNA méthylation*) et interviennent dans le recrutement d'ADN méthylases qui méthylent de façon spécifique les cytosines de l'ADN (Matzke et al., 2007; Zhang & Zhu, 2011). Ces méthylations sont principalement situées au niveau des éléments transposables ou à des fragments d'ADN exogènes, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité du génome (Matzke et al., 2007; Zhang & Zhu, 2011; Lahmy et al., 2016). L'intervention de la voie RdDM a également été observée dans la régulation de gènes développementaux ou de gènes impliqués dans la réponse au stress environnemental (Matzke et al., 2007).

Les ARNs interagissant avec PIWI (*P-element induced wimpy testis*) sont des séquences allant de 21 à 30 nucléotides. Ces piRNAs se lient à des protéines PIWI qui sont impliquées dans la dégradation de l'ARNm, la régulation des éléments transposables, l'inhibition de la transcription des gènes (Luteijn & Ketting, 2013) et ils jouent un rôle critique dans la pluripotence des cellules souches, la gamétogénèse et le développement (Juliano et al., 2013).

Tous les mécanismes épigénétiques sont en relation étroite les uns avec les autres et constituent l'épigénome*. Ils participent ainsi à la régulation de l'expression des gènes soit via des interactions directes avec l'ADN, soit par le recrutement de protéines agissant dans la transcription ou la traduction et enfin en participant à la régulation de la structure chromatinienne et donc à l'accessibilité des gènes par les facteurs de transcription.

d. Epigénétique et hérabilité transgénérationnelle

L'information épigénétique est reprogrammée au cours du processus de reproduction, limitant la transmission des marques épigénétiques entre générations. Chez les mammifères, l'information épigénétique doit survivre à deux rounds de reprogrammation au cours du processus de reproduction (Cantone & Fisher, 2013). Ainsi, après la fertilisation, les variants d'histones, les modifications d'histones ainsi que les petits ARNs et la méthylation de l'ADN sont remis à zéro.

Ce processus de reprogrammation est essentiel pour la totipotence des cellules zygotiques et l'échec de la reprogrammation de la méthylation de l'ADN conduit dans la majorité des cas en la transmission de mutations épigénétiques (ou épialèles) neutres ou délétères. Ensuite les marques sont graduellement rétablies chez l'embryon pour permettre la différenciation cellulaire (Borgel et al., 2010). Puis un second round de remise à zéro des marques épigénétiques survient dans les cellules germinales (voir figure 11 pour un exemple de reprogrammation épigénétique de la méthylation de l'ADN).

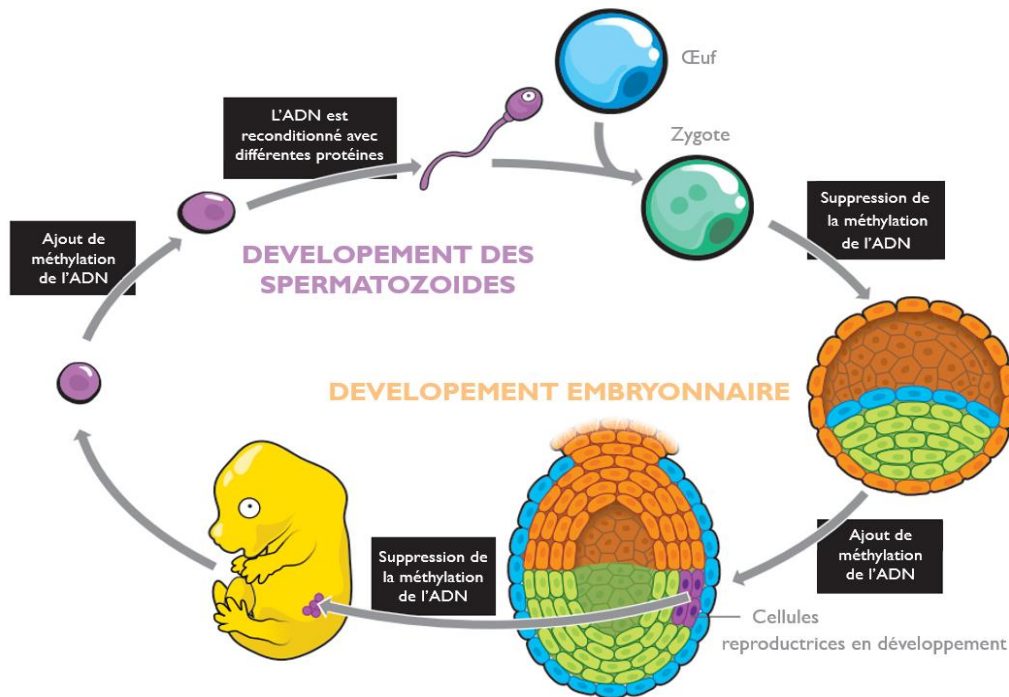


Figure 11 : Un exemple de reprogrammation épigénétique chez les mammifères : la méthylation de l'ADN. Modifiée d'après Hughes, 2014.

Néanmoins certaines marques épigénétiques particulières, grâce à des mécanismes pour l'instant inconnus, échappent à cet effacement (Hughes, 2014). Une partie des marques épigénétiques est alors susceptible d'être transmise aux générations suivantes. C'est le cas notamment de l'empreinte génomique chez les mammifères : la présence de marques épigénétiques qui permettent de distinguer les deux allèles parentaux et induire une expression mono-allélique d'un seul des deux allèles dans le zygote (Bartolomei & Ferguson-Smith, 2011). La méthylation de l'ADN est maintenue au niveau des loci à empreinte grâce à la DNMT1 présente dans l'embryon (Li et al., 1993), et grâce à différentes protéines participant à la maintenance de la méthylation, comme le facteur de transcription ZFP57 dont des mutations chez la souris conduisent à la déméthylation de nombreux loci soumis à empreinte (Li et al., 2008). Chez le poisson zèbre, la reprogrammation épigénétique est différente selon la provenance du méthylome. Le méthylome maternel subit un nivellement tandis que le méthylome paternel est conservé (Jiang et al., 2013; Potok et al., 2013). Les mécanismes à l'origine de ces différences ne sont pas encore élucidés. Chez la souris, certaines classes de retrotransposons vont rester méthylés (Lane et al., 2003). C'est par exemple le cas pour les retrotransposons intracisternal A particle chez la souris Agouti (Morgan et al., 1999). D'autres gènes non soumis à empreinte vont également conserver leur pattern de méthylation (Borgel et al., 2010). L'hypométhylation du récepteur à l'acétophénone* dans les spermatozoïdes de mâles conditionnés à craindre cette odeur va par exemple persister. Ainsi, cette crainte est transmise aux deux générations suivantes (Dias & Ressler, 2014). Une partie des marques de méthylation de l'ADN peut donc être transmise à la descendance et avoir des conséquences à plus ou moins long terme (Daxinger & Whitelaw, 2012; Szyf, 2015).

La transmission de l'information épigénétique chez les plantes est plus commune car la reprogrammation de la méthylation de l'ADN est limitée aux CHH dans les cellules spermatiques. Le reste de la méthylation de l'ADN est majoritairement conservée au cours de la division cellulaire ou pendant la gamétogénèse par les mécanismes de maintenance ou via la méthylation de novo induite par la voie RdDM. La méthylation des zones CHH est rétablie après la fertilisation grâce aux petits ARN issu de la mère (Calarco et al., 2012).

A l'heure actuelle, nous ne savons pas exactement par quels mécanismes, que ce soit chez les plantes ou chez les animaux, certaines marques de méthylation sont hérissables, tandis que d'autres sont effacées. Il est possible que les marques épigénétiques hérissables soient à l'origine d'un signal qui serait transmis de parents à enfants et qui guiderait le rétablissement des marques épigénétiques dans le zygote (Baulcombe & Dean, 2014).

Un des arguments en faveur de cette dernière hypothèse provient d'une étude sur la drosophile. Il a ainsi été observé qu'un locus paramutateur va pouvoir paramuter un autre locus, sans interaction directe, via une production de piARNs. Ces piARNs peuvent se déplacer dans le cytoplasme et être transmis entre cellules et ainsi parvenir au cytoplasme de l'ovocyte, permettant la transmission de la paramutation de la mère à sa descendance sur un grand nombre de générations ($n > 30$) (De Vanssay et al., 2012). La transmission de l'information épigénétique entre générations via transferts d'ARNs a été documentée chez différents organismes. Par exemple, chez les souris mâles, diabétiques, de petits ARNs dérivés d'ARN de transfert (tsRNAs) spécifiques sont présents dans les spermatozoïdes. Une injection de ces tsRNAs dans un embryon entraîne l'apparition d'un désordre métabolique chez l'individu adulte (Chen et al., 2015). Par ailleurs, plus une drosophile est âgée, plus le nombre de piARNs présents dans ses ovocytes va augmenter. Ceci entraînant une augmentation du pool de piARNs déposés dans l'embryon et permettant le transfert de la capacité à réprimer un panel d'éléments transposables au cours de la lignée maternelle (Grentzinger et al., 2012).

Les transferts d'informations épigénétiques peuvent avoir une incidence à plus ou moins long terme. Un transfert de l'information peut avoir lieu des cellules somatiques aux cellules germinales ainsi la génération F1 possédera également les modifications épigénétiques issues de l'exposition de la génération parentale F0. La F1 sera également touchée si la femelle F0 est enceinte pendant l'exposition, induisant des modifications chez l'embryon. Dans ces deux cas, la lignée germinale de la F1 peut ne pas subir de modifications. Dans ce cas seuls les descendants directs (F1) seront concernés et on parle d'**effet intergénérationnel**. En revanche, les phénomènes épigénétiques doivent passer par la lignée germinale pour être directement transmis sur un plus grand nombre de générations. La transmission pourra alors être **multigénérationnelle** : l'embryon (F1) subit la modification et ses cellules germinales sont touchées et il va alors transmettre la modification à sa descendance (F2). Les cellules germinales de la F2 vont quant à elles subir la remise à zéro de l'information et la troisième

génération F3 ne sera pas impactée. Enfin la transmission peut être **transgénérationnelle**, dans ce cas la remise à zéro de la machinerie épigénétique ne corrige pas la modification qui sera transmise au cours de nombreuses générations (Figure 12). La transmission est légèrement différente lorsque l'exposition à lieu chez le père. Dans ce cas, seuls les spermatozoïdes qui vont donner la F1 peuvent être modifiés (effet parental) puis les gamètes de l'adulte F1 subiront la reprogrammation épigénétique ou bien l'information épigénétique échappera à la reprogrammation et on aura alors un effet transgénérationnel (Figure 11).

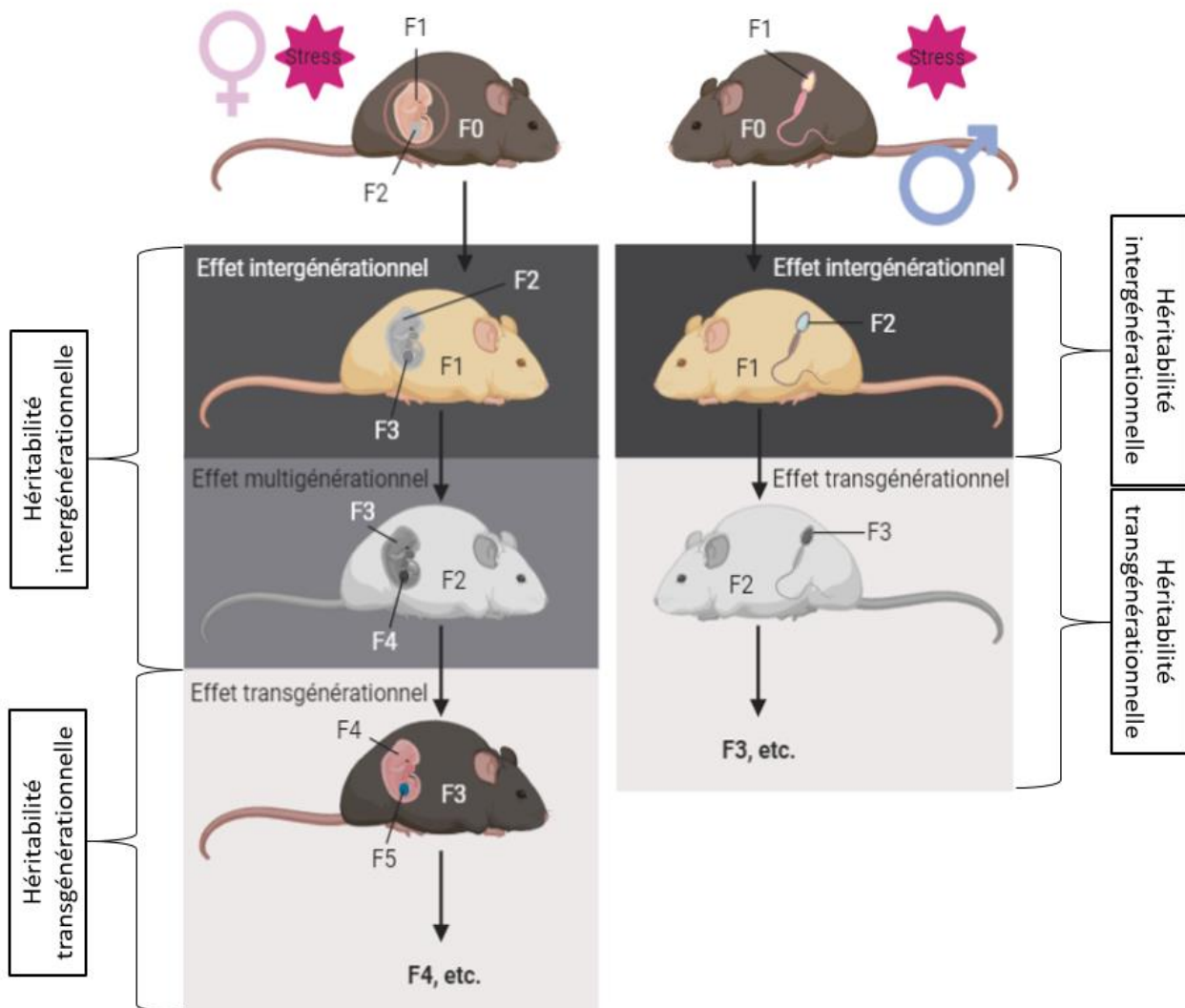


Figure 12 : Les différents types de transmission de l'information épigénétique.

La transmission via la lignée maternelle peut donner lieu à des effets parentaux, multigénérationnels ou transgénérationnels selon si l'embryon et/ou la lignée germinale est touchée. Via la lignée paternelle, seuls des effets parentaux ou transgénérationnels sont possibles.

Schéma réalisé via Biorender.

B. Microbiote

a. Rôle du microbiote

Tous les macro-organismes hébergent une riche communauté de micro-organismes internes ou de surface. Ces micro-organismes peuvent être des bactéries, des virus, des champignons, des protozoaires ou des nématodes. L'ensemble de ces micro-organismes colonisateurs constitue le microbiote de leur hôte. Parmi ces microorganismes certains vont être bénéfiques, neutres ou pathogènes vis-à-vis de leur hôte. Par exemple, une composition altérée du microbiote est responsable du syndrome métabolique* chez l'homme (Lim et al., 2016). Les bactéries constituent plus de 99% du microbiote des mammifères (Laukens et al., 2015a) et sont les éléments du microbiote qui sont les plus étudiés. Outre les bactéries pathogènes, une grande partie de ces bactéries vivent en mutualisme avec leur hôte. Néanmoins, certaines mutualistes peuvent devenir pathogènes opportunistes en cas de déstabilisation de l'immunité de l'hôte. Ainsi des altérations dans la composition du microbiote et le contrôle de son équilibre semblent être responsables de maladies.

Le microbiote est impliqué dans de nombreux processus physiologique, métaboliques et même comportementaux de l'hôte (McFall-Ngai et al., 2013). Ainsi, chez le corail, le microbiote associé permet la photosynthèse, l'approvisionnement en nutriment, la fixation de l'azote et la prévention des maladies (Rosenberg et al., 2007). Le microbiote est en relation étroite avec le système immunitaire de son hôte et joue ainsi également un rôle clef dans l'immunité de l'hôte (Maslowski & Mackay, 2011; Ubeda & Pamer, 2012; Wu & Wu, 2012).

Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous focaliser principalement sur le rôle du microbiote dans l'immunité et le développement du système immunitaire de l'hôte.

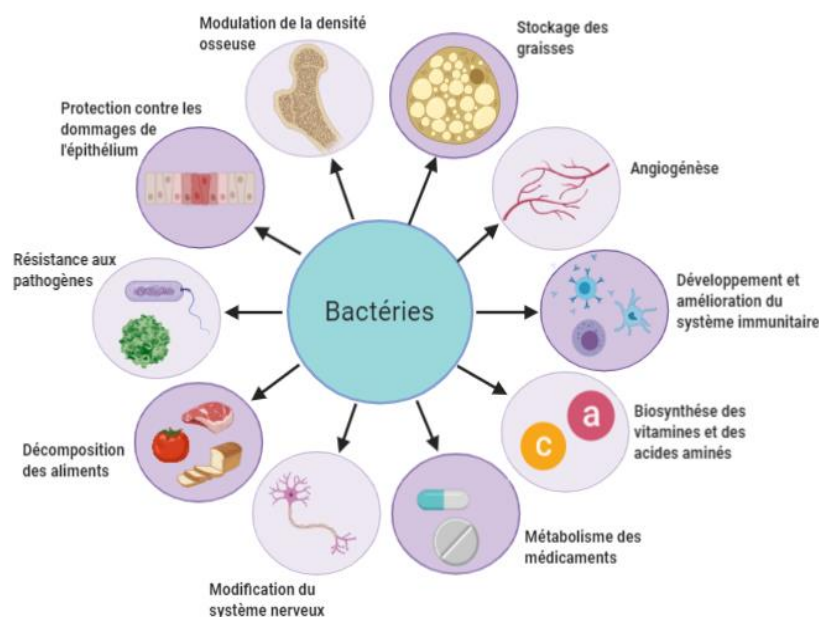


Figure 13 : Les effets du microbiote intestinal sur l'hôte.

Schéma réalisé via bioRENDER : www.BIORENDER.com

(d'après Laukens et al., 2015)

Une large portion de bactéries est retrouvée dans l'intestin des mammifères où elles sont bénéfiques pour l'organisme colonisé (Bäckhed et al., 2005; Laukens et al., 2015a) et ont un impact sur un nombre varié de processus (Figure 13). Parmi ces processus sont présents la résistance aux pathogènes et le développement du système immunitaire (Martin et al., 2010; Hooper et al., 2012; Weng & Walker, 2013). Le microbiote intestinal des souris va notamment agir sur le développement des lymphoïdes et des cellules T* ainsi que dans l'immunité systémique* (par exemple réactions allergiques et maladies auto-immunes) (Hooper et al., 2012). De nombreuses maladies du corail sont dues à la perte de certains de ses microorganismes mutualistes suite à des infections bactériennes (Rosenberg et al., 2007).

b. Impact évolutif du microbiote et théorie de l'holobionte

Un holobionte* est l'association d'un organisme et des symbiotes et pathogènes qu'il contient, formant une nouvelle unité évolutive (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Le génome du microbiote va évoluer de concert avec le génome de l'hôte, on parle alors d'hologénome* (Rosenberg et al., 2007). Le microbiote d'un hôte va donc pouvoir jouer un rôle évolutif et adaptatif en contribuant à la variabilité génétique de son hôte (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). La théorie de l'holobionte repose sur 4 critères définis par Zilber-Rosenberg & Rosenberg en 2008 : (1) tous les animaux et les plantes ont des relations symbiotiques avec des microorganismes ; (2) les organismes symbiotiques peuvent être transmis entre générations ; (3) l'association entre l'organisme hôte et son microbiote affecte la fitness de l'holobionte ; (4) la variabilité génétique de l'holobionte est augmentée par les populations de symbiotes et peut varier plus rapidement sous l'action de l'environnement que le génome de l'hôte lui-même.

Via l'utilisation de probiotiques* sur des femelles rats, souris et cochons, Buddington et al., 2010 ont montré la possibilité d'un transfert du microbiote maternel à la descendance chez les mammifères. De plus, Moeller et al., 2018 have shown that gut microbiota is transmitted vertically in mammals. La transmission du microbiote via ingestion du mucus maternel a également été démontrée chez les insectes comme la punaise (Hosokawa et al., 2012). Par ailleurs, certains gènes bactériens (Domazet-Lošo & Tautz, 2008) ou même provenant d'autres procaryotes (Keeling & Palmer, 2008) peuvent être transmis et s'intégrer ainsi dans le génome de leur hôte.

C. Autres mécanismes non-génétique

Hormis la génétique, l'épigénétique et le microbiote, il existe encore de nombreux mécanismes générateurs de variabilité phénotypique et dont l'intégration à la théorie étendue de l'évolution est en plein débat. Ces mécanismes n'ont pas pu être étudiés dans le cadre de cette thèse, seuls leur définition et quelques exemples sont donnés à titre indicatif.

a. Construction de niche et héritabilité écologique

Tous les organismes modifient leur environnement via leurs métabolismes*, leurs activités et mouvements, leurs comportements ou leurs choix (Odling-Smee, 2007). Se faisant ils peuvent agencer ou détruire leur habitat ce qui revient à transformer en partie les pressions de sélection environnementales qui agissent sur eux ; ce phénomène se nomme **construction de niche** (Odling-Smee et al., 1996, 2013) et lorsqu'un organisme modifie l'environnement de ses descendants, on parle d'**héritabilité écologique*** (Odling-Smee, 2007). Les descendants vont alors hériter des pressions de sélection qui ont été modifiées par l'action de leurs ancêtres (Odling-Smee, 2007).

b. Effets parentaux

Chez un grand nombre de taxa, les parents investissent de leur temps et de leur énergie afin de garantir la survie de leurs descendants, c'est ce que l'on appelle les **effets parentaux**. Cela peut prendre la forme, pendant le développement embryonnaire, d'un placenta ou d'un vitellus nourricier (chez les mammifères et les oiseaux respectivement) ou de la surveillance des œufs (chez des amphibiens, poissons et invertébrés) (Smiseth et al., 2012). Après la naissance, les parents peuvent prodiguer une défense contre les prédateurs et/ou poursuivre le nourrissage (chez de nombreux taxa notamment mammifères, oiseaux et insectes). Tous ces éléments post-naissance font partie des **soins parentaux**, c'est-à-dire, tout ce qu'entreprend un ou des parents pour améliorer la survie et la croissance de son ou leurs descendant(s) (Smiseth et al., 2012; Dugas, 2015).

c. Culture et apprentissage social

La culture en biologie se définit par le transfert d'informations via l'enseignement et l'apprentissage (Bonner, 2018). C'est l'ensemble des comportements partagés par les membres d'un groupe, faisant ainsi office de tradition, et qui reposent sur une transmission sociale de l'information (Laland & Hoppitt, 2003). L'**apprentissage social** est l'apprentissage via l'observation ou l'interaction avec d'autres animaux (souvent de la même espèce), ou leurs productions. Si le terme culture fut autrefois seulement appliqué à l'Homme, sa définition est désormais applicable à d'autres animaux non-humains. Les premiers animaux non-humains venant à l'esprit lorsqu'on parle de culture sont les singes et effet différents travaux ont mis en évidence une transmission culturelle chez les chimpanzés (Whiten et al., 2005) provenant essentiellement d'un « leader » (Horner et al., 2010).

Mais il existe probablement de l'apprentissage social chez de nombreuses autres espèces. Par exemples, les dauphins montrent une utilisation d'éponges au bout du rostre pour sonder le substrat à la recherche de poisson. Cette utilisation est transmise socialement et verticalement de la mère aux enfants femelles (Krützen et al., 2005). Chez les baleines à bosses, de nouvelles stratégies de chasse sont transmises entre individus comme le *lobtail feeding* où la baleine frappe la surface de l'eau avec

sa queue pour créer des bulles et déstabiliser les poissons (Allen et al., 2013). Des exemples d'apprentissage social ont également été apportés via l'étude d'insectes sociaux (Leadbeater & Chittka, 2007). Enfin, la transmission du chant chez les oiseaux est également un exemple d'apprentissage social et le rôle de cette transmission dans l'évolution a été mis en évidence car il joue un rôle crucial pour la reconnaissance intra-espèces et le choix du partenaire sexuel (Grant & Grant, 1996).

3. Le système d'héritabilité

L'ensemble des mécanismes d'héritabilité génétique et non-génétique œuvrent de concert au sein d'un **système d'héritabilité**. L'expression du génotype, modulée par les mécanismes non génétiques tel que l'épigénétique est influencée par l'environnement. C'est cette interaction tripartite qui va contribuer à mettre en place le phénotype.

Des exemples d'interactions directes entre ces différents mécanismes ont d'ores et déjà été mis en évidence. L'épigénétique peut agir sur la mutation génétique : chez les bactéries la méthylation induit une hypermutation de certains gènes (Cherry, 2018). Le même type de phénomène a été observé chez les mammifères où la 5-méthylcytosine mute, à un taux élevé, en thymine* (Bird, 1986; Cooper & Youssoufian, 1988). Epigénétique et génétique sont également liées au niveau des éléments transposables. En effet, les mécanismes épigénétiques participent activement à l'inactivation et à l'immobilisation des éléments transposables via notamment l'ARN interférence (Tabara et al., 1999; Sijen & Plasterk, 2003; Watanabe et al., 2006; Yang & Kazazian, 2006), les modifications d'histones (Gendrel et al., 2002; Martens et al., 2005) ou encore la méthylation de l'ADN (Woodcock et al., 1997; Bourc'his & Bestor, 2004). Par ailleurs, la capacité des TEs à attirer la machinerie épigénétique permet une régulation de l'expression des gènes qui peuvent être inactivés épigénétiquement via l'insertion d'éléments transposables à proximité (Lippman et al., 2004; Slotkin & Martienssen, 2007).

Le génotype de l'hôte (via son panel de gènes immunitaires) va jouer un rôle déterminant sur le microbiote (Goodrich et al., 2014; Lim et al., 2016). Un lien entre comportement, transmission de niche et divergence génétique entre différentes populations d'orque a également été mis en évidence (Foote et al., 2016). Ces quelques exemples montrent l'influence des mécanismes d'héritabilité les uns sur les autres. En plus de ces interactions directes, l'intégration de ces différents mécanismes au sein d'un système d'héritabilité peut permettre l'émergence de nouveaux caractères (Johnson, 2006; Petrusek, 2008; O'Connor, 2015). Par exemple Brunk et Martin, en 2019, ont montré que les interactions entre ADN et histones donnant les nucléosomes, chez les eucaryotes, pourraient être responsables de l'apparition d'organismes multicellulaires (Brunk & Martin, 2019). C'est pourquoi, il est fondamental de considérer les mécanismes intervenant dans l'héritabilité, comme un système dont

les interactions complexes peuvent permettre l'émergence de nouveaux phénotypes, sous l'action de l'environnement (Aderem, 2005).

Par exemple, afin de pouvoir étudier un système et d'essayer de prédire l'apparition et l'évolution de nouveaux phénotypes en fonction des caractéristiques du système, il est nécessaire de décrire les différents éléments intervenant dans ce système. Lorsque l'on veut étudier les effets d'un changement environnemental sur l'évolution adaptative et identifier les mécanismes moléculaires intervenant dans cette évolution, il faut alors (i) observer les changements survenus au niveau phénotypique, (ii) identifier si ces changements peuvent procurer un avantage sélectif dans l'environnement, (iii) étudier séparément les différents éléments du système d'héritabilité afin d'identifier ceux qui sont impliqués (et potentiellement leurs interactions) dans la mise en place du nouveau phénotype et (iv) observer si ces changements phénotypiques et mécanistiques sont transmis au cours des générations. Ces différentes étapes ont été réalisées au cours de cette thèse (voir chapitre 2, article 2).

4. Le double rôle de l'environnement

L'environnement d'un individu regroupe l'ensemble des variables pouvant exercer des pressions biotiques ou abiotiques sur lui. Sont ainsi considérées : l'habitat, l'écosystème dans lequel évolue l'organisme ainsi que les sources de nourriture à sa disposition et son entourage c'est-à-dire ses congénères et les individus d'autres espèces avec qui il est susceptible d'entrer en interaction.

L'environnement va agir à deux échelles dans l'évolution. Il va tout d'abord interagir avec les deux composantes de l'héritabilité (génétique et non-génétique), nous parlerons alors d'environnement inductible. Mais il va également avoir un effet sélectif sur les phénotypes exprimés par les organismes, dans ce cas nous parlerons d'environnement sélectif.

A. Sur le système d'héritabilité

a. La plasticité phénotypique

Un même génotype peut donner différents phénotypes selon les gènes et donc les caractères qui vont être exprimés. La **plasticité phénotypique*** est la gamme de variabilité des phénotypes que peut prendre un génotype donné sous les effets de l'environnement (Fusco & Minelli, 2010; Thomas et al., 2016). Richard Woltereck (1877-1944) en 1909 observa des lignées de daphnies* et constata un changement de la taille du casque en fonction de la nourriture et de la prédation présentes dans le milieu au cours du développement. Il fut ainsi le premier à suggérer que les effets de l'environnement sur le phénotype étaient prévisibles (Thomas et al., 2016). La plasticité peut être irréversible (exemple : mise en place du sexe des reptiles selon la température au cours du développement) comme elle peut être réversible (exemple : chez les plantes, avec le développement de structures pour lutter contre la

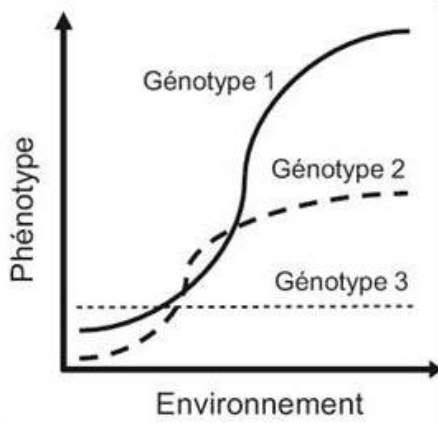


Figure 14 : Un exemple de norme de réaction. Le phénotype varie en fonction de l'interaction entre le génotype et l'environnement. D'après Terral & Ater, 2016.

prédation qui sont ensuite sous-exprimées si la pression de prédation diminue dans l'environnement). La représentation de l'expression d'un génotype selon l'environnement s'effectue sous la forme d'une norme de réaction* (Figure 14).

De plus, certains changements génétiques ne sont pas complètement aléatoires. En effet, les taux de mutations varient entre espèces allant de 10^{-4} par paire de base par génération pour certains virus à 10^{-9} par paire de base par génération cellulaire chez les humains (Rando & Verstrepen, 2007). Certains mécanismes

permettent une augmentation de la fréquence de variation de certains loci entraînant des adaptations plus rapides aux changements de l'environnement.

Enfin, les réponses à une variation environnementale peuvent se faire de façon indirecte via des indices environnementaux. En effet, un organisme n'est pas toujours capable d'identifier les changements dans l'environnement. En revanche, il lui est parfois possible d'estimer ces variations environnementales à travers la détection d'autres paramètres, les traits plastiques vont alors répondre, non pas à la variable sélective, mais à des indicateurs indirects qui y sont corrélés (Chevin & Lande, 2015). Dans l'exemple précédent de la daphnie, celle-ci arrive à détecter la présence de prédateurs via l'identification dans l'eau de molécules (kairomones*) révélant leur présence (Hammill et al., 2008). Un autre exemple de l'utilisation d'indices environnementaux est apporté par de nombreux animaux et plantes pour qui la durée d'ensoleillement va permettre de répondre de façon plastique à des facteurs sélectifs comme la sécheresse ou le froid (Bradshaw & Holzapfel, 2001, 2007; Bradshaw et al., 2003).

b. Epigénétique et environnement

Les modifications épigénétiques peuvent être héréditaires et donc produire des phénotypes conservés sur plusieurs générations. Or l'épigénétique est sous influence de l'environnement dans lequel vivent les individus (Gilbert, 2005). Ainsi, des perturbateurs endocriniens, par exemple, peuvent modifier les facteurs épigénétiques. Certains de ces changements peuvent être transmis des parents aux descendants et peuvent donc agir comme source de variabilité phénotypique et être impliqués dans des phénomènes évolutifs (Gaydos et al., 2014). De plus en plus d'études montrent que l'environnement et l'histoire de vie d'un individu peuvent affecter son propre phénotype mais aussi celui de sa descendance. A la fois les composantes génétiques et épigénétiques et leurs interactions sont importantes afin de générer des phénotypes héréditaires (Skinner et al., 2014). Par exemple, les

facteurs épigénétiques sont impliqués dans les effets parentaux chez les mammifères comme le comportement maternel et la nutrition (Champagne, 2008). Chez les plantes, l'héritabilité des profils de méthylation de l'ADN liés aux traits d'histoire de vie a été montrée chez *Arabidopsis* (Roux et al., 2011) et aussi dans les populations naturelles de *Fallopia japonica* (Richards et al., 2012). L'influence de l'environnement sur les phénotypes de parents exposés et de leur progéniture sont illustrés par plusieurs exemples tels que les mécanismes de défense chez les plantes (Agrawal et al., 1999), la réponse au stress chez les plantes (Chinnusamy & Zhu, 2009), les effets parentaux chez les poissons (McGhee & Bell, 2014) et l'exposition aux xénobiotiques* chez divers modèles (Mirbahai & Chipman, 2014). Cette capacité à transmettre de nouveaux phénotypes à la descendance peut être ou ne pas être adaptative. En effet, les facteurs épigénétiques ont été montrés comme impliqués dans la transmission de maladie, des parents aux enfants comme *Diabetes mellitus* (Ge et al., 2014) ou dans les désordres reproductifs (Nilsson & Skinner, 2015). Il a également été démontré, que l'infection de l'escargot *Biomphalaria glabrata* par le parasite *Schistosoma mansoni* était corrélée à un repositionnement et à une surexpression de certains gènes liés à la réponse au stress et à la réponse aux dommages tissulaires à l'intérieur du noyau (Arican-Goktas et al., 2014).

Les pressions anthropiques et le changement climatique global induisent de profondes modifications sur les environnements terrestres (Root et al., 2003), marins et côtiers (Pearson & Dawson, 2003; Thomas et al., 2004; Hoegh-Guldberg & Bruno, 2010; Doney et al., 2012; Hewitt et al., 2016; Henson et al., 2017). Ces transformations rendent nécessaire une adaptation rapide des organismes (A.D. & Q., 2014). Si certains organismes sont capables de s'adapter, leur capacité adaptative n'est pas illimitée à cause de potentiels compromis (*trade-off*) entre les différents stress (Kelly et al., 2016) ou encore de l'appauvrissement de la diversité génétique (Lloyd et al., 2016), en particulier dans les écosystèmes aquatiques où les stress environnementaux sont souvent multiples (Calosi et al., 2016). Les mécanismes épigénétiques permettent d'induire une plasticité phénotypique rapide, réversible et transmissible au cours des générations (Ross et al., 2016a), ces mécanismes peuvent donc être primordiaux dans les réponses des organismes aux changements environnementaux rapides comme l'augmentation de la température et la modification du pH des océans (Foo & Byrne, 2016). Chez les organismes marins justement, des modifications dans la méthylation de l'ADN ont été observées en réponse à l'acidification des océans chez le corail *Pocillopora damicornis* liées à une réduction des effets acidifiants (Putnam et al., 2016), et en réponse à des variations de température et de salinité chez *Ciona robusta* (Pu & Zhan, 2017). Mais la transmission de ces changements entre générations n'a pas été mise en évidence à l'heure actuelle.

c. Influence de l'environnement sur les autres mécanismes du système d'héritabilité

L'importance de l'influence qu'exerce l'environnement sur les autres mécanismes du système d'héritabilité semble plus évidente. En effet, la transmission de niche est une action directe des parents sur l'habitat de leurs descendants. Les soins parentaux, la culture et l'apprentissage social sont directement issus des organismes entourant l'individu, le plus souvent les parents ou des individus de la même espèce. Enfin, les différences de microbiote entre individus différents sont majoritairement dues à des variations environnementales et comportementales telles que le régime alimentaire, la prise de médicaments et le style de vie (Rothschild et al., 2018). Par exemple, il a été montré que chez le porc, l'environnement dans lequel évoluent les individus durant leurs premiers mois de vie aura une influence sur le microbiote des adultes ainsi que sur leur réponse immunitaire (Mulder et al., 2009). Chez l'homme, des différences de régime alimentaire chez l'enfant entraînent des variations au niveau de la composition du microbiote intestinal, à long-terme (Guaraldi & Salvatori, 2012), ce qui induit des différences d'expression de gènes immunitaires (Schwartz et al., 2012).

B. En tant que filtre sélectif

a. Sélection naturelle et sélection sexuelle

L'environnement va également intervenir sur les phénotypes générés en exerçant une sélection. C'est le phénomène de sélection naturelle qui a été introduit par Darwin et présenté auparavant. La sélection naturelle va favoriser les individus dont le phénotype est avantageux (par exemple : meilleur accès à la nourriture ou meilleur succès sexuel) pour un environnement donné, et en défavorisant les individus aux phénotypes désavantageux (phénotype inadapté à l'environnement, exemple couleurs trop voyantes attirant les prédateurs). C'est à ce niveau que l'on parle d'adaptation et d'adaptation évolutive quand il y a transmission du caractère aux générations suivantes. Mais si certains phénotypes sont très avantageux, ils peuvent également être très coûteux à mettre en place, dans ce cas ils le seront souvent au détriment d'autres traits de caractères. On parle alors de trade-off. Par exemple, chez les plantes des trade-off peuvent exister pour allouer de l'énergie soit à la reproduction soit à la mise en place de mécanismes de défense (Bazzaz et al., 2009).

Les mécanismes non-génétiques peuvent ou non être adaptatifs (English et al., 2015) et ils peuvent permettre une réponse plus rapide aux changements environnementaux que le processus de sélection naturelle (Laforsch & Tollrian, 2004). Par ailleurs, les changements environnementaux peuvent avoir lieu à des échelles de temps très variées. Certains changements se produisent durant la vie d'un individu (exemples : changements de température, pression de prédation, famines) tandis que d'autres changements peuvent couvrir des millions de générations (changements géologiques). Lorsqu'on se place à l'échelle des temps géologiques, les changements phénotypiques proviennent principalement des modifications de la séquence d'ADN (Rando & Verstrepen, 2007). Ces changements

apparaissent à un rythme faible et mettent plusieurs générations avant d'être fixés dans une population. A l'inverse, les changements environnementaux sur de courtes échelles de temps induisent la nécessité d'une adaptation et donc d'une variabilité rapide du phénotype des individus concernés. À cette échelle, certains mécanismes non génétiques, permettant une adaptation rapide, peuvent être favorisés.

C'est pourquoi il est désormais nécessaire d'inclure tous ces éléments dans une nouvelle version de la théorie de l'évolution. De même, les études menées pour la compréhension des adaptations phénotypiques se doivent d'être intégratives afin de ne pas négliger un ou des facteurs responsables de la variabilité.

Cette première partie de l'introduction, avait pour objectif de définir et expliciter les concepts clefs nécessaires à l'étude de l'évolution biologique et de l'évolution biologique adaptative. Ces concepts majeurs sont ceux de la variabilité phénotypique, de la transmission des caractères et du potentiel adaptatif de ces caractères transmis, dans un environnement donné. Toutes les caractéristiques phénotypiques ne sont pas transmises à la descendance, seules celles agissant sur le système d'héritabilité sont susceptibles d'être passées aux générations suivantes et peuvent avoir un impact dans l'évolution adaptative. Actuellement, un des enjeux majeurs en sciences de l'évolution est de comprendre et quantifier le rôle de la variabilité non génétique dans le système d'héritabilité.

Avant le passage à la deuxième partie de l'introduction, pour faciliter la lecture, quelques termes clefs et leur définition ont été regroupés dans le tableau 1. Certains termes possèdent plusieurs définitions selon le contexte dans lequel ils sont utilisés. Ici ne sont représentées que les définitions retenues, adaptées ou élaborées pour le présent manuscrit.

Tableau 1 : Définitions des termes clefs pour la lecture du manuscrit.

Termes clefs	Définition retenue dans le manuscrit
Adaptation	Structure, physiologie ou comportement particulier favorable à la survie et à la reproduction d'un organisme dans un milieu donné. <i>Raven et al, 2012.</i>
Epigénétique	Etude des changements d'expression de gènes, réversibles et héréditaires mitotiquement et ou méiotiquement via les parents ou des ancêtres plus anciens, sans modification dans la séquence d'ADN des gènes. Adapté de <i>Holliday & Pugh, 1975.</i>
Gène	Fragment d'ADN impliqué dans la synthèse des protéines. Adapté de <i>Lewin, 1999.</i>
Génotype	L'ensemble des gènes et de l'information qui y est codée qu'un individu porte et qui peuvent être transmis à sa descendance. <i>Bonduriansky & Day, 2018</i>
Hérédité	Patron de ressemblance parent-enfant, transmission entre génération des caractéristiques au sein d'une espèce ou d'une lignée cellulaire.
Héritabilité	Proportion de la variabilité phénotypique due à des changements dans les facteurs héréditaires.
Phénotype	Ensemble des caractères exprimés par un individu (morphologiques, physiologiques et comportementaux) ; corps transitoire qui porte l'empreinte des environnements et des expériences que le corps a rencontré mais dont les caractéristiques ne peuvent pas être transmises directement à la descendance. Adapté de <i>Bonduriansky & Day, 2018.</i>
Plasticité phénotypique	Gamme de variations des phénotypes que peut prendre un génotype donné sous les effets de l'environnement. <i>Fusco & Minelli, 2010.</i>
Variabilité	Envergure des changements qui peuvent exister entre les membres d'une population.
Variation	Valeur quantitative représentant un degré de changement.

III. Application de la théorie étendue à l'huître creuse *C. gigas*

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles Darwin, 1853

Au cours de cette thèse, le système d'héritabilité a été étudié, et notamment, la place des mécanismes épigénétiques et du microbiote, dans la transmission du phénotype en réponse à des changements environnementaux. Le modèle d'étude pour ces travaux est l'huître creuse *Crassostrea gigas*. La deuxième partie de cette introduction se focalise donc sur *C. gigas* et son système d'héritabilité.

L'implication des mécanismes non-génétiques dans l'évolution adaptative des mollusques ayant été assez peu étudiée et l'importance de l'huître en tant que ressource aquacole majeure et organisme sentinelle des changements environnementaux en font un modèle d'étude particulièrement intéressant. Durant cette thèse, les travaux ont particulièrement porté sur l'étude de l'héritabilité non génétique et sur la place de l'épigénétique dans la variabilité adaptative, afin de mieux comprendre la place de celle-ci dans l'évolution adaptative. Deux expériences différentes ont ainsi été abordées afin d'étudier la réponse transgénérationnelle de l'huître creuse à deux types de stimuli environnementaux : un stimulus abiotique* (via une exposition parentale à un polluant, le Diuron) et un stimulus biotique* (via une exposition à une flore microbienne) (Figure 15).

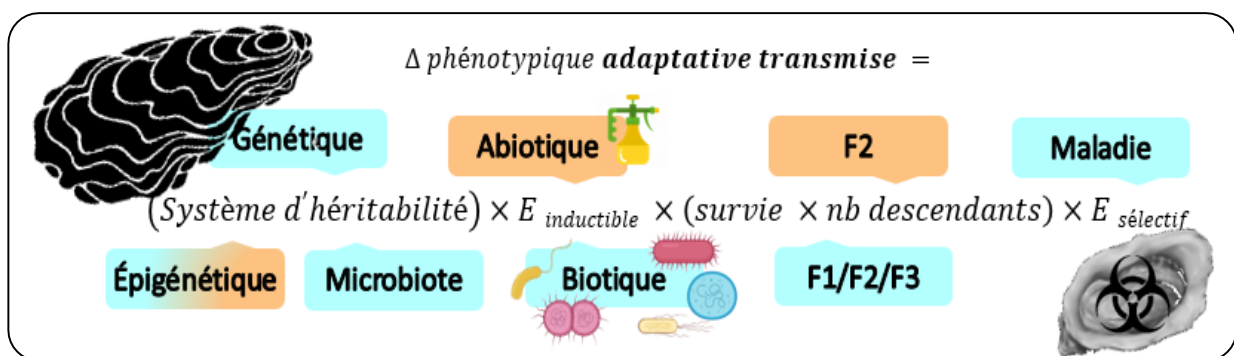


Figure 15 : Application de la théorie de l'évolution étendue à mes travaux de thèse sur *C. gigas*.

Les cadres en orange correspondent aux facteurs étudiés dans le cadre de l'expérience avec le Diuron (chapitre 2, article 1) : la transmission de changements épigénétiques chez les descendants (F2) suite à une exposition parentale à un stress abiotique (le diuron) a ainsi été étudiée. Les cadres en bleu correspondent à l'expérience avec la flore microbienne (chapitre 2, article 2 : l'effet d'une exposition de la F1 à cette flore pendant le développement larvaire a été étudié en lien avec la résistance des huîtres adultes à une maladie infectieuse sur la F1 (implication directe) mais également la F2 et la F3 qui n'ont pas été exposées pendant le développement (effet transgénérationnel).

Dans les deux cas, l'information épigénétique a été étudiée via la méthylation de l'ADN.

1. Présentation du modèle

A. Biologie

a. Anatomie

L'huitre creuse *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1783) est également appelée huître japonaise ou huitre du Pacifique. C'est un mollusque bivalve de la famille des Ostreidae. Les huitres sont des organismes marins sessiles vivant en majorité sous l'eau mais pouvant survivre lors de période de basses eaux. Les huitres creuses sont constituées d'un corps mou, contenu dans une coquille bivalve asymétrique constituée d'une valve plate et d'une valve creuse (Figure 16).

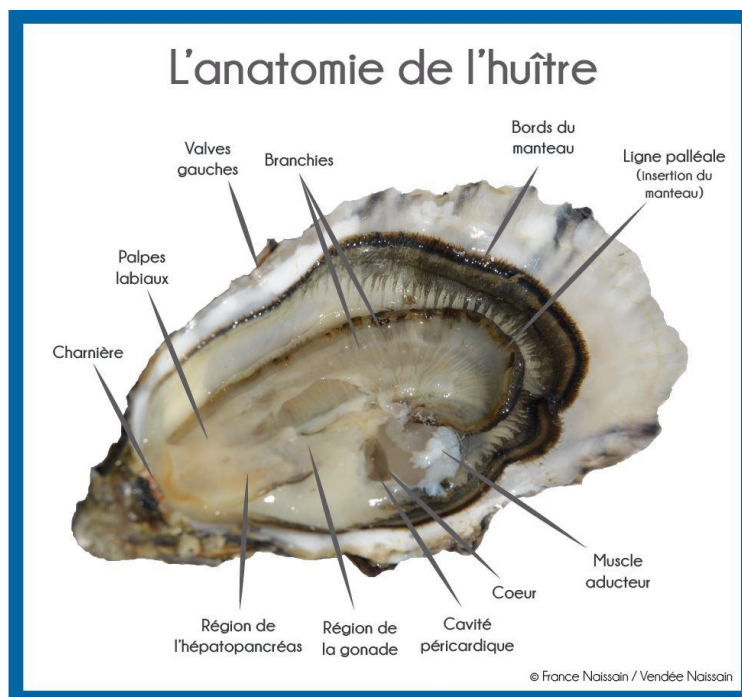


Figure 16 : Schéma de l'anatomie de l'huître creuse
(<https://www.francenaisain.com>)

La coquille permet de protéger les organes internes des prédateurs. Ses deux valves sont reliées au niveau de la charnière et un muscle adducteur permet leur ouverture ou leur fermeture en cas de période émergée. Les valves de l'huître sont constituées de carbonate de calcium et leur minéralisation est due à l'épithélium externe du manteau. Le manteau est un tissu complexe composé de deux épithélia délimitant un tissu conjonctif. Le manteau est également constitué de muscles, de nerfs et de vaisseaux sanguins. Outre son rôle dans la sécrétion de la coquille, le manteau est également un organe sensoriel. Sur le manteau reposent les viscères de l'huître qui possède un cœur, un hépto-pancréas et deux reins. Les huitres sont des organismes filtreurs : respiration et nourriture sont assurées par les flux d'eau. Les branchies lamellaires vont filtrer les particules en suspension dans l'eau qui vont être acheminées vers la bouche par des palpes branchiaux ciliés. Les particules vont

ensuite passer dans l'estomac, l'intestin puis seront excrétées sous la forme de fèces au niveau de l'anus. Les branchies sont également essentielles pour l'assimilation de l'oxygène qui est directement dissous dans l'hémolymphe*. Le système circulatoire des huitres est semi-ouvert, la circulation sanguine est assurée par un cœur comprenant un ventricule et une oreillette et l'hémolymphe circule dans les artères, veines et sinus mais également dans l'ensemble des tissus de l'huitre.

b. Reproduction et cycle de vie

Les huitres creuses sont hermaphrodites successives à tendance protandre*. Elles sont mâles la première année puis peuvent changer de sexe chaque saison ou après émission des gamètes. Néanmoins, la fréquence de changement de sexe des huitres n'est pas claire et certaines huitres peuvent rester mâles ou femelles à vie. Les huitres sont ovipares et poïkilothermes (pas de régulation de la température interne). La maturation des gamètes, thermo-dépendante, a donc lieu en été lorsque la température est favorable (température comprise entre 18°C et 22°C) (Fabioux et al., 2005; Enríquez-Díaz et al., 2009). Les œufs non fécondés sont expulsés et la fécondation externe a lieu dans la colonne d'eau. Une seule huitre est capable de produire un très grand nombre de gamètes allant de 20 à 100 millions. La première phase de vie des huitres est complètement planctonique : 24 heures post-fécondation, une larve D se forme, puis entre les 2^{ème} et 20^{ème} jour de développement c'est la transformation en larve véligère* nageuse. Enfin vers le 21^{ème} jour, il y a apparition de la larve pédivéligère possédant un pied pour se fixer sur un substrat. Une fois fixées les larves atteignent le stade naissain* et entament une phase benthique* qui durera toute leur vie. Les huitres seront considérées comme adultes après leur première reproduction (Figure 17).

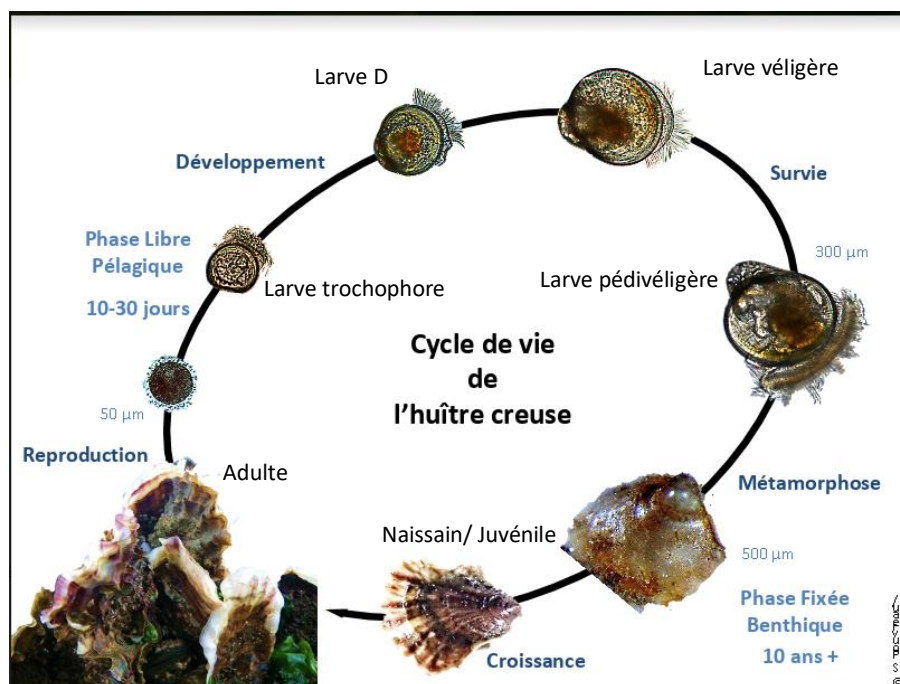


Figure 17 : Schéma représentant le cycle de vie de l'huitre creuse.
Réalisé par Stéphane Pouvreau, biologiste marin à l'Ifremer, Argenton, Brest.

c. Ecologie

C. gigas est originaire du Japon mais elle a été introduite dans de nombreux pays du monde (Thomson, 1959; Grizel & Héral, 1991) pour l'aquaculture (Royaume-Unis, France, Belgique, Irlande ; Australie, Etats-Unis, Afrique du Sud). Sa capacité de tolérance à un large rang de températures et de salinités lui a permis de persister dans ces nombreux pays à tel point qu'elle est considérée comme espèce invasive dans certains pays comme la Suède (Anglès D'Auriac et al., 2017). D'un point de vue habitat, on peut également la retrouver que ce soit en zones côtières intertidales, dans les estuaires ou même au large en eaux plus profondes.

B. Le système d'héritabilité de *C. gigas*

a. Le génome de l'huitre creuse

C. gigas est une espèce diploïde* dont le caryotype* comprend 10 paires de chromosomes ($2n=20$) (Bouilly et al., 2008)). Le génome de *C. gigas* a été entièrement séquencé en 2012 (GenBank : AFTI00000000) (Zhang et al., 2012), il fait une taille de 1,002 mégabases dont le nombre de gènes prédit via annotation est de 28 027 dont 96,1% présentent une activité transcriptionnelle (Zhang et al., 2012). Le génome est hautement polymorphe avec un polymorphisme estimé supérieur de 2,3% au taux moyen de polymorphisme des génomes d'autres espèces séquencées. Polymorphisme de séquence et d'expression (Rosa et al., 2012) procurent une grande diversité génétique pouvant permettre expliquer la capacité d'adaptation de l'huitre creuse à des environnements marins fluctuants et sélectifs (Guo et al., 2015). De plus, le génome de *C. gigas* est également très riche en séquences répétées qui représentent 36,1 % du génome total (Zhang et al., 2012). Enfin, un vaste répertoire de gènes impliqués dans la réponse au stress et l'immunité a été mis en évidence chez *C. gigas* (Zhang et al., 2012; L. Zhang et al., 2015) révélant l'existence d'un système immunitaire complexe chez cette espèce (Guo et al., 2015)

b. Épigenétique de l'huitre creuse

Parmi les mollusques, l'huitre est l'un des organismes chez qui les mécanismes épigénétiques ont été le plus étudiés. Des gènes codant pour les DNMT1, DNMT2 et DNMT3 (Wang et al., 2014) ont été identifiés et l'existence de cytosines méthylées chez *C. gigas* a été mise en évidence par Gavery & Roberts en 2010. La méthylation de l'ADN correspond au pattern retrouvé chez les invertébrés (Sarda et al., 2012) avec une méthylation de type mosaïque présentant le long du génome, des zones d'ADN très méthylé séparés par des larges blocs d'ADN non méthylé. Les cytosines méthylées sont en majeure partie localisées dans les îlots CpG et essentiellement à l'intérieur des gènes (exons et introns). Les éléments répétés ainsi que les régions intergéniques sont méthylées à un niveau moindre. Le niveau de méthylation chez l'huitre creuse est corrélé à la taille des gènes ainsi qu'à leur taux d'expression

(Olson & Roberts, 2014; Wang et al., 2014). Les gènes liés aux fonctions de ménage* sont hyperméthylés tandis que les gènes liés à des fonctions inductibles sont hypométhylés (Gavery & Roberts, 2010). Différents types d'exons ont été associés à différents taux de méthylation des cytosines (Song et al., 2017). Pour certains gènes impliqués dans des mécanismes conservés comme les voies de développement (Rajasethupathy et al., 2012; Saint-Carlier & Riviere, 2015; Wei et al., 2018), une corrélation entre le différentiel d'expression et une différence dans le taux de méthylation du promoteur a été identifiée (Tran et al., 2016). Une corrélation positive entre la méthylation d'un promoteur et l'expression du gène concerné a notamment été rapportée (Li et al., 2015) ce qui est contraire aux observations effectuées chez les vertébrés. La méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans le développement de *C. gigas*. Ainsi des gènes codant pour la machinerie de méthylation de l'ADN sont surexprimés dans les tissus des gonades par rapport aux tissus somatiques (Riviere et al., 2013). De plus, une augmentation globale de la méthylation des exons par rapport aux autres constituants génomiques survient pendant le développement larvaire (Riviere et al., 2017). De même une expression spécifique, selon les tissus et les stades de développement, des gènes codants pour des protéines de la machinerie de la méthylation de l'ADN a été observée (Wang et al., 2014).

Enfin, en réponse à une exposition au cuivre, le niveau global d'hydroxy-méthyl-cytosine diminue chez *C. gigas* (Sussarellu et al., 2018).

L'existence d'histones a également été mise en évidence chez *C. gigas* via l'identification de l'histone H3 (Bouilly et al., 2010). Le rôle de l'histone déméthylase Jmj a également été identifié durant la gamétogénèse et l'embryogénèse (Fellous et al., 2014) et l'expression de cette déméthylase est affectée par les changements de températures au cours du développement précoce (Fellous et al., 2015) de l'huître. Ces travaux montrent l'importance de la méthylation des histones dans les trajectoires développementales de *C. gigas*.

L'intervention d'ARN non-codants chez l'huître a été peu étudiée. Néanmoins, 11 668 longs ARN non-codants intergéniques ont été identifiés et 1 175 parmi eux sont exprimés différemment selon le tissu étudié dont 32,5% exprimés préférentiellement dans les gonades mâles. De plus, l'expression de ces ARN non-codants varie au cours du temps avec une surexpression de certains d'entre eux pendant les stades juvéniles ou la métamorphose, suggérant un rôle de ces ARN dans la reproduction et le développement (Yu et al., 2016). Des miRNAs surexprimés lors d'un challenge immunitaire ont également été identifiés et pourraient être impliqués dans la réponse immunitaire (Zhou et al., 2014). L'expression de certains miRNAs varie aussi en réponse à un stress osmotique révélant le rôle important de ces miRNAs dans la réponse aux stress et la tolérance à la salinité (Zhao et al., 2016).

c. Microbiote de *C. gigas*

L'huitre creuse vit en interaction proche avec la microflore environnementale et elle possède un microbiote riche. Le microbiote des huîtres est variable et va notamment changer au cours du développement larvaire ainsi que selon le site où les huîtres sont élevées (Trabal et al., 2012) mais il reste principalement composé de bactéries des phylums *Proteobacteries*, *Bacteroidetes* et *Firmicutes* (Trabal Fernández et al., 2014). Les micro-organismes *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio* et *Pseudomonas* (Protéobactéries), *Flavobacterium* et *Cytophaga* (Bacteroidetes), *Bacillus* (Firmicutes) et des cocci à gram positif composent plus de 90% de la flore microbienne de *C. gigas* (Vasconcelos & Lee, 1972; Lokmer & Wegner, 2015). Parmi les *Vibrionaceae* associés à *C. gigas*, une grande diversité d'espèces a été détectée (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Romalde et al., 2014). Une grande partie de ces bactéries sont pathogènes ou identifiées comme pathogènes potentiels pour l'huître. Ont ainsi été retrouvés dans des tissus de *C. gigas* : *Vibrio aesturianus* (Garnier et al., 2008) et *Vibrio splendidus* (Gay, Renault, et al., 2004) qui ont été associés au syndrome des mortalités estivales (cf. 2. b. Maladies des huîtres), *Vibrio crassostrea* (Gay, Berthe, et al., 2004), *Vibrio fortis* (Thompson et al., 2003), *Vibrio gigantis* (Le Roux et al., 2005), *Vibrio crosaei* (Gonzalez-Castillo et al., 2014), *Vibrio tubiashii* (Beaz-Hidalgo et al., 2010) et *Photobacterium swingsii* (Gomez-Gil et al., 2011).

2. Pressions environnementales exercées sur les huîtres

a. Pollution aquatique chimique : exemple du Diuron

Les littoraux attirent une grande concentration de populations humaines. Or les activités humaines génèrent de nombreuses pollutions notamment chimique. Les activités agricoles sont très consommatrices de pesticides et herbicides : des produits chimiques utilisés afin de lutter contre les ravageurs des cultures et les mauvaises herbes. Ces produits vont se retrouver dans les sols et parfois atteindre les nappes phréatiques ou être emportés vers la mer lors d'évènements pluvieux. Les estuaires constituent des exutoires qui reçoivent les apports en eau de tout le bassin versant vont ainsi être des zones particulièrement à risque où les polluants chimiques vont se retrouver en grande quantité. Une partie du chapitre 2 de cette thèse porte sur l'impact d'une exposition parentale au diuron sur le méthylome de la descendance. Le diuron (NO-[3,4-dichlorophényl]-N, N-diméthyl-urée) est un herbicide à large spectre classé comme polluant organique persistant. Malgré son bannissement en 2008 en France, des résidus sont encore présents dans les sols et il reste ainsi une source importante de pollution. L'huître creuse en tant qu'organisme filtreur est très sensible aux pollutions de l'eau et les herbicides comme le diuron ont été montrés comme ayant des effets toxiques (Oturán et al., 2008; Huovinen et al., 2015).

b. Maladies des huîtres

Malgré leur tolérance aux variations de températures et de salinité de l'eau, l'incapacité des huîtres à se mouvoir, et leur condition d'organismes filtreurs, les rendent très sensibles aux pressions environnementales abiotiques et biotiques (pathogènes, pesticides, toxines...). Ainsi, les huîtres ont toujours été soumises à des épizooties et mortalités récurrentes (Figure 18). Ainsi, par exemple, l'huître plate *Ostrea edulis*, naturellement présente sur les côtes françaises a subi différentes maladies telle que la bonamiose due à un parasite protozoaire *Bonamia ostreae* (Besnard-Cochennec, 2001). Plus marquant encore, l'huître portugaise *Crassostrea angulata* qui fut importée en 1860, en France, pour pallier à la pénurie due à la surexploitation de l'huître native *Ostrea edulis*, fut décimée par un iridovirus (Comps & Duthoit, 1976). Ces mortalités massives ont mis en évidence le potentiel d'extinction des maladies virales.

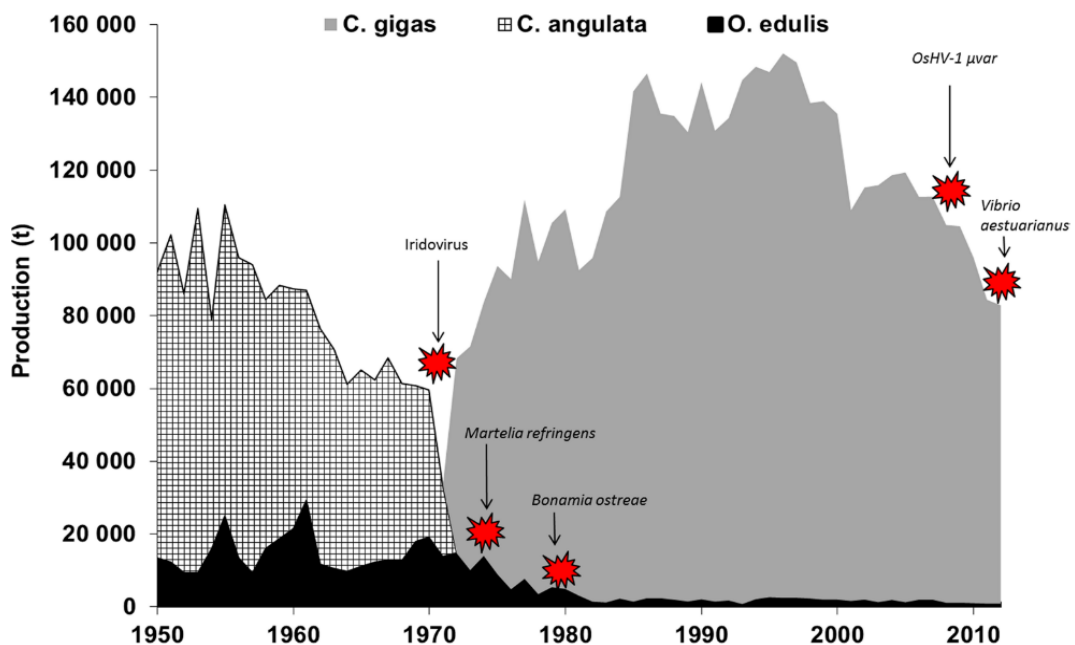


Figure 18 : Les différentes maladies subies par les huîtres produites en France, depuis 1950 (Azéma et al, 2015).

L'huître creuse *C. gigas* après son introduction a également fait face à des maladies récurrentes. Elle fait face à des taux de mortalité de juvéniles alarmants depuis 2008 (Figure 19). Ces taux peuvent atteindre jusqu'à 80% des naissains. Ces mortalités entraînent donc des pertes financières énormes (estimées à 8 millions d'euros par an) et une baisse de la production d'huître en France (12 300 tonnes en 1997 et 97 000 tonnes en 2012). Ces mortalités sont dues au syndrome nommé « *Pacific Oyster Mortality Syndrome* » (POMS) qui est lié à l'identification d'un variant de l'herpès virus 1 de l'huître (Oshv-1) (Pernet et al., 2016) ; le variant OsHV-1 μ var (Segarra, Mauduit, et al., 2014). Ce syndrome est complexe car en plus de la présence du virus, il met en jeu différents paramètres tant biologiques que physico-chimiques : la présence de bactéries du genre vibrio, la

température (Petton et al., 2013) et la pression anthropique ainsi que les caractéristiques propres aux naissains (génétique, microbiote, immunité) jouent un rôle dans la mise en place de la maladie (Barbosa Solomieu et al., 2015).

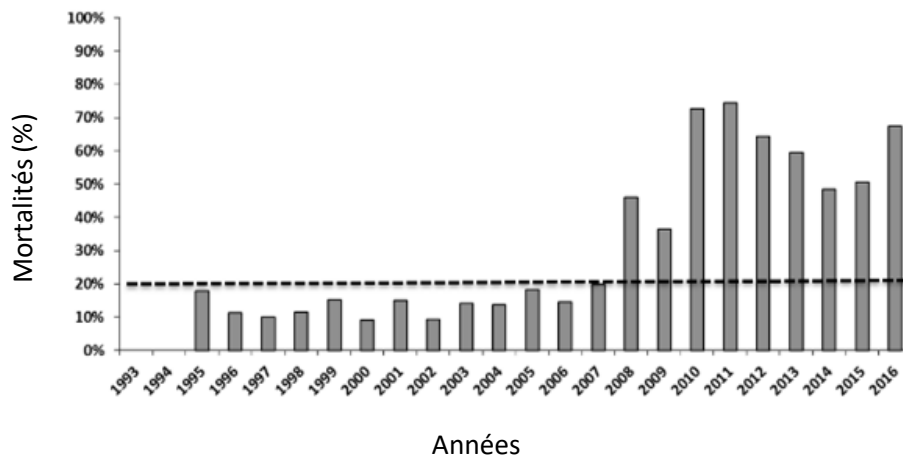


Figure 19 : L'évolution des taux de mortalité des huitres *C. gigas* juvéniles (6 - 18 mois). Ces mortalités ont énormément augmenté à partir de 2008. Réseau d'Observations Conchylicoles (ECOSCOPA Ifremer)

Récemment, le travail de De Lorgeril et al., 2018 a fait la lumière sur la succession des événements aboutissant aux mortalités. Ainsi, la première étape du syndrome consiste en l'infection des hémocytes* de *C. gigas* par le virus OsHV-1 μ Var ce qui entraîne une immunodéficience de l'huitre, laissant la porte ouverte à la colonisation de bactéries opportunistes ce qui finit par entraîner la mort de l'hôte par septicémie.

Malgré cette avancée, il n'existe à leur actuelle pas de solution prophylactique ni de possibilité de traitement des huitres pour pallier à ces mortalités. Néanmoins des solutions peuvent être proposées, basées sur le priming immunitaire (Lafont et al., 2017). C'est ainsi de la nécessité de trouver un moyen d'améliorer la réponse immunitaire et la survie des huitres au POMS et grâce aux récents travaux sur le priming immunitaire qu'est né le projet Transgigas qui est au cœur de cette thèse (chapitre 2, article 2).

3. Le système immunitaire de l'huitre creuse *C. gigas*

Nous avons vu que les huitres vivent principalement en zones marines côtières et qu'en tant qu'organismes filtreurs, elles sont en contact constant avec la flore bactérienne environnementale avec laquelle elles échangent des microorganismes. L'huitre creuse possède également un microbiote composé de microbes mutualistes, opportunistes et pathogènes. Les huitres ont donc dû développer des mécanismes de défense cellulaire et moléculaire pour empêcher la prolifération des pathogènes. En tant qu'organisme invertébré, *C. gigas* possède un système immunitaire inné.

A. Un système immunitaire inné « classique »

Une première série de barrières physico-chimiques permet une défense sommaire de l'huitre aux agressions extérieures. Ces barrières sont constituées de la coquille et du mucus limitant les intrusions extérieures au sein du mollusque. Une fois que l'agent pathogène a pénétré cette première ligne de défense, le système immunitaire de l'huitre repose sur une réponse cellulaire et la mise en place de cascades de réactions humorales* qui vont permettre de limiter le développement des pathogènes et de les détruire (Schmitt et al., 2011; Wang et al., 2018). Une vue d'ensemble des mécanismes moléculaires de la réponse immunitaire de l'huitre est représentée à la fin de cette partie sur la Figure 20.

a. La reconnaissance du non-soi

Pour induire une réponse efficace, le système immunitaire va devoir être capable de différencier les molécules de l'organisme hôte (le soi) des molécules provenant d'organismes extérieurs (le non-soi). Pour cela, les huitres possèdent des molécules permettant la reconnaissance des agents extérieurs. Elles ont un large répertoire de protéines solubles : les PRPs (pattern recognition proteins) qui sont des protéines ayant la capacité de reconnaître les pathogènes envahissants via une identification des motifs moléculaires associés à ces derniers : les PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) (Guo et al., 2015). Ces PAMPs existent sous différentes formes selon les types de pathogènes : il peut s'agir de peptidoglycanes* bactériens, de lipopolysaccharides* spécifiques des bactéries Gram négatif, d'acides lipotechoïques* retrouvés sur les bactérie gram positif ou pour les virus des glycoprotéines* ou des acides nucléiques ADN ou ARN, notamment pour les virus (Mogensen, 2009; Green et al., 2015). Les PRPs peuvent se lier à des récepteurs cellulaires, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Huvet et al., 2004; Duperthuy et al., 2011; L. Zhang et al., 2015) entraînant l'activation des mécanismes de défense cellulaire et parfois même l'élimination des pathogènes (Royet et al., 2011).

b. Les voies de signalisations cellulaires

Les voies de signalisation permettent d'activer la réponse immunitaire suite à la détection de pathogènes par le système de reconnaissance du non-soi. Différents gènes impliqués dans des voies de signalisations ont été découverts dans le génome de l'huitre creuse par comparaison de séquence avec celles de vertébrés (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2004, 2008; Zhang et al., 2012; Green et al., 2015). Une voie de signalisation de type interféron* a ainsi été identifiée (Green et al., 2015). Ce type de système de défense antivirale est présent chez les vertébrés. Il consiste en la reconnaissance des virus, via l'identification des ARN doubles brins et des glycoprotéines virales, ce qui va induire une sécrétion de protéines nommées interférons par les cellules des vertébrés (Randall & Goodbourn,

2008). Ces protéines circulantes vont alerter les autres cellules vertébrées de l'infection virale en cours et activer la voie JAK/STAT* (*Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription*) donnant lieu à la transcription de nombreux gènes stimulés par l'interféron (*Interferon stimulated genes, ISGs*) (Darnell et al., 1994). Ainsi, l'entrée du virus dans d'autres cellules va être limitée et une série de mécanismes antiviraux va être initiée, allant de la production de molécules antimicrobiennes à l'activation de mécanismes de mort cellulaire (Randall & Goodbourn, 2008). Chez *C. gigas*, des facteurs de régulation de l'interféron sont présents ainsi qu'un récepteur de cytokine* potentiellement capable d'activer la voie JAK/STAT et la transcription d'ISGS dont un grand nombre de gènes similaires ont été découverts dans le génome de l'huître. Enfin des facteurs de régulation de l'interféron (*Interferon Regulatory Factors (IRFs)*) et des gènes stimulateurs de l'interféron (*Stimulator of interferon genes (STING)*) ont été identifiés dans le génome de *C. gigas*. De même de nombreux récepteurs de type Toll ont été détectés (TLR pour *Toll-Like Receptors*) indiquant la présence de cette voie chez *C. gigas* (Zhang et al., 2011a, 2013; Wang et al., 2016).

En conclusion, différentes voies de signalisations liées à la défense antibactérienne et antivirale ont été découvertes chez l'huître creuse. Ainsi, les grandes voies de signalisation connues chez les vertébrés et les invertébrés sont conservées : voies de IFN, voie Toll-Nf-kB, voie JAK-STAT, voie du RNAi, et mécanismes cellulaires tels que l'apoptose et l'autophagie. Certaines voies de signalisation ont été impliquées dans la réponse antibactérienne et/ou antivirale sur la base du suivi de l'expression de gènes clés de ces voies et par l'étude fonctionnelle de certains de ces composants, montrant la conservation de leur fonction chez l'huître. Le génome de *C. gigas* comprend en particulier différents éléments de la voie NF-kB* (voie impliquée notamment dans l'activation de nombreux gènes de l'immunité chez de nombreux organismes) dont des inhibiteurs, un homologue de facteur de transcription (Zhang et al., 2012) et différentes protéines associées à cette voie (Escoubas et al., 1999; Montagnani et al., 2004, 2008). Mais, à l'heure actuelle on ne sait pas quels sont les gènes cibles de ces voies chez l'huître.

c. Les hémocytes, acteurs majeurs de l'immunité de *C. gigas*

Les hémocytes de l'huître jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Ce sont des cellules sanguines circulantes immunocompétentes contenus dans l'hémolymphe mais aussi capables d'infiltrer les cavités, tissus et l'épithélium* des huîtres car le système circulatoire de l'huître est semi-ouvert permettant à l'hémolymphe d'atteindre tous les tissus (Bachere et al., 2004; Bachère et al., 2015). Ce sont les principaux médiateurs du système de défense. Ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes métaboliques : transport et digestion de nutriments, respiration, excrétion (Feng, 1988), réparation des lésions et de la coquille et mécanismes de défenses contre les pathogènes (Canesi et al., 2002). En cas d'infection ou de lésion, les hémocytes vont se masser sur le site concerné vers lequel

ils vont acheminer les éléments essentiels à la réparation ou à la lutte contre l'infection (molécules de défenses ou calcium pour la réparation de la coquille).

Les hémocytes sont capables de reconnaître les agents étrangers à l'organisme et une fois celui-ci identifié ils peuvent induire différents types de réponse à médiation cellulaire : ils peuvent s'agglutiner autour afin de bloquer l'agent pathogène (Feng 1988), phagocyter les particules de petites tailles, induire une encapsulation ou une apoptose. Les hémocytes sont également à la base de la sécrétion de composés microbicides comme les espèces réactives de l'oxygène*, les peptides antimicrobiens* ou les enzymes hydrolytiques.

d. La réponse à médiation cellulaire

La phagocytose joue un rôle important dans l'immunité de *C. gigas*, elle permet la destruction des corps étrangers de petite taille comme les bactéries (Duperthuy et al., 2011). La particule étrangère est d'abord reconnue par les hémocytes puis elle est ingérée au moyen d'une déformation de la membrane plasmique des hémocytes, donnant un phagosome. Les lysosomes de l'hémocyte vont ensuite déverser leurs enzymes entraînant une série de processus tels que l'acidification du milieu intra-vacuolaire, l'accumulation de métaux toxiques, la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ainsi que l'apport de peptides antimicrobiens. L'ensemble de ces processus va entraîner la lyse de la particule ingérée.

L'apoptose ou mort cellulaire programmée consiste en une autodestruction des cellules. Ce mécanisme de mort cellulaire programmée joue un rôle dans la défense immunitaire en induisant la destruction des cellules infectées, limitant la prolifération des pathogènes. L'apoptose peut être déclenchée par un signal provenant de l'extérieur de la cellule (voie extrinsèque) ou par un signal provenant de l'intérieur de la cellule (voie intrinsèque). Ces voies sont régulées par des protéines pro ou anti apoptotiques. Un nombre important de molécules pro et anti apoptotiques a été identifié chez *C. gigas* ainsi que des protéines inhibitrices d'apoptose (Zhang et al., 2011b; Qu et al., 2015) notamment lors d'infection à OsHV-1 suggérant l'implication de l'apoptose dans la défense antivirale de l'huitre (Jouaux et al., 2013; Green et al., 2014; 2015; Segarra, et al., 2014).

L'autophagie est un autre mécanisme de mort cellulaire entraînant la lyse des pathogènes intracellulaires via la libération des enzymes de lysosomes. Ce mécanisme semble impliqué dans la réponse antivirale de l'huitre. En effet, des gènes impliqués dans l'autophagie ont été identifiés chez *C. gigas* et une inhibition de l'autophagie est corrélée à une diminution de la survie des huitres infectées par à la fois OsHV-1 et des bactéries du genre *Vibrio aesturianus* (Moreau et al. 2015b).

e. La réponse humorale et les composés microbicides

Les protéines et peptides antimicrobiens (AMP) ont une action microbicide ou bactériostatique. Ils peuvent être recrutés lors de la phagocytose mais également directement entraîner la lyse bactérienne en créant des pores à la surface de la membrane plasmique (Brogden, 2005) ou encore stopper la prolifération bactérienne en bloquant la synthèse de protéine ou de composants de la paroi bactérienne (Bulet et al., 2004). Différentes classes de peptides antimicrobiens ont été identifiées chez *C. gigas* (défensines*, big-défensines, peptides riches en proline et les protéines bactéricides augmentant la perméabilité).

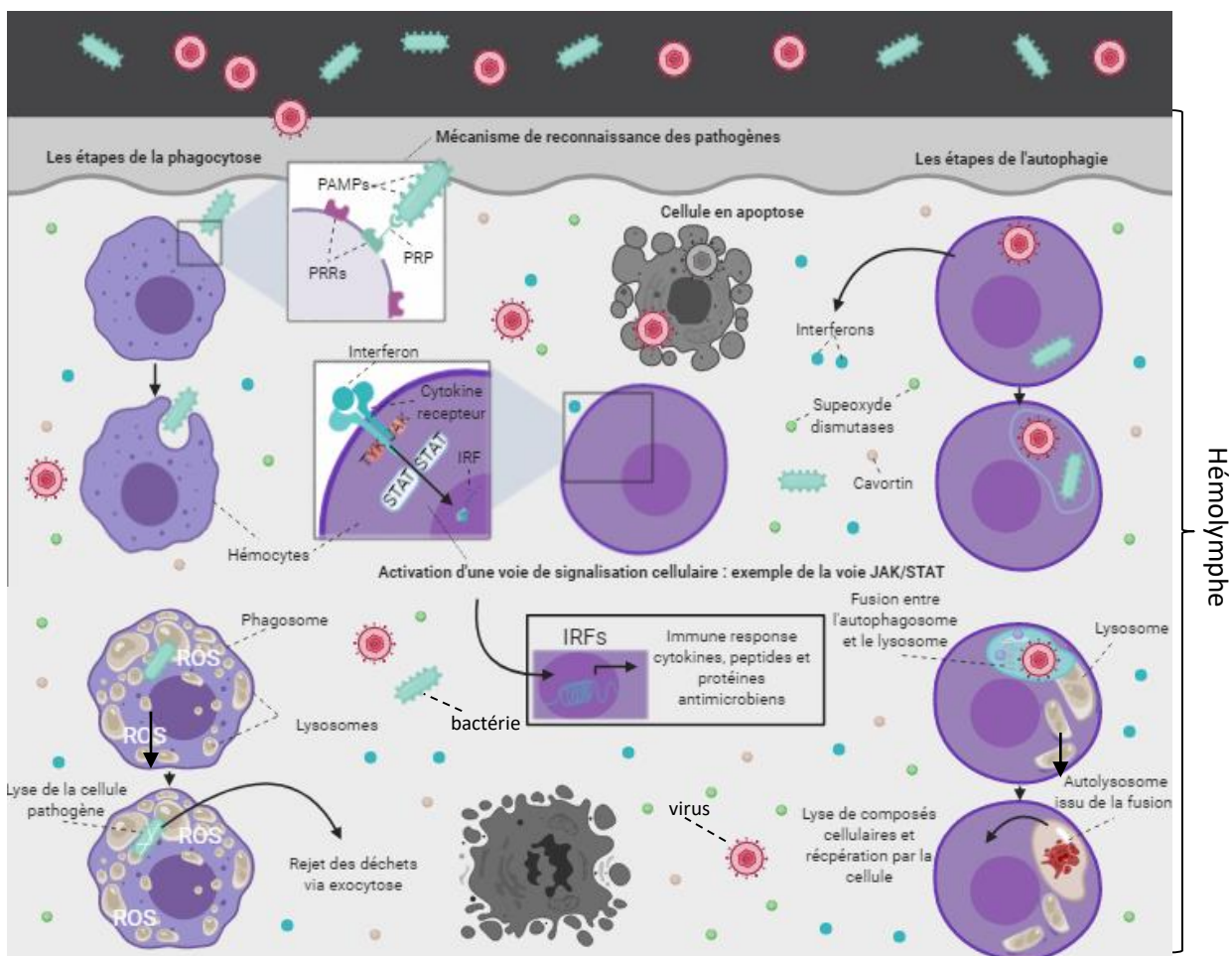


Figure 20 : Représentation schématique des mécanismes de l'immunité innée avérés et soupçonnés chez *C. gigas*. Les pathogènes sont détectés par les protéines de reconnaissances (PRPs) qui se lient au récepteurs membranaires (PRRs) des cellules immunitaires. Cette reconnaissance des particules pathogènes va entraîner différents types de réactions cellulaires hémocytaires : la phagocytose qui consiste en l'encapsulation et à la lyse des pathogènes via l'action d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'apoptose où la cellule se détruit pour limiter l'infection et l'autophagie qui permet à la cellule hôte de dégrader une partie de son matériel cellulaire et parfois ainsi de détruire des pathogènes présents à l'intérieur du cytoplasme. L'infection virale peut entraîner la synthèse d'interférons par les hémocytes qui vont se déplacer dans l'hémolymphe, alerter les autres cellules immunitaires et enclencher la voie JAK/STAT entraînant l'activation de gènes immunitaires (gènes codants pour des cytokines, des peptides antimicrobiens et des protéines antimicrobiennes). D'autres types de voies peuvent être activées au cours d'une infection comme la voie NF-KB qui est impliquée dans la réponse antimicrobienne. Enfin sont présentes dans le milieu extracellulaire, des protéines tels que les super-oxydes dismutases (SOD) et la cavortine, des protéines microbicides.

Certains sont exprimés de façon constitutive tandis que d'autres vont avoir leur expression induite lors d'une infection, de plus, leur expression varie selon les tissus concernés et la nature de l'agent infectieux (Schmitt et al., 2012). Les radicaux libres, les peroxydes et les ions oxygénés sont des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : des molécules oxygénées hautement réactives qui sont produites chez l'huître creuse par les hémocytes au moment de la phagocytose (Lambert et al., 2003; Donaghy et al., 2012). Les ROS vont agir dans l'immunité en provoquant un stress oxydatif sur les protéines microbiennes et en détruisant les chaînes respiratoires des microorganismes. Les superoxydes dismutases extracellulaires (SODs) sont des protéines plasmatiques qui à l'inverse des ROS ont un rôle d'antioxydant. Elles participent à la réponse antibactérienne chez l'huître creuse en aidant à l'ingestion des bactéries par les hémocytes (Gonzalez et al., 2005; Dupertuy et al., 2011). Enfin, la cavortin*, une autre protéine plasmatique présente en grande quantité dans l'hémolymphe a été montrée comme virucide sur l'herpès virus de type 1 dans des cultures cellulaires d'huître creuse (Green, et al., 2014). L'ensemble des mécanismes intervenant dans l'immunité antibactérienne et antivirale chez *C. gigas* est résumé schématiquement sur la figure 20.

B. Une mémoire immunitaire ?

a. Priming et mémoire immunitaire innée

Longtemps considérée comme dépourvue de mémoire et non adaptative, l'immunité innée fait depuis quelques années, l'objet d'une redéfinition. L'immunité adaptative caractéristique des vertébrés met en jeu une réponse mémorielle à un agent pathogène spécifique déjà rencontré par l'hôte. Lors d'une seconde rencontre avec un agent pathogène, le système immunitaire « s'en souvient » et va alors mettre en place une réponse beaucoup plus efficace. Ce type de réponse nécessite l'existence d'une mémoire immunitaire. Chez les organismes vertébrés, cette mémoire immunitaire repose sur les lymphocytes* et le panel d'anticorps crée lors des infections successives. Les organismes invertébrés étant dépourvus de lymphocytes ont longtemps été considérés comme incapables de répondre de manière spécifique à un pathogène. Néanmoins, récemment une nouvelle vision de l'immunité innée a émergé à partir de travaux sur les invertébrés et mettant en évidence la « trained immunity » ou priming immunitaire* (Milutinović & Kurtz, 2016; Gourbal et al., 2018; Melillo et al., 2018). Plusieurs travaux récents contribuent notamment à montrer l'existence de mémoire immunitaire chez les mollusques (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016) dont l'huître (Green & Montagnani, 2013; Zhang et al., 2014; Green et al., 2016; Liu et al., 2016; Lafont et al., 2017; Li et al., 2017). L'ensemble de ces travaux réalisés sur *C. gigas* a révélé la possibilité d'un priming immunitaire antiviral mais également antibactérien et la possibilité d'améliorer les capacités immunitaires des huîtres face aux POMS via notamment l'injection de poly(I :C), imitant une infection virale. **L'huître creuse serait donc capable de mémoriser une expérience passée et d'adapter sa réponse**

immunitaire en conséquence. Une action **transgénérationnelle** du priming immunitaire a également été suggérée (Timothy J Green et al., 2016; Lafont et al., 2019) nécessitant des travaux supplémentaires pour explorer cette idée. Des mécanismes de mémoire immunitaire innée ont également été mis en évidence chez les cellules immunitaires des mammifères (Ifrim et al., 2014; Netea et al., 2015; van der Meer et al., 2015; Pradeu & Pasquier, 2018) renforçant les hypothèses soulevées chez les invertébrés sur l'existence de ce type de mémoire et mettant en évidence l'implication d'un **remodelage épigénétique** dans l'instauration de cette mémoire immunitaire innée.

b. Interactions microbiote et système immunitaire

Certaines communautés bactériennes présentes dans l'hémolymphe de *C. gigas* exercent une activité antibactérienne qui pourrait être bénéfique à la santé de leur hôte (Desriac et al., 2014). Chez l'huître creuse, les mortalités en lien avec les POMs ont été corrélées à une déstabilisation du microbiote (de Lorgeril et al., 2018), de façon similaire, les huîtres moribondes suite à une infection par une souche de *Vibrio* ont montré également un microbiote dénaturé dans l'hémolymphe (Lokmer & Wegner, 2015; Lokmer et al., 2016). 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). En revanche, lors d'un changement d'environnement, les huîtres traitées aux antibiotiques résistent mieux à l'implantation que les huîtres non traitées (Lokmer et al., 2016).

IV. Objectifs de la thèse

L'environnement dans lequel évoluent les organismes contribue à leur apporter les ressources nécessaires à leur survie, à leur reproduction et à leur bien-être. Néanmoins, cet environnement et les fluctuations qu'il peut présenter constituent également des pressions, qui vont agir, parfois, de façon sélective sur les individus. Quels sont les outils dont disposent les êtres vivants pour s'adapter à ces pressions environnementales ? Il est désormais clair, que les seuls changements génétiques ne permettent pas d'expliquer toute la variabilité, et donc la variabilité procurant des avantages sélectifs, présente au sein des populations naturelles.

La principale question à laquelle cette thèse tente de répondre est celle du poids relatif des différents mécanismes du système d'héritabilité, notamment la place de l'épigénétique dans la transmission de l'information héréditaire. Ainsi, dans quelle mesure, ces différents mécanismes sont-ils susceptibles de jouer un rôle dans l'évolution adaptative ?

Pour répondre à cette question globale, le modèle d'étude utilisé a été l'huître creuse *C. gigas*, étudiée au laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement (IHPE) en tant qu'espèce d'intérêt économique majeur. Cet organisme marin sentinelle, est soumis à des pressions

environnementales qui fluctuent rapidement, en faisant un modèle clef pour étudier les mécanismes de réponse adaptative aux stress environnementaux. L'épigénétique présente un large éventail de processus moléculaires contribuant au stockage non génétique de l'information dans l'organisme. La mise en place et la transmission héritable de cette information épigénétique constitue un domaine d'étude fascinant et encore énigmatique. Le laboratoire IHPE et son personnel, possède toutes les connaissances et les outils qui ont permis d'étudier les mécanismes épigénétiques chez l'huitre.

Un des prérequis afin d'amorcer les travaux de cette thèse, a été de faire l'état des lieux des connaissances sur les porteurs de l'information épigénétique chez les mollusques. Cette étude bibliographique a fait l'objet d'une première publication sous forme de review dans le journal « Gene ». Cette publication est présentée dans le chapitre 1 de la thèse.

Ma participation, en début de thèse, à l'analyse des données issues de la thèse de Rodolfo Rondon, m'a permis d'étudier l'impact d'un stress environnemental abiotique sur la transmission de l'information épigénétique. Ainsi, l'impact d'une exposition parentale à un herbicide, le diuron, modifie le méthylome de la génération suivante. Cette étude a été publiée dans le journal « Environmental epigenetics ». La publication issue de ces travaux est présentée dans le chapitre 2 (article 1) de ma thèse.

Enfin, le poids relatif des mécanismes génétiques, épigénétiques et du microbiote dans la réponse de l'huitre creuse à un stress biotique a pu être étudié ainsi que leur aspect transgénérationnel. Ces travaux ont constitué le cœur de cette thèse et font l'objet du deuxième article présenté dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

Chapitre 1 : La place de l'épigénétique chez les mollusques

I. Introduction et principaux résultats

La théorie étendue de l'évolution implique la prise en compte dans les processus évolutifs de nouveaux mécanismes parmi lesquels l'épigénétique (E Jablonka & Lamb, 1998; Danchin & Wagner, 2010; Danchin et al., 2011; Jablonka & Lamb, 2014; Laland et al., 2014; Cosseau et al., 2017; Jablonka & Noble, 2019). Différents mécanismes épigénétiques ont d'ores et déjà été étudiés et leur influence dans la mise en place de phénotypes a été révélée notamment chez les organismes modèles. En revanche, la transmission de l'information épigénétique au cours des générations reste énigmatique et pose la question du rôle réel que peut jouer ce phénomène dans l'évolution. De plus, certaines marques épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ne fonctionnent pas de la même façon chez tous les organismes. Ainsi si l'organisation des processus épigénétiques est bien étudiée chez les vertébrés, elle est beaucoup moins documentée et soulève certaines zones d'ombres chez les invertébrés et plus particulièrement les mollusques.

Le travail bibliographique présenté dans ce chapitre a été réalisé sur deux porteurs de l'information l'épigénétique chez les mollusques : la méthylation de l'ADN et les modifications des histones ; ainsi que sur les effets transgénérationnels chez les mollusques. Cette synthèse bibliographique révèle que la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones sont toutes les deux impliquées dans le développement, et la mise en place de phénotypes en réponse à des pressions environnementales variées. Cependant très peu de papiers mettent en évidence des effets épigénétiques transgénérationnels chez les mollusques, et un *gap* subsiste au niveau des mécanismes de transmissions de l'information épigénétique entre générations et leur impact dans la réponse environnementale.

Ce travail bibliographique est présenté dans l'article 1 : « *Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks* », qui a été accepté et sera prochainement publié dans le journal *Gène*.

II. Article 1 : L'héritabilité épigénétique et les effets intergénérationnels chez les mollusques

Publication : “**Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks.**”

FALLET Manon, LUQUET Emilien, DAVID Patrice et COSSEAU Céline

Article accepté en octobre 2019 et prochainement publié dans le journal Gene.

Epigenetic inheritance and intergenerational effects in mollusks

Manon Fallet¹, Emilien Luquet², Patrice David³, Céline Cosseau^{1*}

¹IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Perpignan France

²Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

³CEFE, UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier – IRD - EPHE, Montpellier, France

*Corresponding author:

IHPE UMR 5244

Université de Perpignan via Domitia

52 Avenue Paul Alduy

66860 Perpignan Cedex

Tel +33(0)4-68-66-21-80

celine.cosseau@univ-perp.fr

Keywords: Mollusk, epigenetic, intergenerational effect, phenotypic plasticity, adaptation

List of abbreviations

5mC	5-methylcytosine, a cytosine that has been modified by the addition of a methyl group on its 5th carbon
ADP	Adenosine diphosphate
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BS-Seq	Bisulfite sequencing
BS-PCR-Seq	PCR amplification after bisulfite sequencing followed by sequencing
Cd	Cadium
CH3	methyl group
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analysis
CpG	A cytosine base followed immediately by a guanine base
CREB2	CAMP response element-binding protein 2, a transcription factor that inhibits long-term memory formation
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMT1	DNA methyltransferase responsible for DNA methylation maintenance

DNMT2	DNA methyltransferases that methylates tRNA
DNMT3	DNA methyltransferases for de novo DNA methylation and maintenance
DNMTs	DNA methyltransferases
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FISH	Fluorescence in situ hybridization
H2A	one of the 5 types of histones in chromatin
H2AV	a variant of histone H2A
H2A.X	a variant of histone H2A
H2B	one of the 5 types of histones in chromatin
H3	one of the 5 types of histones in chromatin
H3.3	a variant of histone H3
H3K27	the 27th amino acid (lysine) in histone H3
H3K4	the 4th amino acid (lysine) in histone H3
H3K9	the 9th amino acid (lysine) in histone H3
H4	one of the 5 types of histones in chromatin
H4K12	the 12th amino acid (lysine) in histone H4
Jmj	Jumonji (histone demethylase)
MAPK/ERK	Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase
meDIP-seq	Methylated DNA Immunoprecipitation sequencing
MiRNAs	Micro RNAs
MSAP	Methylation-sensitive amplified polymorphism
MS-PCR	Methylation-specific PCR
pCO₂	partial pressure of CO ₂
PCR	Polymerase chain reaction
PTMs	Post-Translational Modifications
pH	potential of Hydrogen
qPCR	quantitative Polymerase chain reaction
RT-qPCR	quantitative reverse transcription PCR
RNA	Ribonucleic acid
RRBS	Reduced representation bisulfite sequencing
SAM	S-adenosyl methionine
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
UV-HPLC	Ultraviolet High performance liquid chromatography

Abstract

Recent insights in evolutionary biology have shed light on epigenetic variation that interacts with genetic variation to convey heritable information. An important characteristic of epigenetic changes is that they can be produced in response to environmental cues and passed on to later generations, potentially facilitating later genetic adaptation. While our understanding of epigenetic mechanisms in vertebrates is rapidly growing, our knowledge about invertebrates remains lower, or is restricted to model organisms. Mollusks in particular, are a large group of invertebrates, with several species important for ecosystem function, human economy and health. In this review, we attempt to summarize the literature on epigenetic and intergenerational studies in mollusk species, with potential importance for adaptive evolution. Our review highlights that two molecular bearers of epigenetic information, DNA methylation and histone modifications, are key features for development in mollusk species, and both are sensitive to environmental conditions to which developing individuals are exposed. Further, although studies are still scarce, various environmental factors (e.g. predator cues, chemicals, parasites) can induce intergenerational effects on the phenotype (life-history traits, morphology, behaviour) of several mollusk taxa. More work is needed to better understand whether environmentally-induced changes in DNA methylation and histone modifications have phenotypic impacts, whether they can be inherited through generations and their role in intergenerational effects on phenotype. Such work may bring insight into the potential role of epigenetic in adaptation and evolution in mollusks.

Introduction

Evolution is a fundamental process at the origin of the biodiversity on Earth. Throughout evolutionary time, biological organisms have changed across generations, leading to contemporary lineages – but evolution and adaptation are still ongoing, and even sometimes boosted by rapid human-driven changes in physical and biotic environments (Chapin et al., 2000; Ceballos et al., 2010; Bellard et al., 2012). The inheritance system is a key feature for evolution since a phenotype needs to be transmitted across generations to be selected. During the last couple of years, it has become clear that there are considerable non genetic sources of heritable phenotypes (Jablonka et al., 1992; Jablonka & Lamb, 2008; Danchin et al., 2011). which led to the notion of a systems concept of inheritance in which genetic, epigenetic, cytoplasmic and microbiome elements interact mutually, and with the environment to code and transmit the phenotype (Cosseau et al., 2017) (see also Jablonka & Noble, 2019)..

In this review, we will take the convention to call epigenetic a change in gene function without modifications in DNA sequence. Such changes can be reversible and only some of them are mitotically and/or meiotically heritable – only the latter being relevant for evolutionary change. We focus in particular on changes in gene expression associated with changes in chromatin structure. Chromatin is a complex of DNA and associated proteins whose primary function is to modulate genome packing and

organization, as well as its metabolism. Chromatin structural changes can alter the accessibility of DNA by transcription factors and have consequences on gene expression. The main known bearers of epigenetic information are DNA methylation, histone PTMs, nuclear spatial remodelling and non-coding RNA, which complex interplay results in distinct chromatin states, known as chromatin colors (Filion et al., 2011; Van Steensel, 2011). A change in a single or several bearers of epigenetic information at a particular locus may result in changes in chromatin structure at this particular locus, and therefore affect the expression of underlying genes in the affected region. Such a change is called an epimutation. These epimutations may be the results of normal regulation during ontogenesis or cellular metabolism or may be induced by environmental clues.

Most studies in this field have so far focused on model organisms for which several reviews are available (Feng et al., 2010; Zhou et al., 2011; Keung et al., 2015; Schübeler, 2015). These organisms belong to two of the three major clades of bilaterian animals: the deuterostomes (that include vertebrates) and the ecdysozoans (that include arthropods and nematodes). Only a few papers are available for the third major clade (Lophotrochozoans), of which the most diverse phylum is mollusks. In addition, mollusks comprise many species of economic (e.g. edible bivalves such as mussels or oysters) or sanitary (vectors of snail-borne parasitoses such as bilharziasis or fasciolosis) interest. In this review, we first aim at compiling the mechanisms of epigenetic changes which have been described in mollusks. Then we focus on what is known about intergenerational effects that have been reported in mollusk species. We finally discuss directions for further work, especially to relate molecular aspects of epigenetic information to phenotypes and inheritance patterns – a key aspect to evaluate the importance of epigenetics in adaptive evolution.

1- DNA methylation in mollusks

One of the most studied epigenetic bearers of information is DNA methylation, which involves the biochemical modification of a DNA base. In animals, cytosine methylation most often occurs in a CpG dinucleotide context and is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) which add a methyl group (CH₃) to the fifth carbon of the pyrimidine ring (Bhutani et al., 2011). DNA methylation has been extensively studied in model organisms such as mammals and flowering plants (Law & Jacobsen, 2010) and its role as a heterochromatic feature in gene promoters, repeat elements and telomere elements has been largely validated (Ambrosi et al., 2017). DNA methylation has been the most studied epigenetic bearer of information in mollusk species (See Table 1 for methods to study DNA methylation).

1.1- Mollusks display a conventional invertebrate-like DNA methylation pattern

Methylated cytosines have been identified in a diverse range of mollusk clades. Indeed, they have been referenced in 8 gastropods species (Fneich et al., 2013, D. V. Nica et al., 2017, Joe, 2013, Müller et al., 2016; Bal et al., 2017; Kong et al., 2017), in 7 bivalves (Sun et al., 2014, Petrović et al., 2009, Ardura

et al., 2017, Gavery & Roberts, 2010) and in one cephalopod species (Díaz-Freije et al., 2014) (Table 2). Global cytosine methylation has been shown to vary from 5 to 15% of CpG being methylated based on LC-MS analysis or BS-Seq analysis in mollusk species. This proportion is higher than what is generally found in insects (ranging from 0 to 14%, Bewick et al., 2016) and lower than what is reported in fishes (80% of CpG being methylated, Metzger & Schulte, 2016), plants (30% in CG, CHG and CHH contexts, Law & Jacobsen, 2010) and mammals (70-80% of CpG being methylated, Law & Jacobsen, 2010). DNA methylation features in mollusks are essentially based on data from *Crassostrea gigas* (15 papers concerned *C. gigas* on the 38 founded in the literature concerning DNA methylation in mollusks) and *Biomphalaria glabrata* (3 papers) for which whole methylome characterization has been achieved by BS-Seq or meDIP seq ((Wang et al., 2014; Riviere et al., 2017) (Cosseau personal communication for *B. glabrata*) (Table 2). These two species display the features of DNA methylation patterns encountered generally in invertebrates (Sarda et al., 2012): *C. gigas* and *B. glabrata* have mosaic type DNA methylation (*i.e.* large blocks of fully methylated DNA are separated by large blocks of fully unmethylated DNA) and cytosines are methylated predominantly in the CpG context. The methylation is essentially intragenic (exons and introns) while methylation of repetitive elements and intergenic regions occurs only at moderate levels (Sarda et al., 2012). In *C. gigas*, intragenic DNA methylation level correlates with gene length and gene expression levels (Wang et al., 2014; Olson & Steven B Roberts, 2014b; Rondon et al., 2017a). Hypermethylated genes are roughly associated with housekeeping functions, and hypomethylated ones are linked to regulated and/or inducible functions (Gavery & Roberts, 2010). Different types of exons have also been associated with different cytosine methylation levels (Song et al., 2017). Of note, for a given gene, correlation between differential gene expression and differential promoter methylation level is barely reported (Tran et al., 2016; Rondon et al., 2017a) and sometimes reported data are in conflict with results on vertebrate model organisms where cytosine hypermethylation in promoter regions results in reduction of downstream gene expression (Li et al., 2015). In this sense, the role of invertebrate DNA methylation in mollusk remains an open question and the study of DNA methylation in combination with other techniques such as ATAC-Seq would be necessary to gain insights on this question.

1.2- DNA methylation is a key feature for development in mollusk species

Cytosine methylation has been shown to be a key feature for developmental process in mollusks (Table 2). A prominent role of DNA methylation for mollusk reproduction success has been suggested based on different studies performed in *B. glabrata* (Geyer et al., 2017) and *C. gigas* (Riviere et al., 2013) for which genes encoding for DNA methylation machinery are over-expressed in gonadal tissue compared to somatic tissue. These studies are supported with analysis using DNA demethylating agent treatments which impact the egg production and embryo development in *B. glabrata* (Geyer et al., 2017, N. Luviano personal communication). DNA methylation variation has also been reported during the early

development of mollusks. A global increase in methylation within exons at the expense of other genomic feature occurs in *C. gigas* during larval development (Riviere et al., 2017), for which tissue and development specific expression of gene encoding DNA methylation machinery proteins is observed (Wang et al., 2014). A global demethylation process occurs along the development of *O. vulgaris* (Díaz-Freije et al., 2014; García-Fernández et al., 2017) and age dependent decrease of 5mC levels is also observed in juvenile *P. acuta* snails (Müller et al., 2016a) and in *C. farreri* (Lian et al., 2015). Significant variation in DNA methylation levels is also observed among tissues of *Pinctada fucata* and during early step of development with DNA methylation levels increasing with development (Li et al., 2014). Synaptic plasticity has been extensively studied in *Aplysia* and epigenetic changes have been shown to be key feature for long-lasting changes in the functional state of neurons (Rajasethupathy et al., 2012).

1.3- DNA methylation is responsive to the environment in mollusk species

Both spatial and temporal variation of abiotic factors have been shown to affect DNA methylation patterns in several mollusk species (Table 2). DNA methylation patterns can vary according to the seasonality (especially of temperature) in the oyster *Isognomon alatus* (Suarez-Ulloa et al., 2019) or according to both temperature and salinity in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Kong et al., 2017). DNA methylation differences in response to spatial variation in water current speed (lakes vs. rivers) has been observed in the snail *Potamopyrgus antipodarum* (Thorson et al., 2017). Another example is the invasive populations of *Xenostrobus securis* recently settled in a new area which are less methylated than older ones (Ardura et al., 2017). In addition, chronic environmental exposure to chemical compounds on ecologically relevant species has recently attracted strong attention and a few studies have investigated the impact of environmental stressors on epigenetic bearers of information of terrestrial and aquatic mollusks. Cadmium exposure induces global cytosine (and possibly hydroxycytosine) hypermethylation in *C. aspersus* (Nica et al., 2017(a); Nica et al., 2017(b)). The effect of vinclozolin and prednisolone has also been shown to affect DNA methylation patterns in *P. acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2016; Bal et al., 2017). Global level of hydroxymethylcytosine (but not methylcytosine) decreases in *C. gigas* in response to copper exposure (Sussarellu et al., 2018) and a parental effect is reported on DNA methylation patterns in *C. gigas* in response to the diuron herbicide (Rondon et al., 2017a). Biotic interactions also often induce change in DNA methylation. Infection with toxic algae has been associated to a general hypomethylation in different oyster species (Farias et al., 2017; Gonzalez-Romero et al., 2017). Trematode infection in *B. glabrata* affects the expression of genes involved in the response to stress (Ittiprasert et al., 2015) or encoding for DNA methylation machinery proteins and impacts the level of DNA methylation of this mollusk (Geyer et al., 2017), whereas no effect of trematode infection on the level of 5mC is observed in *Zeacumantus subcarinatus* (Joe, 2013).

The question of the mechanisms which lead the environmental information to induce epimutations remains however an open question. The cross talk between the nuclear epigenome and mitochondria is

an emerging field of interest to investigate this question. Mitochondrial functions provide intermediate metabolites whose derived products (ex: SAM, acetyl coA) are known to modify epigenetic marks in the nucleus (Matilainen et al., 2017; Weinhouse, 2017). Mitochondrion is one of the key target of environmental stress in mollusk species. Mitochondrial toxicity of Cd has been shown in clams (Ji et al., 2019), mitochondrial dysfunctions in mussel hemocytes are induced after an exposure to titanium particles (Wang et al., 2019) and infection of *B. glabrata* with nematodes induces suppression of mitochondrial oxidative metabolism (Tunholi-Alves et al., 2019). In this sense, we believe that studying the consequences of environmental information on cellular metabolism is of great interest to first investigate the link between the environment and DNA methylation.

2- Histone modifications in mollusks

The primary protein components of chromatin are histone proteins and wrapping of DNA around these histone proteins constitutes the nucleosomes (Kornberg, 1974; Bentley et al., 1984). PTMs of histones result in chromatin structural modifications (Strahl & Allis, 2000) which can alter the accessibility of DNA by transcription factors and have consequences on gene expression (see: Kouzarides, 2007 for a review). Two types of histones exist: core histones and linker histones. The core histones (H2A, H2B, H3 and H4) are agglomerated with two copies of each to form nucleosomes around which DNA is wrapped (Thomas & Kornberg, 1975). Only one linker histone exists (H1) and it is implicated in linkage between nucleosomes and DNA and therefore plays a critical role in chromatin formation (Kornberg, 1977; see: Fyodorov et al., 2017 for review). Histone N-terminal tail can carry over 60 chemical modifications (Vaquero et al., 2003) such as methylation, acetylation, ubiquitination, phosphorylation, ADP-ribosylation, citrullination and sumoylation (van Holde, 1988; Strahl & Allis, 2000). Post-translationally modified histones interact with each other's and with chromatin modifying enzymes to form complexes which result in the different chromatin colors responsible for the different level of chromatin compaction (Barth & Imhof, 2010). To study histones and histones marks, several techniques are available (Table 3). Among them, techniques based on the use of commercially available antibodies have been shown to be suitable for mollusks thanks to the high level of evolutionary conservation displayed by these proteins in eukaryotes (See Table 3 for methods to study histone modifications, See Rivera-casas et al., 2017 for accurate description of methods).

Histones and histone variants have been described in many mollusk species (Drabent et al., 1999; Albig et al., 2003; Li et al., 2006; Rivera-Casas et al., 2016). Protamine-like-type, histone H1-type or protamine-type have also been identified in the sperm or testis of diverse mollusks to replace canonical histones (Eirin-Lopez and Ausio 2009, Mennella et al., 2002, Martinez-Soler et al., 2007). Since histones are very conserved proteins along evolution, some studies have been carried on phylogenetic reconstruction and evolution of histones genes in mollusks (Eirin-Lopez et al., 2002, 2004; Armbruster et al., 2005; Li et al., 2006; Bouilly et al., 2010). Other studies have also reported the DNA extracellular track activity of histones showing the potential implication of histone-like proteins in antimicrobial

defense in different mollusk species (Li et al., 2007; De Zoysa et al., 2009; Poirier et al., 2014; Bachère et al., 2015). We will not discuss the details of these analyzes since this review rather focuses on the implication of histone PTMs as an epigenetic carrier of information (Table 2).

2.1- Modified histones are key mechanisms for mollusk development

Tissue and stage specific pattern of the *Jmj* (expression has been registered and clearly indicate a role for histone demethylase during gametogenesis and embryogenesis in *C. gigas* (Fellous et al., 2014). The expression of these Jumonji histone demethylase gene is also affected in response to temperature changes during *C. gigas* early development (Fellous et al., 2015). These changes correlate with changes in methylation level on H3K4, H3K9, H3K36 and H3K27 and further lead to abnormal development (Fellous et al., 2015, 2019). Consequently, in *C. gigas*, histone methylation patterns are crucial for gametogenesis and early development and environmental cues further interfere with *C. gigas* developmental trajectories possibly via interaction with those methylation patterns. Furthermore, in the cephalopod *Sepia officinalis*, the progressive reorganization of chromatin leading to the formation of mature sperm relies on the mono-acetylation of H4K12 followed by a massive hyperacetylation of histone H4 (Kurtz et al., 2007) therefore suggesting a key role for histone acetylation during gametogenesis in this species.

2.2- Histones PTMs are involved in learning and long term memories in mollusks

Learning and long-term memory formation requires gene expression regulation, and epigenetic chromatin remodeling mechanisms occurs to regulate such processes. Histone modifications have been shown to be key players for regulation of such processes in the two gastropods *Helix lucorum* and *Aplysia sp.* Stage specific increase of H3 acetylation occurs in response to food aversive learning in *H. Lucorum* in MAPK/ERK dependent manner in the right parietal ganglion (Danilova et al., 2010; Danilova & Grinkevich, 2012). Histone methylation seems to be also involved in this food aversion memory phenotype since the level of methylation on H3K4 trimethylated and H3K9 dimethylated increases after learning (Grinkevich, 2014). In *Aplysia sp.*, the formation of new synapses relies on the activation of key genes whose expression is dependent of chromatin conformation regulated by histone acetylation (Guan et al., 2002; Hart et al., 2011). Moreover, in case of long term facilitation dysfunction, the injection of trichostatin A, an histone deacetylase inhibitor, allows the reestablishment of long term memory (Chen et al., 2014).

2.3- Histones PTMs are sensitive to environmental cues in mollusk species

How the environment may affect histone PTMs is a key question when it comes to study epigenetic-based events. This question has started to be explored in mollusk species through the study of the impact of diverse infectious related stress in various species (Table 2). Changes in phosphor-acetyl histone H3 in the pedal ganglia neurons of *Pomacea canaliculata* after injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide has been reported (Ottaviani et al., 2013). In *B. glabrata*, hemocytes changes in

histone H4 expression have been identified in response to *Echinostoma caproni* parasite infection (Bouchut et al., 2006) and genes encoding for histones H2A, H2AV, and H3.3 are up-regulated during infection by the parasite *Schistosoma mansoni* (Adema et al., 2010). Brevetoxin exposure of *C. virginica* also affects the level of serine phosphorylation of histone variant H2A.X. (Gonzalez-Romero et al., 2017). These histone marks have already been identified as a marker of DNA damage and such an increase could have been caused by the genotoxic effect of brevetoxins.

Once again, we underline the importance of studying the consequences of environmental pressure on mitochondrial physiology to investigate a potential link between the environment and histone PTMs. One of the main derived product of mitochondrial metabolism (acetyl coA) is a major compound involved in histone acetylation (Matilainen et al., 2017; Weinhouse, 2017).

3- Intergenerational effects in mollusks

Environmental factors experienced during the organism's development influence its phenotypes either transiently (e.g. behavior, physiological state) or permanently (e.g. morphology, life-history strategy). The impact of environmental conditions experienced during the development may not be limited to the individuals who experienced them, but may affect generations to follow. Although parental effects have been largely explored (e.g. (Mousseau & Fox, 1998; Crean & Bonduriansky, 2014), the accumulating evidence that past environments can influence the phenotype beyond two consecutive generations (e.g. (Plastow et al., 2006; Remy, 2010; Shama & Wegner, 2014; Sarker & Peleg-Raibstein, 2019) has renewed the scientific attention for generational carry-over effects, especially because it may enable organisms to cope with fast-changing environment (Gienapp et al., 2008), providing a quicker response than purely genetic evolution. The terminology used to describe such generational carry-over effects is variable without a real consensus within the scientific community. Here, we distinguish the terms multi- and trans-generational effects based on (Skinner, 2008). 'Multigenerational' indicates that the generational carry-over effects result from a direct exposure to the environmental factor – germ cells/gametes/embryos are directly exposed to the environmental factor when their parents are exposed. For example, in mammals, parental environmental experience (F0) can be transmitted to the F1 directly to the foetus *in utero* and to the F2 via a modification of F1 germ cells that are already present at the foetus stage. On the other hand, 'transgenerational' involves a germ line transmission between generations without direct exposure to the environmental factor. In mollusks, germ cells appear early in the development (Luchtel, 1972; Extavour, 2003; Fabioux, 2004; Fabioux et al., 2004). Therefore, unless the environmental effect is applied in a narrow window right after fertilisation, it might be necessary to study at least three generations to reach the transgenerational level (i.e. F0: the exposed generation, F1: indirectly-exposed generation via F0 germ cells and F2: non exposed generation) and even through more generations for species with internal hatching (e.g. *Viviparus viviparus*). To simplify the following

section, we encompass multi- and transgenerational effects under the terms ‘intergenerational effects’ and we precise when required.

Intergenerational effects are well documented in a great variety of taxa (see for example in plant: Galloway & Etterson, 2007, in Crustacean and plant: Agrawal, 1998, , in fishes: Salinas et al., 2013, in marine polychaetes: Rodriguez-Romero et al., 2015, in mice: Dias & Ressler, 2014, in humans: Veenendaal et al., 2013) and induced by various environmental factors (predation: Walsh et al., 2015, light: Galloway, 2004, temperature: Shama et al., 2014, phenology: Richter-boix et al., 2014, food availability: Schulz, 2010). However, the majority of studies is limited to two or three generations (but see: Plaistow et al., 2006; Remy, 2010; Sarker & Peleg-raibstein, 2019) offering thus a limited understanding of the persistence of such effects and their evolutionary implications. In Mollusks, we found 28 studies investigating intergenerational effects in 8 families and 14 species (cephalopods are not represented; Table 4), which is very limited and may be surprising given their key roles in ecosystem functioning and their health and economic importance. However, although some mollusk species have short generation times (months) and are easily raised in laboratory (e.g. Planorbidae and Physidae in Gastropods), the majority of species have a long generation time (months to years) or a complex life cycle (e.g. with several pelagic larval stages), for which it is much more difficult to measure the response across multiple generations (Donelan & Trussell, 2015). These studies have been mainly conducted across two consecutive generations (i.e. effect of parental environment on offspring phenotype), except (Parker et al., 2015; Müller et al., 2016b; Bal et al., 2017; Tariel et al., 2019) who performed a three-generation experiment. They investigated the effects of both abiotic (pCO₂ levels, contaminants, salinity) and biotic (virus, predation cues) environmental factors on various phenotypic traits of offspring (survival, life-history traits, growth/morphology, behavior, shell structure, metabolism, DNA methylation; Table 4). Overall, these studies demonstrated that parental environment can influence the offspring phenotype in mollusks. With so few studies, it still seems difficult to draw general conclusions about the intergenerational effects in mollusks – as already advocated by Ross et al., 2016 (but specifically on the response to changing ocean conditions). However, some points are emerging and deserve to be highlighted:

1/ The evidence of intergenerational effects may depend on the current environmental conditions experienced by offspring. For example, (Donelan & Trussell, 2015, 2018a, b) examined the influence of parental exposure in *Nucella lapillus* to predator risk cues (crab) on the offspring phenotype (offspring size at emergence, growth, anti-predator behavior). They demonstrated that parental exposure to crab odours influences the offspring phenotype only when offspring are themselves exposed to the same cue. There is no effect of parental environment for offspring in risk-free environment. An opposite result, also illustrating the interaction between parental and offspring environment, was obtained by Luquet & Tariel (2016) in *P. acuta*. The predator-cue parental environment (crayfish) influenced the offspring phenotype (anti-predator behavior, shell thickness and shell size) only when the offspring were raised in control conditions (offspring exposed to predator cues adopted the same defensive phenotype whether

or not their parents had been exposed). Zhao et al. (2017, 2018) showed that exposure of the Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) to an acidification scenario influenced the offspring phenotype (shell growth, condition index, and metabolism) only when the offspring were themselves exposed to acidic pH. These few examples show that the phenotypic plasticity of offspring can interact (sometimes in a reinforcing sometimes in an attenuating way) with the intergenerational effects to shape the offspring phenotype. Consequently, it is crucial to design full factorial experiments to investigate the intergenerational effects (Donelson et al., 2018). Such results are largely consistent with studies on other taxa (Salinas et al., 2013; Beaman et al., 2016).

2/ This panel of studies illustrates a large heterogeneity in experimental design, especially regarding the developmental stages at which ancestors are exposed to environmental changes and at which offspring traits are measured. A majority of studies investigated the effect of adult exposure on the postembryonic stage of offspring (Table 4). Some studies highlighted that intergenerational effects can vary according to these timing. For instance, (Kimberly & Salice, 2014) exposed F0 embryos or juveniles of *Physa pomilia* to cadmium and investigated the hatching success of F1 snails. Exposure during the embryonic development of parents decreased the hatching success of offspring while juvenile exposure did not influence it. Reategui-Zirena et al. (2017) explored the consequence of adult exposure to cadmium of *Lymnaea stagnalis* on both the embryonic (hatching success, time to hatch) and the post-embryonic (juvenile survival to cadmium) stages. Intergenerational effects were investigated without cadmium at the embryonic stage but with cadmium at the post-embryonic one; however, they seem different between the developmental stages: there were no effects of parental exposure (0 ug/L to 100 ug/L of cadmium) on hatching success while parental exposure increased the cadmium tolerance (survival) of juveniles. Together, these results suggest that the presence or absence of intergenerational effects at a specific life-cycle stage of mollusks does not predict the effects at earlier or later stages and may depend on when the ancestors have been exposed to the environmental factor. Considering the different life-cycle stages is thus important to explore the intergenerational effects in mollusks.

3/ Intergenerational effects may be adaptive or not, and may or not enable organisms to cope with fast-changing environment. The intergenerational effects reported in these studies on mollusks have sometimes positive sometimes negative effects on the performance of offspring depending on the offspring environment (as mentioned above), the species and the environmental factors considered. For example, parental exposure to predation-risk increased the performances and anti-predator defences of offspring (*N. lapillus*: Donelan & Trussell, 2015, 2018a, b; *P. acuta*: Beaty et al., 2016; Luquet & Tariel, 2016; *B. glabrata*: Plautz & Guest, 2013), and similar positive effects are observed in response to other environmental factors (Acidification: Parker et al., 2012; Fitzer et al., 2014; Zhao et al., 2017, 2018; contaminant: (Plautz & Salice, 2013; Reategui-Zirena et al., 2017). In contrast, Fidler et al. (2016) and Bal et al. (2017) showed that parental exposure to fungicide and glucocorticoid influenced negatively the offspring phenotype of *L. stagnalis* and *P. acuta*, respectively (similar negative effects in Kimberly & Salice, 2014 and Griffith & Gobler, 2017). In the *L. stagnalis* study, parental exposure amplified the

detrimental effect of the direct exposure of eggs on hatching success and time, likely because it modified adult energetic metabolism, and as a consequence the macronutrient content in eggs they produced changed— a form of toxicity that can affect the early development of the F1 (Fidder et al. (2016)). Similarly, the observation that during continuous exposure to a pollutant over several generations, developmental anomalies and mortality tend to be aggravated at each additional generation (as in *P. acuta* exposed to prednisolone, Bal et al. (2017)) suggests that poor parental condition is transmitted to the next generation through egg quality, resulting in cumulative toxicity over generations. Suski et al. (2012) studied the effects of parental exposure to salinity on hatching success in two gastropod species (*Helisoma trivolvis* and *P. pomila*). They found that parental salinity exposure increased the hatching success of *H. trivolvis* but decreased it for *P. pomilia*. Interestingly, Parker et al. (2017) showed that parental exposure to acidic pH induced faster growth and developmental rates of *Saccostrea glomerata* larvae considering acidification as a sole stressor. However, considering multiple stressors (temperature, food, salinity), the parental effect decreased the survival of larvae. Consequently, intergenerational effects may sometimes reflect some long-lasting toxicity of an environment rather than the transmission of an acquired tolerance to that environment: case-wise discussion of both possibilities is required before drawing any significant conclusions.

4/ Intergenerational effects may involve a range of genetic and non-genetic processes which are barely addressed in studies reported in mollusk species. Among the non-genetic components, we consider processes such as parental effects, e.g. transmission of nutrients, hormones, proteins (Mousseau & Fox, 1998; Crean & Bonduriansky, 2014), and epigenetic effects (DNA methylation marks, histone protein modifications, non-coding small RNAs (Holeski et al., 2012; Schlichting & Wund, 2014)). These non-genetic components are arousing a high interest in evolutionary ecology. The implication of the epigenetic bearers of information at the origin of intergenerational effects has been established in several model species (Heard & Martienssen, 2014) but very few studies have investigated the mechanisms of intergenerational effects in mollusks. Lafont et al. (2019) demonstrated that *Crassostrea gasar* offspring survived better in the presence of a virus when the mothers had been exposed to the same virus, but they did not find evidence of transcriptomic modification in the offspring, suggesting maternal provisioning of antiviral compounds in the eggs. In *P. acuta*, parental exposure to glucocorticoid pollution did not affect the DNA methylation in the parental snails but induced a significant decrease in global 5mC in the next generation, which may be related to the negative intergenerational effect of toxicant on offspring traits (Bal et al., 2017). In *C. gigas*, Rondon et al. (2017) showed that the parental herbicide exposure had an impact on the DNA methylation pattern of its progeny. However, this change in methylation level correlated with RNA level only in a very small group of genes, suggesting the absence of obvious impact on molecular phenotype (gene expression and splice variant generation). This absence of obvious link between DNA methylation and gene expression again raises the question concerning the role of intragenic DNA methylation in invertebrate species. DNA methylation patterns may be affected by the conditions to which current or past generations were exposed, and be a manifestation of

intergenerational responses just like any other phenotype, without being the vehicle that allows information to cross generations. Consequently, both intergenerational effects and DNA methylation patterns can be induced by environmental conditions in mollusks but the relationship between the two still has to be demonstrated. Moreover, we did not find any study investigating the relationship between histone modifications and intergenerational effects on mollusks.

Discussion/Conclusion

One of the major issues in modern biology is the role of non-genetic phenotypic variations in organism's adaptation. In particular, epigenetic variation and its capacity to be transmitted to offspring is expected to affect the evolutionary process (E. Jablonka & Lamb, 1998). In this article, we have narrowed the term epigenetic to chromatin states, supported by bearers of epigenetic information whose states are reversible and inherited through mitosis and possibly meiosis. While research about epigenetics based events and intergenerational effects is booming in model organisms, we have reviewed the current knowledge of both mechanisms in mollusk species. We have clearly highlighted that the intertwined relationships among molecular aspects of epigenetic information, phenotypic variation and inheritance patterns are barely addressed in mollusks and to some extent, in non-model organisms in general. To obtain a better understanding of the evolutionary role of epigenetic processes in the light of intergenerational phenotypic response, three main key research areas are emerging: (i) to investigate how and to what extent the chromatin states are related to the phenotypic variation over generations, (ii) to estimate the adaptive nature of intergenerational effects and/or chromatin states, and (iii) to track down the chromatin states from somatic to germinal lines over generations in order to determine whether they are the vehicle bearing the heritable information or phenotypic by-products.

- (i) How and to what extent are the chromatin states related to the phenotypic variation over generations

To relate the chromatin states as causal factors of induced phenotypic responses over generations are a challenging task. A fundamental property of chromatin states is not to be permanent, possibly accompanying a progressive reversibility of phenotypic responses over generations (Day & Bonduriansky, 2011). A first step towards understanding how this takes place is a correlative approach. This consists in testing (i) whether an environmental factor induces both specific chromatin states and phenotypes, (ii) whether the reversibility of chromatin states and phenotypes over generations follow the same dynamics (cf. Fig. 1, experimental design 1) and (iii) whether both phenotypes and chromatin states have a similar asymmetry in transmission patterns between the male vs female sex. These objectives require to define the developmental window during which the organism is exposed (early life stages are the most sensitive to environmental variation; (Faulk & Dolinoy, 2011)) (cf. Fig. 1,

experimental design 1) and to localize accurately the chromatin states in organs or tissues which are the most suitable to the underlying phenotype. Considering the high level of interplay which might occur between all the bearers of epigenetic information (Eirin-Lopez & Putnam, 2018), the most exhaustive plan is to consider all of them. We focussed our review on DNA methylation and histone modifications but other bearers might be followed. Small RNAs and locus topography in the nucleus are other bearers of epigenetic information which have been shown to be sensitive to environmental stress in mollusks (Biggar et al., 2012, Knight et al., 2010). A whole genome study is the most appropriate to accurately localize the chromatin state. Such approach could lead to the identification of epimutations which could be considered as a valuable epimarkers induced by the environment and linked to the observed phenotype. The use of epimarker in mollusk has been suggested recently as a mean to set environmental bioindicators (Suarez-Ulloa et al., 2015) and their potential application as a reliable early environmental marker of pollution has been investigated in *C. gigas* (Rondon et al., 2017a). Interestingly, tools to address the functional impact of an epimutation on a given phenotype recently became available when considering DNA methylation as the epigenetic bearer of information. The crispr-dcas9 system which contains an inactivated cas9 protein but a fusion with the DNMT3 enzyme (McDonald et al., 2016) allows to methylate a target locus and therefore to induce targeted epimutations whose functional impact may be studied. This tool is promising to investigate the cause / effect relationship of an epimutation (here only considering DNA methylation) for a given phenotype. For now, such an approach is restricted to model organisms (see for example: Liu et al., 2016). Non-model organisms rather use drugs targeting chromatin modifying enzymes which disorganize the chromatin states globally but not specifically (Geyer et al., 2017). Such non-specific methods may have pleiotropic effects which can mask the relationship among environments, chromatin states and traits. Other molecular analysis such as transcriptomics, proteomics might also be of great interest to analyze the molecular phenotypic response. Transposon mobilization, copy number variation and SNPs analysis can complete the overall scheme and extend the study to a level which will allow us analyze the relative contribution of genetic and epigenetic for the observed multigenerational plasticity.

ii/ Adaptive nature of intergenerational effects and chromatin states

To evaluate the evolutionary importance of chromatin states and intergenerational effects in response to environment, it is crucial to determine their effects on the organism's fitness. The intergenerational nature of the effect does not really matter here; the methods are the same as for classical studies of plasticity. Experiments should evaluate fitness traits of epigenetically induced offspring fitness (e.g. survival, fecundity) and assess them in both types of environments (control and induced) using some form of factorial design. They should also investigate the reliability of the cue perceived by one generation (usually, parents) as a predictor of the conditions of selection in the generation where the response is expressed (usually, offspring) in natural environments. Ideally, the induced phenotypic and

chromatin states of the offspring should be measured in parallel (cf. (i)). The timing issue is important here: in order to show that some phenotypic or chromatin-state modification of offspring (in response to, say, parental exposure to a pollutant or virus) are related to fitness effects, these modifications and the associated fitness effects must be present before the offspring themselves are exposed to the pollutant or virus. Irrespective of the new changes that this exposure may induce, if epigenetically modified offspring survive better to it, the modification did prepare them to pollutants or virus, and can be said to be adaptive if in nature, the half-life of pollutant or virus outbreaks makes it likely that offspring environment resembles their parents. The adaptive nature of intergenerational effects and chromatin states is worth to investigate since environmental manipulation could be performed with, the intention to induce an 'epigenetic memory' to produce a desired phenotype. Training the innate immunity has been suggested on fish and could be used in oyster aquaculture since transgenerational immunity and long lasting antiviral innate immune priming has been reported in *C. gigas* (Lafont et al., 2017, 2019).

iii/ Chromatin state inheritance across generations

Globally, there are few studies which indicate that chromatin states can be considered as a full-fledged way of non-genetic heredity (Greer et al., 2015). These studies are strictly limited to model organisms and nothing has been investigated in mollusks to our knowledge. That chromatin states are the vehicle enabling information to cross generations is yet a fundamental condition to conclude about their evolutionary role. In particular, in order for chromatin states to encode transgenerational response to environment, two major issues must be solved: one is the tissue-specificity of chromatin states, the other is chromatin reprogramming. Let us take the hypothetical example of a pollutant that is detoxicated in the gills and has a transgenerational effect whereby offspring of exposed parents have higher detoxification efficiency. The chromatin state in the gills of the exposed parents may be modified by the pollutant, but this modification may be gill-specific; if the offspring show the same gill-specific modification, the information must have been in some way transmitted to germ cells (and ultimately sperm or eggs) and re-expressed during offspring development but only in gills. It is not likely that the modifications are present already in germ cells and then passed on to gills specifically. In mammals for example, DNA methylation marks and histones modifications undergo two phases of reprogramming (one during germ cells fabrication, the other one after fertilisation) during which these marks are erased and then made anew (Morgan et al., 2005). The occurrence of such a phenomenon in mollusks has been poorly investigated yet, but Li et al., 2018 have shown that DNA methylation level is changing during gametogenesis and embryo development of scallop *Patinopecten yessoensis*. Other works performed on oysters have shown that methylation pattern in *P. fucata* is mainly influenced by oocytes (Li et al., 2015) while paternal inheritance of DNA methylation patterns has been suggested in *C. gigas* (Olson & Steven B Roberts, 2014a). The transmission of this information over generations would thus require a transient

support saving it and enabling re-writing it later in the development, in a tissue-specific way. An interesting feature of oyster chromatin proteins in germinal cells is the fact that the majority of histones are replaced by different types of SNBPs or protamines-like proteins but some histones persist and could therefore play a role in epigenetic information inheritance (Galindo et al., 1992; Eirín-López & Ausio, 2009). Furthermore, in the context of tracking the epigenetic effects of environments, it seems crucial to follow the information beyond the observation of epigenetic marks (chromatin states) in one tissue at one stage. In our hypothetical pollutant example, it would be useful to track them both in parental gill, gonad (germ-cell), offspring whole-body larva and offspring adult gill tissue to understand where and when the epigenetic signal is present versus absent versus stored in another form than chromatin states. In some cases, it seems that the erasing is not complete and that some marks escaping from complete reprogramming are transmitted to the next generation (Migicovsky & Kovalchuk, 2011). To understand if these “resistant” bearers have been environmentally-induced and why/how they do not undergo this erasure is a crucial issue.

The benefit of knowing more about epigenetics in molluscs

The questions posed above are quite general and could apply to many under-studied groups, but what benefits can be drawn from more knowledge on epigenetic processes in molluscs specifically? One of the areas where epigenetics may find direct applications is ecotoxicology. A few mollusc species such as *Lymnaea stagnalis* or *Physa acuta* have recently become widely used as sentinels of freshwater pollution. The responses of molecular bearers of epigenetic information to environmental pollutants are rapid, quite easy to assess from wild-caught individuals and, if sufficiently studied and repeatable, may be an interesting alternative to other methods to detect pollution impacts, such as measuring life-history traits or directly dosing pollutants in the animals. This use of epigenetic marks does not require the knowledge of their physiological role, inheritance patterns or adaptive nature. More information on these issues will however be crucial for exploited species such as oysters. Indeed, adaptive epigenetic responses, especially if lasting more than one generation, may help these populations to overcome stresses due to the arrival of new pathogens, or the acidification of seawater – and increase the probability that they have time to adapt genetically. Similarly, more knowledge on epigenetic responses involved in resistance or tolerance to parasites in snail vectors of human parasites such as *Biomphalaria glabrata* (vector of bilharziasis) and Lymnaeids (vectors of fasciolosis) may be invaluable to improve human health in the forthcoming decades.

Acknowledgements: The authors are grateful for advices provided by Christoph Grunau and careful reading provided by Nélia Luviano Aparicio.

Fundings: This work was supported by the Région Languedoc Roussillon and the Fonds Européen de Développement Régional (TRANSGIGAS, Chercheur d’avenir 2015), MF was supported by a PhD grant from the ministère l’Enseignement supérieur et de la Recherche.

References:

- A.D., F. & Q., A. (2014) Mechanisms and management of functional abdominal pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 107, 347–354.
- ADEMA, C.M., HANINGTON, P.C., LUN, C.M., ROSENBERG, G.H., ARAGON, A.D., STOUT, B.A., ET AL. (2010) Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Molecular Immunology*, 47, 849–860.
- ADEREM, A. (2005) Systems biology: Its practice and challenges. *Cell*, 121, 511–513. Elsevier Inc.
- AFGAN, E., BAKER, D., MARIUS, VAN DEN BEEK DANIEL, B., DAVE, B., MARTIN, Č., JOHN, C., ET AL. (2016) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*.
- AGRAWAL A. A. (1998) Induced Responses to Herbivory and Increased Plant Performance. *Science*, 279, 1201–1202.
- AGRAWAL, A. A., LAFORSCH, C. & TOLLRIAN, R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401, 60–63.
- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F.E., FIGUEROA, M.E., MELNICK, A. & MASON, C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*, 13, R87.
- AKCHA, F., BARRANGER, A., BACHERE, E., BERTHELIN, C.H., PIQUEMAL, D., ALONSO, P., ET AL. (2016) Effects of an environmentally relevant concentration of diuron on oyster genitors during gametogenesis: responses of early molecular and cellular markers and physiological impacts. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 8008–8020.
- AKCHA, F., SPAGNOL, C. & ROUXEL, J. (2012) Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106–107, 104–113. Elsevier B.V.
- ALBIG, W., WARTHORST, U., DRABENT, B., PRATS, E., CORNUDELLA, L. & DOENECKE, D. (2003) *Mytilus edulis* core histone genes are organized in two clusters devoid of linker histone genes. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 597–606.
- ALEXANDER, J.M. & LOMVARDAS, S. (2014) Nuclear architecture as an epigenetic regulator of neural development and function. *Neuroscience*, 264, 39–50. IBRO.
- ALIAGA, B., BULLA, I., MOUAHID, G., DUVAL, D. & GRUNAU, C. (2019) Universality of the DNA methylation codes in Eucaryotes. *Scientific Reports*, 9, 1–11.
- ALLEN, J., WEINRICH, M., HOPPITT, W. & RENDELL, L. (2013) Network-Based Diffusion Analysis Reveals Cultural Transmission of Lobtail Feeding in Humpback Whales. *Science*, 340, 485–488.
- ALONSO-MAGDALENA, P., RIVERA, F.J. & GUERRERO-BOSAGNA, C. (2016) Bisphenol-A and metabolic diseases: epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environmental Epigenetics*, 2, 1–10.
- AMBROSI, C., MANZO, M. & BAUBEC, T. (2017) Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, 429, 1459–1475. Elsevier Ltd.
- AMZALLAG, G.N., SELIGMANN, H. & LERNER, H.R. (1993) A developmental window for salt-adaptation in *Sorghum bicolor*. *Journal of Experimental Botany*, 44, 645–652.
- ANDERSON, K. V (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology*, 12, 13–19. Elsevier.
- ANDREWS, S. (2014) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. In <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> p. .
- ANGLES D'AURIAC, M.B., RINDE, E., NORLING, P., LAPEGUE, S., STAALSTRØM, A., HJERMANN, D. & THAULOW, J. (2017) Rapid expansion of the invasive oyster *Crassostrea gigas* at its northern distribution limit in Europe: Naturally dispersed or introduced? *PLoS ONE*, 12, 1–20.
- ARDURA, A., ZAIKO, A., MORAN, P., PLANES, S. & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2017) Epigenetic signatures of invasive status in populations of marine invertebrates. *Scientific Reports*, 7, 42193. Nature Publishing Group.
- ARICAN-GOKTAS, H.D., ITTIPRASERT, W., BRIDGER, J.M. & KNIGHT, M. (2014) Differential Spatial Repositioning of Activated Genes in *Biomphalaria glabrata* Snails Infected with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8.
- ARMBRUSTER, G.F.J., BÖHME, M., BERNHARD, D. & SCHLEGEL, M. (2005) The H3/H4 histone gene

- cluster of land snails (Gastropoda: Stylommatophora): TS/TV Ratio, GC3 drive and signals in stylommatophoran phylogeny. *Journal of Molluscan Studies*, 71, 339–348.
- AUBERT, J.D. & SAUTY, A. (2011) Biologie cellulaire et maladies pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires Actualites*, 3, 2–10.
- AUSIO, J. (1992) Presence of a highly specific histone H1-like protein in the chromatin of the sperm of the bivalve mollusks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 115, 163–172.
- BACHERE, E., GUEGUEN, Y., GONZALEZ, M., DE LORGERIL, J., GARNIER, J. & ROMESTAND, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198, 149–168.
- 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 and Shellfish Immunology*, 46, 50–64.
- BÄCKHED, F., LEY, R.E., SONNENBURG, J.L., PETERSON, D.A. & GORDON, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915–1920.
- BAI, C., WANG, C., XIA, J., SUN, H., ZHANG, S. & HUANG, J. (2015) Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of invertebrate pathology*, 124, 98–106. Elsevier.
- BAINTNER, K. (2007) Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, 153–161.
- BAL, N., KUMAR, A. & NUGEGODA, D. (2017) Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Journal of Hazardous Materials*, 339, 281–291. Elsevier B.V.
- BANTIGNIES, F. & CAVALLI, G. (2011) Polycomb group proteins: Repression in 3D. *Trends in Genetics*, 27, 454–464.
- BAO, N., LYE, K. & BARTON, M.K. (2004) MicroRNA Binding Sites in Arabidopsis Class III HD-ZIP mRNAs Are Required for Methylation of the Template Chromosome, 7, 653–662.
- 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. Elsevier Inc.
- BARNES, P.J. (1990) Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 235–243.
- BARRANGER, A., AKCHA, F., ROUXEL, J., BRIZARD, R., MAUROUARD, E., PALLUD, M., ET AL. (2014) Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology*, 146, 93–104. Elsevier B.V.
- BARTH, T.K. & IMHOF, A. (2010) Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 618–626. Elsevier Ltd.
- BARTOLOMEI, M.S. & FERGUSON-SMITH, A.C. (2011) Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–17.
- BAULCOMBE, D.C. & DEAN, C. (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6.
- BAZZAZ, F.A., CHIARIELLO, N.R., COLEY, P.D. & PITELKA, L.F. (2009) Allocating Resources to Reproduction and Defense. *BioScience*, 37, 58–67.
- BEAMAN, J.E., WHITE, C.R. & SEEBACHER, F. (2016) Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. *Trends in Ecology and Evolution*, 31, 237–249. Elsevier Ltd.
- BEARFIELD, C., DAVENPORT, E.S., SIVAPATHASUNDARAM, V. & ALLAKER, R.P. (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109, 527–533.
- BEATY, L.E., WORMINGTON, J.D., KENSINGER, B.J., BAYLEY, K.N., GOEPPNER, S.R., GUSTAFSON, K.D. & LUTTBEG, B. (2016) Shaped by the past, acting in the present: transgenerational plasticity of anti-predatory traits. *Oikos*, 125, 1570–1576.
- BEAZ-HIDALGO, R., BALBOA, S., ROMALDE, J.L. & FIGUERAS, M.J. (2010) Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 34–43.
- BELLARD, C., BERTELSMEIER, C., LEADLEY, P., THULLER, W. & COURCHAMP, F. (2012) Impacts of

- climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15, 365–377.
- BENTLEY, G.A., LEWIT-BENTLEY, A., FINCH, J.T., PODJARNY, A.D. & ROTH, M. (1984) Crystal structure of the nucleosome core particle at 16 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 176, 55–75.
- BERTINI, I., MANGANL, S. & VIEZZOLI, M.S. (1998) Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. In *Advances in inorganic chemistry* pp. 127–250. Elsevier.
- BESNARD-COCHENNEC, N. (2001) Bonamia ostreae, parasite de l’huître plate, Ostrea edulis: sa position taxonomique parmi les parasites du groupe ‘microcell’, analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d’huîtres plates. Université de La Rochelle.
- BEWICK, A.J., VOGEL, K.J., MOORE, A.J. & SCHMITZ, R.J. (2017) Evolution of DNA methylation across insects. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 654–665.
- BHUTANI, N., BURNS, D.M. & BLAU, H.M. (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell*, 146, 866–872. Elsevier Inc.
- BIGGAR, K.K., KORNFELD, S.F., MAISTROVSKI, Y. & STOREY, K.B. (2012) MicroRNA Regulation in Extreme Environments: Differential Expression of MicroRNAs in the Intertidal Snail Littorina littorea During Extended Periods of Freezing and Anoxia. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 10, 302–309. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China.
- BIRD, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209–211.
- BOITARD, S., KOFLER, R., FRANÇOISE, P., ROBELIN, D., SCHLÖTTERER, C. & FUTSCHIK, A. (2013) Pool-hmm: A Python program for estimating the allele frequency spectrum and detecting selective sweeps from next generation sequencing of pooled samples. *Molecular Ecology Resources*, 13, 337–340.
- BONDURIANSKY, R. (2012) Rethinking heredity, again. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 330–336.
- BONDURIANSKY, R. & DAY, T. (2009) Nongenetic Inheritance and Its Evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. .
- BONDURIANSKY, R. & DAY, T. (2018) Extended heredity: a new understanding of inheritance and evolution. Princeton University Press.
- BONHOMME, M., CHEVALET, C., SERVIN, B., BOITARD, S., ABDALLAH, J., BLOTT, S. & SANCRISTOBAL, M. (2010) Detecting selection in population trees: The Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics*, 186, 241–262.
- BONNER, J.T. (2018) The evolution of culture in animals. Princeton University Press.
- BORGEL, J., GUIBERT, S., LI, Y., CHIBA, H., SCHÜBELER, D., SASAKI, H., ET AL. (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics*, 42, 1093–1100. Nature Publishing Group.
- BOUCHUT, A., SAUTIERE, P.E., COUSTAU, C. & MITTA, G. (2006) Compatibility in the Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Tropica*, 98, 234–246.
- BOUILLY, K., BONNARD, M., GAGNAIRE, B., RENAULT, T. & LAPEGUE, S. (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 58–63.
- BOUILLY, K., CHAVES, R., FERNANDES, M. & GUEDES-PINTO, H. (2010) Histone H3 gene in the Pacific oyster, Crassostrea gigas Thunberg, 1793: Molecular and cytogenetic characterisations. *Comparative Cytogenetics*, 4, 111–121.
- BOUILLY, K., CHAVES, R., LEITAO, A, BENABDELMOUNA, A & GUEDES-PINTO, H. (2008) Chromosomal organization of simple sequence repeats in chromosome patterns. *Journal of Genetics*, 87, 119–125.
- BOURC’HIS, D. & BESTOR, T.H. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431, 96–99.
- BOUTROS, M., AGAISSE, H. & PERRIMON, N. (2002) Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in Drosophila signaling pathways are activated upon microbial infection. In response to gram-positive and fungal infection, Toll triggers a transcriptional response through the. *Developmental Cell*, 3, 711–722.
- BOWMAN, J.C. (1972) GENOTYPE x ENVIRONMENT INTERACTIONS, 1.
- BOYKO, A., BLEVINS, T., YAO, Y., GOLUBOV, A., BILICHAK, A., ILNYTSKY, Y., ET AL. (2010)

- Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5.
- BRADSHAW, W.E. & HOLZAPFEL, C.M. (2001) Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14509–14511.
- BRADSHAW, W.E. & HOLZAPFEL, C.M. (2007) Evolution of Animal Photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 1–25.
- BRADSHAW, W.E., QUEBODEAUX, M.C. & HOLZAPFEL, C.M. (2003) Circadian rhythmicity and photoperiodism in the pitcher-plant mosquito: Adaptive response to the photic environment or correlated response to the seasonal environment? *American Naturalist*, 161, 735–748.
- BRANDT, C. (2008) Clones, Pure Lines, and Heredity: The Work of Victor Jollos. In *Heredity in the century of the gene (A cultural History of heredity IV)* pp. 139–148.
- BRINKMAN, A.B., GU, H., BARTELS, S.J.J., ZHANG, Y., MATARESE, F., SIMMER, F., ET AL. (2012) Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Research*, 22, 1128–1138.
- BROGDEN, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238–250.
- BRUNK, C.F. & MARTIN, W.F. (2019) Archaeal Histone Contributions to the Origin of Eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 27, 703–714. The Author(s).
- BRUTO, M., JAMES, A., PETTON, B., LABREUCHE, Y., CHENIVESSE, S., ALUNNO-BRUSCIA, M., ET AL. (2017) *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME Journal*, 11, 1043–1052.
- BUDDINGTON, R.K., WILLIAMS, C.H., KOSTEK, B.M., BUDDINGTON, K.K. & KULLEN, M.J. (2010) Maternal-to-infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97, 250–256.
- BUHLER, M., VERDEL, A. & MOAZED, D. (2006) Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin- Dependent Gene Silencing. *Cell*, 873–886.
- BUISSON, S., BOUCHARTE, V., GUERLET, E., MALAS, J.P. & COSTIL, K. (2008) Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43, 655–664.
- BULET, P., STÖCKLIN, R. & MENIN, L. (2004) Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 169–184.
- BURTON, T. & METCALFE, N.B. (2014) Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.
- CALARCO, J.P., BORGES, F., DONOGHUE, M.T.A., VAN EX, F., JULLIEN, P.E., LOPES, T., ET AL. (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell*, 151, 194–205.
- CALOSI, P., DE WIT, P., THOR, P. & DUPONT, S. (2016) Will life find a way? Evolution of marine species under global change. *Evolutionary Applications*, 9, 1035–1042.
- CANESI, L., GALLO, G., GAVIOLI, M. & PRUZZO, C. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57, 469–476.
- CANTONE, I. & FISHER, A.G. (2013) Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology*, 20, 282–289. Nature Publishing Group.
- CAO, J. & YAN, Q. (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in Oncology*, 2, 1–9.
- LE CAO, K.-A., ROHART, F., GONZALEZ, I. & LE CAO, M.K.-A. (2018) Package ‘mixOmics’.
- CAQUET, T., ROUCAUTE, M., MAZZELLA, N., DELMAS, F., MADIGOU, C., FARCY, E., ET AL. (2013) Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 651–666.
- CARSON, W.F., CAVASSANI, K.A., DOU, Y. & KUNKEL, S.L. (2011) Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*, 6, 273–283.
- CEBALLOS, G., GARCIA, A. & EHRLICH, P.R. (2010) The Sixth Extinction Crisis Loss of Animal Populations and Species. *Journal of Cosmology*, 8, 1821–1831.
- CEDAR, H. & BERGMAN, Y. (2012) Programming of DNA Methylation Patterns. *Annual Review of*

- Biochemistry*, 81, 97–117.
- CHAMPAGNE, F.A. (2008) Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 386–397.
- CHAPIN, F.S., ZAVALA, E.S., EVINER, V.T., NAYLOR, R.L., VITOUSEK, P.M., REYNOLDS, H.L., ET AL. (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405, 234–242.
- CHEN, Q.Q., YAN, M., CAO, Z., LI, X., ZHANG, Y.Y., SHI, J., ET AL. (2015) Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 7977.
- CHEN, S., CAI, D., PEARCE, K., SUN, P.Y.W., ROBERTS, A.C. & GLANZMAN, D.L. (2014) Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *eLife*, 3, 1–21.
- CHENG, S.-C., QUINTIN, J., CRAMER, R.A., SHEPARDSON, K.M., SAEED, S., KUMAR, V., ET AL. (2014) mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345, 1250684. American Association for the Advancement of Science.
- CHERRY, J.L. (2018) Methylation-induced hypermutation in natural populations of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 200.
- CHEVIN, L.M. & LANDE, R. (2015) Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity. *Evolution*, 69, 2767–2775.
- CHINNUSAMY, V. & ZHU, J.K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 133–139.
- CHUANG, J.C., JONES, P.A., C, M.B.J.C., NORRIS, U.S.C. & CANCER, C. (2007) Epigenetics and MicroRNAs. *PEDIATRIC RESEARCH*, 61, 24–29.
- CIABRELLI, F., COMOGLIO, F., FELLOUS, S., BONEV, B., NINOVA, M., SZABO, Q., ET AL. (2017) Stable Polycomb-dependent transgenerational inheritance of chromatin states in *Drosophila*. *Nature Genetics*, 49, 876–886.
- CLERISSI, C., LORGERIL, J. DE, PETTON, B., LUCASSON, A., ESCOUBAS, J.-M., GUEGUEN, Y., ET AL. (2018) Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *bioRxiv*, 378125.
- COLLADO, M.C., BÄUERL, C. & PEREZ-MARTINEZ, G. (2012) Defining microbiota for developing new probiotics. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 23.
- COLLOTTA, M., BERTAZZI, P.A. & BOLLATI, V. (2013) Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35–41. Elsevier.
- COMPS, M. & DUTHOIT, J.-L. (1976) Infection virale associée à la ‘maladie des branchies’ de l’huître portugaise *Crassostrea angulata* LmK. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris*, 283, 1595–1597.
- COOPER, D.N. & YOUSOUFIAN, H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics*, 78, 151–155.
- COSSEAU, C., AZZI, A., SMITH, K., FREITAG, M., MITTA, G. & GRUNAU, C. (2009) Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 166, 70–76.
- COSSEAU, C., WOLKENHAUER, O., PADALINO, G., GEYER, K.K., HOFFMANN, K.F. & GRUNAU, C. (2017) (Epi)genetic Inheritance in *Schistosoma mansoni*: A Systems Approach. *Trends in Parasitology*, 33, 285–294.
- COSTELLO, J.F., FRÜHWALD, M.C., SMIRAGLIA, D.J., RUSH, L.J., ROBERTSON, G.P., GAO, X., ET AL. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*, 24, 132–138.
- CREAN, A.J. & BONDURIANSKY, R. (2014) What is a paternal effect? Elsevier Ltd. *Trends in Ecology and Evolution*. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.009](http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.009).
- CREMER, C., MÜNKEL, C., GRANZOW, M., JAUCH, A., DIETZEL, S., EILS, R., ET AL. (1996) Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 366, 97–116. Elsevier.
- CREMER, T. & CREMER, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature*, 2, 292–303.
- CREMER, T., CREMER, M., DIETZEL, S., MU, S., SOLOVEI, I. & FAKAN, S. (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Cell Biology*, 307–316.
- DANCHIN, É., CHARMANTIER, A., CHAMPAGNE, F.A., MESOUDI, A., PUJOL, B. & BLANCHET, S. (2011)

- Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nature reviews. Genetics*, 12, 475–486.
- DANCHIN, É. & WAGNER, R.H. (2010) Inclusive heritability: Combining genetic and non-genetic information to study animal behavior and culture. *Oikos*, 119, 210–218.
- DANILOVA, A.B. & GRINKEVICH, L.N. (2012) Failure of long-term memory formation in juvenile snails is determined by acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. *PLoS ONE*, 7.
- DANILOVA, A.B., KHARCHENKO, O.A., SHEVCHENKO, K.G. & GRINKEVICH, L.N. (2010) Histone H3 Acetylation is Asymmetrically Induced Upon Learning in Identified Neurons of the Food Aversion Network in the Mollusk *Helix Lucorum*. *Frontiers in Behavioral neuroscience*, 4, 1–7.
- DARNELL, J.E., KERR, I.M. & STARK, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415–1421.
- DARWIN, C. (1859) On the origins of species by means of natural selection. *London: Murray*, 1–313.
- DAXINGER, L. & WHITELAW, E. (2012) Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 13, 153–162. Nature Publishing Group.
- DAY, T. & BONDURIANSKY, R. (2011) A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance. *The American Naturalist*, 178, 18–36.
- DELANDRE, C. & MARSHALL, O.J. (2019) United colours of chromatin? Developmental genome organisation in flies. *Biochemical Society Transactions*, 47, 691–700.
- DEMARTINO, G., UBOM, R., PROBES, M. & INFORMATION, S. (2002) letters to nature. *Nature*, 419, 407–411.
- DESRIAC, F., LE CHEVALIER, P., BRILLET, B., LEGUERINEL, I., THULLIER, 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.
- DIAS, B.G. & RESSLER, K.J. (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature neuroscience*, 17, 89–96.
- DIAZ-FREIJE, E., GESTAL, C., CASTELLANOS-MARTINEZ, S. & MORAN, P. (2014) The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. *Frontiers in Physiology*, 5, 1–7.
- DIAZ, S., FARGIONE, J., CHAPIN, F.S. & TILMAN, D. (2006) Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biology*. .
- DICKINS, T.E. & RAHMAN, Q. (2012) The extended evolutionary synthesis and the role of soft inheritance in evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20120273. The Royal Society.
- DOBIN, A., DAVIS, C.A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., ET AL. (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15–21.
- DOMAZET-LOSO, T. & TAUTZ, D. (2008) An ancient evolutionary origin of genes associated with human genetic diseases. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 2699–2707.
- 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, 1–10.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2015) Parental effects enhance risk tolerance and performance in offspring. *Ecology*, 96, 2049–2055.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2018) Parental and embryonic experiences with predation risk affect prey offspring behaviour and performance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2018) Synergistic effects of parental and embryonic exposure to predation risk on prey offspring size at emergence. *Ecology*, 99, 68–78.
- DONELSON, J.M., SALINAS, S., MUNDAY, P.L. & SHAMA, L.N.S. (2018) Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here? *Global Change Biology*, 24, 13–34.
- DONEY, S.C., RUCKELSHAUS, M., DUFFY, J.E., BARRY, J.P., CHAN, F., ENGLISH, C.A., ET AL. (2012) Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annu Rev Mar Sci*, 4, 11–37.
- DONOHUE, D.R. & BULTMAN, S.J. (2012) Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 227, 3169–3177.

- DÖRING, H.P. & STARLINGER, P. (1984) Barbara McClintock's controlling elements: Now at the DNA level. *Cell*, 39, 253–259.
- DOSKOCIL, J. & ŠORMOVA, Z. (1965) The occurrence of 5-methylcytosine in bacterial deoxyribonucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 95, 513–515.
- DOUDNA, J.A. & CHARPENTIER, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346.
- DRABENT, B., KIM, J.-S., ALBIG, W., PRATS, E., CORNUDELLA, L. & DOENECKE, D. (1999) *Mytilus edulis* histone gene clusters containing only H1 genes. *J. Mol. Evol.*, 49, 645–655.
- DUGAS, M.B. (2015) Commentary: Parental care and the proximate links between maternal effects and offspring fitness. *Oecologia*, 177, 1089–1092.
- DUNN, D.B. & SMITH, J.D. (1958) The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochemical Journal*, 68, 627–636.
- DUPERTHUY, M., SCHMITT, P., GARZON, E., CARO, A., ROSA, R.D., LE ROUX, F., ET AL. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2993–2998.
- DZIBA, L., ERPUL, G., FAZEL, A., FISCHER, M. & HERNANDEZ, A.M. (2019) Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services - ADVANCE UNEDITED VERSION – assessment Key messages.
- ECKEL, R.H., GRUNDY, S.M. & ZIMMET, P.Z. (2005) The Metabolic Syndrome. *Genomic and Precision Medicine: Primary Care: Third Edition*, 365, 283–299.
- EHRlich, M., GAMA-SOSA, M.A., CARREIRA, L.H., LJUNGDAHL, L.G., KUO, K.C. & GEHRKE, C.W. (1985) DNA methylation in thermophilic bacteria: N 4 -methylcytosine, 5-methylcytosine, and N 5 methyladenine . *Nucleic Acids Research*, 13, 1399–1412.
- EHRlich, M., WILSON, G.G., KUO, K.C. & GEHRKE, C.W. (1987) N4-Methylcytosine as a Minor Base in Bacterial DNA. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 169, 939–943.
- EIRIN-LOPEZ, J.M. & AUSIO, J. (2009) Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *BioEssays*, 31, 1062–1070.
- EIRIN-LOPEZ, J.M., GONZALEZ-TIZON, A.M., MARTINEZ, A. & MENDEZ, J. (2002) Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus* spp.): Possible evidence of an 'orphan origin' for H1 histone genes. *Journal of Molecular Evolution*, 55, 272–283.
- EIRIN-LOPEZ, J.M. & PUTNAM, H.M. (2018) Marine Environmental Epigenetics. *Annual Review of Marine Science*, 11, 335–368.
- EIRIN-LOPEZ, J.M., RUIZ, M.F., GONZELEZ-TIZON, A.M., MARTINEZ, A., SANCHEZ, L. & MENDEZ, J. (2004) Molecular Evolutionary Characterization of the Mussel *Mytilus* Histone Multigene Family: First Record of a Tandemly Repeated Unit of Five Histone Genes Containing an H1 Subtype with 'Orphan' Features. *Journal of Molecular Evolution*, 58, 131–144.
- EISENBERG, E. & LEVANON, E.Y. (2003) Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics*, 19, 362–365.
- ENGLISH, S., PEN, I., SHEA, N. & ULLER, T. (2015) The information value of non-genetic inheritance in plants and animals. *PLoS ONE*, 10.
- ENRIQUEZ-DIAZ, M., POUVREAU, S., CHAVEZ-VILLALBA, J. & LE PENNEC, M. (2009) Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17, 491–506.
- 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, 293–298.
- ESCUDE, F., AUER, L., BERNARD, M., MARIADASSOU, M., CAUQUIL, L., VIDAL, K., ET AL. (2017) FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34, 1287–1294. Oxford University Press.
- EXTAVOUR, C.G. (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130, 5869–5884.
- FABIoux, C. (2004) Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Université de Bretagne occidentale - Brest.
- FABIoux, C., HUVET, A., LELONG, C., ROBERT, R., POUVREAU, S., DANIEL, J., ET AL. (2004) Oyster

- vasa -like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 592–598.
- FABIOUX, C., HUVET, A., LE SOUCHU, P., LE PENNEC, M. & POUVREAU, S. (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250, 458–470.
- FALCKENHAYN, C., BOERJAN, B., RADDATZ, G., FROHME, M., SCHOOFS, L. & LYKO, F. (2013) Characterization of genome methylation patterns in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 216, 1423–1429.
- FALLET, M. (2015) Master 2 Recherche – Biodiversité , Ecologie et Evolution 2015 Fallet Manon Species delimitation in the *Anomaloglossus baeobatrachus* (Amphibia : Anura : Dendrobatidae) species complex.
- FARIAS, N.D., DE OLIVEIRA, N.F.P. & DA SILVA, P.M. (2017) Perkinsus infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 76–81. Elsevier.
- FARIELLO, M.I., BOITARD, S., NAYA, H., SANCRISTOBAL, M. & SERVIN, B. (2013) Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*, 193, 929–941.
- FAULK, C. & DOLINOY, D.C. (2011) Timing is everything The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals, 791–797.
- FAWCETT, T.W. & FRANKENHUIS, W.E. (2015) Adaptive explanations for sensitive windows in development. *Frontiers in Zoology*, 12, 1–14.
- FEDOROFF, N. V. (2012) Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*, 338, 758–767.
- FELLOUS, A., FAVREL, P., GUO, X. & RIVIERE, G. (2014) The Jumonji gene family in *Crassostrea gigas* suggests evolutionary conservation of Jmj-C histone demethylases orthologues in the oyster gametogenesis and development. *Gene*, 538, 164–175. Elsevier B.V.
- FELLOUS, A., FAVREL, P. & RIVIERE, G. (2015) Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 19, 23–30. Elsevier B.V.
- FELLOUS, A., LEFRANC, L., JOUAUX, A., GOUX, D., FAVREL, P. & RIVIERE, G. (2019) Histone Methylation Participates in Gene Expression Control during the Early Development of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genes*, 10, 695.
- FENG, S., COKUS, S.J., ZHANG, X., CHEN, P.-Y., BOSTICK, M., GOLL, M.G., ET AL. (2010) Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8689–8694.
- FERREE, P.M., FRYDMAN, H.M., LI, J.M., CAO, J., WIESCHAUS, E. & SULLIVAN, W. (2005) Wolbachia utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* Oocyte. *PLoS Pathogens*, 1, 0111–0124.
- FIDDER, B.N., REATEGUI-ZIRENA, E.G., OLSON, A.D. & SALICE, C.J. (2016) Energetic endpoints provide early indicators of life history effects in a freshwater gastropod exposed to the fungicide , pyraclostrobin. *Environmental Pollution*, 211, 183–190.
- FILION, G.J., BEMMEL, J.G. VAN, BRAUNSCHWEIG, U., TALHOUT, W., KIND, J., WARD, L.D., ET AL. (2011) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*, 143, 212–224.
- FITZER, S.C., PHOENIX, V.R., CUSACK, M. & KAMENOS, N.A. (2014) Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation. *Scientific reports*.
- FLORES, K.B., WOLSCHIN, F. & AMDAM, G. V. (2013) The role of methylation of DNA in environmental adaptation. In *Integrative and Comparative Biology* p. .
- FNEICH, S., DHEILLY, N., ADEMA, C., ROGNON, A., REICHEL, M., BULLA, J., ET AL. (2013) 5-methylcytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors*, 6, 167.
- FOO, S.A. & BYRNE, M. (2016) Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. In *Advances in Marine Biology* p. , 1st edition. Elsevier Ltd.
- FOOTE, A., VIJAY, N., AVILA-ARCOS, M., BAIRD, R., DURBAN, J., MORIN, P., ET AL. (2016) Genome-culture coevolution promotes rapid divergence in the killer whale. *bioRxiv*, 1–48.
- FORET, S., KUCHARSKI, R. & PELLEGRINI, M. (2012) DNA methylation dynamics, metabolic fluxes,

- gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the ...*, 109, 4968–4973.
- FREEMAN, J.L., PERRY, G.H., FEUK, L., REDON, R., MCCARROLL, S.A., ALTSHULER, D.M., ET AL. (2006) Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16, 949–961.
- FUSCO, G. & MINELLI, A. (2010) Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts, 547–556.
- FYODOROV, D. V, ZHOU, B., SKOULTCHI, A.I. & BAI, Y. (2017) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Publishing Group*, 19, 192–206. Nature Publishing Group.
- GAGNAIRE, B., GAY, M., HUVET, A., DANIEL, J.Y., SAULNIER, D. & RENAULT, T. (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, 84, 92–102.
- GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H., BURGEOT, T. & RENAULT, T. (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 22, 1–14.
- GALINDO-VILLEGAS, J., GARCIA-MORENO, D., OLIVEIRA, D., MESEGUER, J. & MULERO, V. (2012) Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebra fish development, 109.
- GALINDO, M., RODRIGUEZ, H. & OLIVARES, C. (1992) Sperm basic nuclear proteins in the bivalve mollusc *Mesodesma donacium*: Characterization and comparison with histone-like and protamine-like proteins of other molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 102, 947–952.
- GALLOWAY, L.F. (2004) Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist*, 166, 93–100.
- GALLOWAY, L.F. & ETTERTSON, J.R. (2007) Transgenerational plasticity is adaptive in the wild. *Science (New York, N.Y.)*, 318, 1134–1136.
- GARCIA-FERNANDEZ, P., GARCIA-SOUTO, D., ALMANSA, E., MORAN, P. & GESTAL, C. (2017) Epigenetic DNA Methylation Mediating Octopus vulgaris Early Development: Effect of Essential Fatty Acids Enriched Diet. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–9.
- GARDNER, K.E., ALLIS, C.D. & STRAHL, B.D. (2011) Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *Journal of Molecular Biology*, 409, 36–46. Elsevier Ltd.
- 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, 358–365.
- GAVERY, M.R. & ROBERTS, S.B. (2010) DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics*, 11.
- GAVERY, M.R. & ROBERTS, S.B. (2013) Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ*, 1, e215. PeerJ Inc.
- GAY, M., BERTHE, F.C.J. & LE ROUX, F. (2004) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59, 49–56.
- GAY, M., RENAULT, T., PONS, A.M. & LE ROUX, F. (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 65–74.
- GAYDOS, L.J., WANG, W. & STROME, S. (2014) H3K27me and PRC2 transmit a memory of repression across generations and during development, 345, 1515–1518.
- GE, Z.-J., ZHANG, C.-L., SCHATTEN, H. & SUN, Q.-Y. (2014) Maternal diabetes mellitus and the origin of non-communicable diseases in offspring: the role of epigenetics. *Biology of reproduction*, 90, 139.
- GENDREL, A.V., LIPPMAN, Z., YORDAN, C., COLOT, V. & MARTIENSSEN, R.A. (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science*, 297, 1871–1873.
- GERET, F., BURGEOT, T., HAURE, J., GAGNAIRE, B., RENAULT, T., COMMUNAL, P.Y. & SAMAIN, J.F. (2011) Effects of Low-Dose Exposure to Pesticide Mixture on Physiological Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology*, 26, 146–152.

- GEYER, K.K., NIAZI, U.H., DUVAL, D., COSSEAU, C., TOMLINSON, C., CHALMERS, I.W., ET AL. (2017) The *Biomphalaria glabrata* DNA methylation machinery displays spatial tissue expression, is differentially active in distinct snail populations and is modulated by interactions with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, 1–29.
- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., GASPARINI, M., SERRANO, D., DEL PIERO, D., THORNE, A.W., ET AL. (1983) Proteins from the sperm of the bivalve mollusc *Ensis minor* Co-existence of histones and a protamine-like protein. *European Journal of Biochemistry*, 136, 509–516.
- GIENAPP, P., TEPLITSKY, C., ALHO, J.S., MILLS, J.A. & MERILÄ, J. (2008) Climate change and evolution : disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, 17, 167–178.
- GILBERT, S.F. (2005) Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: ecological aspects of animal development. *Journal of biosciences*, 30, 65–74.
- GLOBISCH, D., MÜNZEL, M., MÜLLER, M., MICHALAKIS, S., WAGNER, M., KOCH, S., ET AL. (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE*, 5, 1–9.
- GODFREY-SMITH, P. (2009) Darwinian populations and natural selection. Oxford University Press.
- GOECKS, J., NEKRUTENKO, A., TAYLOR, J., AFGAN, E., ANANDA, G., BAKER, D., ET AL. (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology*, 11.
- GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., ROTLLANT, G., PEINADO, L., ROMALDE, J.L., DOCE, A., ET AL. (2011) *Photobacterium swingsii* sp. nov., isolated from marine organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 315–319.
- GONZALEZ-CASTILLO, A., BALBOA, S., ROMALDE, J., & GOMEZ-GIL, B. (2014) *Vibrio crosaei* sp. nov., isolated from a cultured oyster *Crassostrea gigas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- GONZALEZ-ROMERO, R., RIVERA-CASAS, C., FERNANDEZ-TAJES, J., AUSIO, J., MENDEZ, J. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2012) Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of Okadaic Acid genotoxicity in the marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155, 175–181.
- GONZALEZ-ROMERO, R., SUAREZ-ULLOA, V., RODRIGUEZ-CASARIEGO, J., GARCIA-SOUTO, D., DIAZ, G., SMITH, A., ET AL. (2017) Effects of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Aquatic Toxicology*, 186, 196–204. Elsevier B.V.
- GONZALEZ, M., ROMESTAND, B., FIEVET, J., HUVET, A., LEBART, M.C., GUEGUEN, Y. & BACHERE, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 1089–1097.
- GOODRICH, J., WATERS, J., POOLE, A., SUTTER, J., KOREN, O., BLEKHMANN, R., ET AL. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159, 789–799.
- 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, 21–40.
- GRANT, B.R. & GRANT, P.R. (1996) Cultural Inheritance of Song and Its Role in the Evolution of Darwin's Finches. *Evolution*, 50, 2471.
- GRAY, Y.H.M. (2000) It takes two transposons to tango transposable-element-mediated chromosomal rearrangements, 9525, 571–573.
- GREEN, T.J., HELBIG, K., SPECK, P. & RAFTOS, D.A. (2016) Primed for success : Oyster parents treated with poly (I : C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology*, 78, 113–120. Elsevier Ltd.
- GREEN, T.J., HELBIG, K., SPECK, P. & RAFTOS, D.A. (2016) Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology*, 78, 113–120. Elsevier Ltd.
- 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 μ var). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 382–388.
- 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*

- and Shellfish Immunology*, 36, 151–157.
- GREEN, T.J., RAFTOS, D., SPECK, P. & MONTAGNANI, C. (2015) Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology*, 96, 2471–2482.
- 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. Elsevier B.V.
- GREER, E.L., BLANCO, M.A., GU, L., SENDINC, E., LIU, J., ARISTIZABAL-CORRALES, D., ET AL. (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161, 868–878.
- GRENTZINGER, T., ARMENISE, C., BRUN, C., MUGAT, B., SERRANO, V., PELISSON, A. & CHAMBEYRON, S. (2012) PiRNA-mediated transgenerational inheritance of an acquired trait. *Genome Research*, 22, 1877–1888.
- GRIFFITH, A.W. & GOBLER, C.J. (2017) Transgenerational exposure of North Atlantic bivalves to ocean acidification renders offspring more vulnerable to low pH and additional stressors. *Scientific Reports*, 1–11. Springer US.
- GRINKEVICH, L.N. (2014) Studies of histone H3 methylation during the formation of long-term memory. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 44, 571–575.
- GRIZEL, H. & HERAL, M. (1991) Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science*, 47, 388–403.
- GU, T.P., GUO, F., YANG, H., WU, H.P., XU, G.F., LIU, W., ET AL. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477, 606–612.
- GUAN, Z., GIUSTETTO, M., LOMVARDAS, S., KIM, J.H., MINIACI, M.C., SCHWARTZ, J.H., ET AL. (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, 111, 483–493.
- GUARALDI, F. & SALVATORI, G. (2012) Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 1–4.
- GUETG, C. & SANTORO, R. (2012) Formation of nuclear heterochromatin Claudio. *Epigenetics*, 7:8, 811–814.
- GUO, S. & KEMPHUES, K.J. (1995) par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser / Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed, 61.
- GUO, X., HE, Y., ZHANG, L., LELONG, C. & JOUAUX, A. (2015) Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish and Shellfish Immunology*, 46, 107–119. Elsevier Ltd.
- GURDON, J. (2009) Nuclear reprogramming in eggs. *Nature Medicine*, 15, 1141–1144.
- GURDON, J.B., LASKEY, R.A. & REEVES, O.R. (1975) The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34, 93–112.
- GUT, P. & VERDIN, E. (2013) The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*, 502, 489–498.
- HADA, H.S., WEST, P.A. & LEE, J. V. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 1–4.
- HADLEY WICKHAM, R.F., HENRY, L. & MÜLLER, K. (2017) dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.7. 4.
- HAIG, D. (2007) Weismann Rules! OK? Epigenetics and the Lamarckian temptation. *Biology and Philosophy*, 22, 415–428.
- HALDANE, J.B.S. (1946) THE INTERACTION OF NATURE AND NURTURE.
- HAMMILL, E., ROGERS, A. & BECKERMAN, A.P. (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: A case study with *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 705–715.
- HAN, Y.W., REDLINE, R.W., LI, M., YIN, L., HILL, G.B. & MCCORMICK, T.S. (2004) *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection and immunity*, 72, 2272–2279. Am Soc Microbiol.
- HARLEY, H. & RITTER, E. (2002) Structuring the bundle: a universal morphosyntactic feature geometry. In *Pronouns - Grammar and Representation* pp. 23–39.
- HART, A.K., FIORAVANTE, D., LIU, R.-Y., PHARES, G.A., CLEARY, L.J. & BYRNE, J.H. (2011) Serotonin-Mediated Synapsin Expression Is Necessary for Long-Term Facilitation of the *Aplysia* Sensorimotor Synapse. *Journal of Neuroscience*, 31, 18401–18411.
- HEAD, J.A. (2014) Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective.

- Integrative and Comparative Biology*, 54, 77–86.
- HEARD, E. & MARTIENSSEN, R.A. (2014) Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell*, 157, 95–109. Elsevier Inc.
- HEINTZMAN, N.D., STUART, R.K., HON, G., FU, Y., CHING, C.W., HAWKINS, R.D., ET AL. (2007) Neurogenesis and angiogenesis inhibitors Targeted arthritis therapy? Reawakening the gatekeepers Predicting genomic enhancers, 25, 2007.
- HENSON, S.A., BEAULIEU, C., ILYINA, T., JOHN, J.G., LONG, M., SEFERIAN, R., ET AL. (2017) Rapid emergence of climate change in environmental drivers of marine ecosystems. *Nature Communications*, 8, 14682.
- HERB, B.R., WOLSCHIN, F., HANSEN, K.D., ARYEE, M.J., LANGMEAD, B., IRIZARRY, R., ET AL. (2012) Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nature neuroscience*, 15, 1371. Nature Publishing Group.
- HERMAN, J.J. & SULTAN, S.E. (2016) DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160988.
- HEWITT, J.E., ELLIS, J.I. & THRUSH, S.F. (2016) Multiple stressors, nonlinear effects and the implications of climate change impacts on marine coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 22, 2665–2675.
- HINE, P., WESNEY, B. & HAY, B. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 135–142.
- HOEGH-GULDBERG, O. & BRUNO, J.F. (2010) The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science*, 328, 467–484.
- VAN HOLDE, K.E. (1988) Chromatin. In *Springer Series in Molecular Biology* (ed A. Rich), p. 491.
- HOLESKI, L.M., JANDER, G. & AGRAWAL, A.A. (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 618–626. Elsevier Ltd.
- HOLLIDAY, R. (1991) Mutations and epimutations in mammalian cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 250, 351–363.
- HOLLIDAY, R. & PUGH, J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, 187, 226–232.
- HOLLIDAY, R., P.J. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226–232.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D.R. & MACPHERSON, A.J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268–1273.
- HORNER, V., PROCTOR, D., BONNIE, K.E., WHITEN, A. & DE WAAL, F.B.M. (2010) Prestige affects cultural learning in chimpanzees. *PLoS ONE*, 5, 1–5.
- HOSOKAWA, T., HIRONAKA, M., MUKAI, H., INADOMI, K., SUZUKI, N. & FUKATSU, T. (2012) Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal Behaviour*, 83, 293–300.
- HUGHES, V. (2014) Epigenetics: The sins of the father. *Nature*, 507, 22–24.
- HUOVINEN, M., LOIKKANEN, J., NAARALA, J. & VÄHÄKANGAS, K. (2015) Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 29, 1577–1586. Elsevier Ltd.
- HUVET, A., HERPIN, A., DEGREMONT, L., LABREUCHE, Y., SAMAIN, J.F. & CUNNINGHAM, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211–220.
- HUXLEY, J. (1942) Evolution -The Modern Synthesis. In *George Allen & Unwin* p. . London: George Alien & Unwin Ltd.
- IFRIM, D.C., QUINTIN, J., JOOSTEN, L.A.B., JACOBS, C., JANSEN, T., JACOBS, L., ET AL. (2014) Trained immunity or tolerance: Opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21, 534–545.
- ITTIPTASERT, W., MILLER, A., KNIGHT, M., TUCKER, M. & HSIEH, M.H. (2015) Evaluation of cytosine DNA methylation of the *Biomphalaria glabrata* at shock protein 70 locus after biological and physiological stresses. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 7, 182–193.
- IYER, L.M., ZHANG, D. & ARAVIND, L. (2015) Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays*,

27–40.

- JABLONKA, E., LACHMANN, M. & LAMB, M.J. (1992) Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *Journal of Theoretical Biology*, 158, 245–268.
- JABLONKA, E. & LAMB, M. (2011) Changing thought styles: the concept of soft inheritance in the 20th century. *Collegium Helveticum*, 12, 119–156.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (1998) Epigenetic inheritance in evolution, 11, 159–183.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (1998) Epigenetic inheritance in evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 159–183.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (2008) Soft inheritance: Challenging the modern synthesis. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 389–395.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (2014) Evolution in four dimensions, revised edition: Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. MIT press.
- JABLONKA, E. & NOBLE, D. (2019) Systemic integration of different inheritance systems. Elsevier Ltd. *Current Opinion in Systems Biology*. .
- JEFFRIES, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29, 201–226.
- JELTSCH, A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*, 3, 274–293.
- JENKINS, C., HICK, P., GABOR, M., SPIERS, Z., FELL, S.A., GU, X., ET AL. (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 109–126.
- Ji, C., LU, Z., XU, L., LI, F., CONG, M., SHAN, X. & WU, H. (2019) Evaluation of mitochondrial toxicity of cadmium in clam *Ruditapes philippinarum* using iTRAQ-based proteomics. *Environmental Pollution*, 251, 802–810. Elsevier Ltd.
- JIA, Z., SHI, Y., ZHANG, L., REN, Y., WANG, T., XING, L., ET AL. (2018) DNA methylome profiling at single-base resolution through bisulfite sequencing of 5mC-immunoprecipitated DNA. *BMC Biotechnology*, 18, 1–15. BMC Biotechnology.
- JIANG, L., ZHANG, J., WANG, J.-J., WANG, L., ZHANG, L., LI, G., ET AL. (2013) Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153, 773–784. Elsevier.
- JIMENEZ, E., MARIN, M.L., MARTIN, R., ODRIÓZOLA, J.M., OLIVARES, M., XAUS, J., ET AL. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159, 187–193.
- JOE, M. (2013) The Epigenetic Effect of Trematode Infection on the Snail Host *Zeacumantus subcarinatus*. University of Otago, New Zealand.
- JOHANNSEN, W.L. (1909) Elemente der Exakten Erblchkeitslehre [The elements of an exact theory of heredity]. *Jena: Gustav Fischer*.
- JOHNSON, C.W. (2006) What are emergent properties and how do they affect the engineering of complex systems? *Reliability Engineering and System Safety*, 91, 1475–1481.
- JONES, P.A. & TAKAI, D. (2001) The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics, 293, 1068–1070.
- JONES, P.A. & TAKAI, D. (2002) The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, 293, 1068–1070.
- JORDAN, M.A. & SNELL, H.L. (2002) Life history trade-offs and phenotypic plasticity in the reproduction of Galápagos lava lizards (*Microlophus delanonis*). *Oecologia*, 130, 44–52.
- JOUAUX, A., LAFONT, M., BLIN, J.L., HOUSSIN, M., MATHIEU, M. & LELONG, C. (2013) Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics*, 14, 1–14.
- JULIANO, C., WANG, J. & LIN, H. (2013) Uniting Germline and Stem Cells: the Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse Organisms. *Annual review of genetics*, 45.
- KACHROO, A. & ROBIN, G.P. (2013) Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 527–533. Elsevier Ltd.
- KAITALA, A. (1991) Phenotypic Plasticity in Reproductive Behaviour of Waterstriders: Trade-Offs Between Reproduction and Longevity During Food Stress. *Functional Ecology*, 5, 12.
- KALTENPOTH, M., GÖTTLER, W., HERZNER, G. & STROHM, E. (2005) Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, 15, 475–479. Elsevier.
- KARAMANOY, M., POULAKOU-REBELAKOU, E., TZETIS, M. & ANDROUTSOS, G. (2010) Anton van

- Leeuwenhoek (1632-1723): Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Revista Argentina de Microbiologia*, 42, 311–314.
- KEELING, P.J. & PALMER, J.D. (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, 605–618.
- KEELING, S.E., BROSNAHAN, C.L., WILLIAMS, R., GIAS, E., HANNAH, M., BUENO, R., ET AL. (2014) New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1 an opportunistic longitudinal study. *Diseases of aquatic organisms*, 109, 231–239.
- KELLY, M.W., DEBIASSE, M.B., VILLELA, V.A., ROBERTS, H.L. & CECOLA, C.F. (2016) Adaptation to climate change: trade-offs among responses to multiple stressors in an intertidal crustacean. *Evolutionary Applications*, 9, 1147–1155.
- KEUNG, A.J., JOUNG, J.K., KHALIL, A.S. & COLLINS, J.J. (2015) Chromatin regulation at the frontier of synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, 16, 159–171.
- KIKUCHI, Y., HOSOKAWA, T. & FUKATSU, T. (2011) Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4075–4081.
- KIMBERLY, D.A. & SALICE, C.J. (2014) If you could turn back time : Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. *Environmental Pollution*, 184, 419–425. Elsevier Ltd.
- 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. Elsevier Ltd.
- KING, W.L., SIBONI, N., WILLIAMS, N.L.R., KAHLKE, T., NGUYEN, K.V., JENKINS, C., ET AL. (2019) Variability in the composition of pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility to OsHV-1 μ var disease. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12.
- KIRKPATRICK, M. & LANDE, R. (1989) The Evolution of Maternal Characters. *Evolution*, 43, 485–503. [Society for the Study of Evolution, Wiley].
- KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M. & GLÖCKNER, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, 1–11.
- KNIGHT, M., ITTIPRASERTA, W., ODOEMELAM, E.C., ADEMA, C.M., MILLER, A., RAGHAVAN, N. & BRIDGER, J.M. (2010) Non-random organization of the *Biomphalaria glabrata* genome in interphase Bge cells and the spatial repositioning of activated genes in cells co-cultured with *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 29, 61–70.
- KONG, N., LIU, X., LI, J., MU, W., LIAN, J., XUE, Y. & LI, Q. (2017) Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35, 1248–1258.
- KORNBERG, R.D. (1974) Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, 184, 3–6.
- KORNBERG, R.D. (1977) Structure of Chromatin. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 931–954. Annual Reviews.
- KORTHAUER, K., CHAKRABORTY, S., BENJAMINI, Y. & IRIZARRY, R.A. (2018) Detection and accurate false discovery rate control of differentially methylated regions from whole genome bisulfite sequencing. *Biostatistics*, 20, 367–383.
- KOUZARIDES, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693–705.
- KRIAUCIONIS, S. & HEINTZ, N. (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science*, 324, 929–930.
- KRUEGER, D.M., GUSTAFSON, R.G. & CAVANAUGH, C.M. (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biological Bulletin*, 190, 195–202.
- KRUEGER, F. & ANDREWS, S.R. (2011) Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571–1572.
- KRÜTZEN, M., MANN, J., HEITHAUS, M.R., CONNOR, R.C., BEJDER, L. & SHERWIN, W.B. (2005) Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8939–8943.
- KU, M., KOCHÉ, R.P., RHEINBAY, E., MENDENHALL, E.M., ENDOH, M., MIKKELSEN, T.S., ET AL. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains.

PLoS Genetics, 4.

- KURIHARA, H. (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 275–284.
- KURTZ, J. & FRANZ, K. (2003) Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425, 37–38.
- KURTZ, K., MARTINEZ-SOLER, F., AUSIO, J. & CHIVA, M. (2007) Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 1432–1441.
- KURZ, A., LAMPEL, S., NICKOLENKO, E., BRADL, J., BERMER, A., ORGANISATION, A., ET AL. (1996) Active and Inactive Genes Localize Preferentially in the Periphery of Chromosome Territories, 135, 1195–1205.
- LAFONT, M. (2017) Mécanismes et spécificité du priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- 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 and Comparative Immunology*, 91, 17–25. Elsevier Ltd.
- 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, 13143.
- LAFORSCH, C. & TOLLRIAN, R. (2004) Embryological aspects of inducible morphological defenses in *Daphnia*. *Journal of Morphology*, 262, 701–707.
- LAHMY, S., PONTIER, D., BIES-ETHEVE, N., LAUDIE, M., FENG, S., JOBET, E., ET AL. (2016) Evidence for ARGONAUTE4–DNA interactions in RNA-directed DNA methylation in plants. *Genes and Development*, 30, 2565–2570.
- LALAND, K., ULLER, T., FELDMAN, M., STERELNY, K., MÜLLER, G.B., MOCZEK, A., ET AL. (2014) Does evolutionary theory need a rethink? *Nature*, 514, 161.
- LALAND, K.N. & HOPPITT, W. (2003) Do Animals Have Culture? *Evolutionary Anthropology*, 12, 150–159.
- LALAND, K.N., ULLER, T., FELDMAN, M.W., STERELNY, K., MÜLLER, G.B., MOCZEK, A., ET AL. (2015) The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proc. R. Soc. B*, 282, 20151019.
- DE LAMARCK, J.-B. DE M. (1809) Philosophie zoologique, ou Exposition des considérations relatives à l’histoire naturelle des animaux... Dentu.
- 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 and Shellfish Immunology*, 15, 225–240.
- LANCTOT, C., CHEUTIN, T., CREMER, M., CAVALLI, G. & CREMER, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics*.
- LANE, N., DEAN, W., ERHARDT, S., HAJKOVA, P., SURANI, A., WALTER, J. & REIK, W. (2003) Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, 35, 88–93.
- LANGMEAD, B. & SALZBERG, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9, 357. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. & SALZBERG, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10.
- LAUKENS, D., BRINKMAN, B.M., RAES, J., DE VOS, M. & VANDENABEELE, P. (2015a) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 117–132.
- LAUKENS, D., BRINKMAN, B.M., RAES, J., DE VOS, M. & VANDENABEELE, P. (2015b) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 117–132.
- LAVIN, Y., WINTER, D., BLECHER-GONEN, R., DAVID, E., KERENSHAUL, H., MERAD, M., ET AL. (2014) Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*, 159, 1312–1326.

- LAW, J.A. & JACOBSEN, S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 204–220. Nature Publishing Group.
- LEADBEATER, E. & CHITTKA, L. (2007) Social Learning in Insects - From Miniature Brains to Consensus Building. *Current Biology*, 17, 703–713.
- LEHMAN, E.M. & CAMPBELL, C.D. (2007) Developmental window of response to predator chemical cues in rough-skinned newt embryos. *Functional Ecology*, 21, 880–885.
- LEWIN, B. (1999) Gènes VI^{ème}. Paris, Bruxelles.
- LEWIS, S.L. & MASLIN, M.A. (2015) Defining the Anthropocene. *Nature*, 519, 171–180. Nature Publishing Group.
- LI, C., SONG, L., ZHAO, J., ZHU, L., ZOU, H., ZHANG, H., ET AL. (2007) Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22, 663–672.
- LI, C., SONG, L., ZHAO, J., ZOU, H., SU, J. & ZHANG, H. (2006) Genomic organization, nucleotide sequence analysis of the core histone genes cluster in *Chlamys farreri* and molecular evolution assessment of the H2A and H2B. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 17, 440–451.
- LI, E., BEARD, C. & JAENISCH, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362. Nature Publishing Group.
- LI, E., BEARD, C. & JAENISCH, R. (1994) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362–365.
- LI, H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27, 2987–2993.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., ET AL. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.
- LI, X., ITO, M., ZHOU, F., YOUNGSON, N., ZUO, X., LEDER, P. & FERGUSON-SMITH, A.C. (2008) A Maternal-Zygotic Effect Gene, *Zfp57*, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell*, 15, 547–557. Elsevier Inc.
- LI, Y., GUAN, Y., LI, Q. & HE, M. (2014) Analysis of DNA methylation in tissues and development stages of pearl oyster *Pinctada fucata*. *Genes Genom*, 263–270.
- LI, Y., HUANG, X., GUAN, Y., SHI, Y., ZHANG, H. & HE, M. (2015) DNA methylation is associated with expression level changes of galectin gene in mantle wound healing process of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 912–918. Elsevier Ltd.
- LI, Y., SONG, X., WANG, W., WANG, L., YI, Q., JIANG, S., ET AL. (2017) The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 71, 59–69. Elsevier Ltd.
- LI, Y., ZHANG, L., LI, Y., LI, W., GUO, Z., LI, R., ET AL. (2019) Dynamics of DNA Methylation and DNMT Expression During Gametogenesis and Early Development of Scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 21, 196–205. Marine Biotechnology.
- LIAN, S., HE, Y., LI, X., ZHAO, B., HOU, R., HU, X., ET AL. (2015) Changes in global DNA methylation intensity and DNMT1 transcription during the aging process of scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Ocean University of China*, 14, 685–690.
- LIENERT, F., WIRBELAUER, C., SOM, I., DEAN, A., MOHN, F. & SCHÜBELER, D. (2011) Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*, 43, 1091–1097. Nature Publishing Group.
- LIM, M.Y., YOU, H.J., YOON, H.S., KWON, B., LEE, J.Y., LEE, S., ET AL. (2016) The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome, 1–8.
- LIPPMAN, Z., GENDREL, A.V., BLACK, M., VAUGHN, M.W., DEDHIA, N., MCCOMBIE, W.R., ET AL. (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430, 471–476.
- LIU, C., ZHANG, T., WANG, L., WANG, M., WANG, W., JIA, Z., ET AL. (2016) The modulation of extracellular superoxide dismutase in the specifically enhanced cellular immune response against secondary challenge of *Vibrio splendidus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Developmental and Comparative Immunology*, 63, 163–170. Elsevier Ltd.
- LIU, X.S., WU, H., JI, X., DADON, D., YOUNG, R.A., LIU, X.S., ET AL. (2016) Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167, 233–247. Elsevier Inc.

- LIU, Z., ZHOU, Z., WANG, L., SONG, X., CHEN, H., WANG, W., ET AL. (2015) The enkephalinergic nervous system and its immunomodulation on the developing immune system during the ontogenesis of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 250–259. Elsevier Ltd.
- LLOYD, M.M., MAKUKHOV, A.D. & PESPENI, M.H. (2016) Loss of genetic diversity as a consequence of selection in response to high pCO₂. *Evolutionary Applications*, 9, 1124–1132.
- LOKMER, A., KUENZEL, S., BAINES, J.F. & WEGNER, K.M. (2016) The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18, 970–987.
- LOKMER, A. & WEGNER, K.M. (2015) Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9, 670–682. Nature Publishing Group.
- DE LORGERIL, J., LUCASSON, A., PETTON, B., TOULZA, E., MONTAGNANI, C., CLERISSI, C., ET AL. (2018) Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters.
- LOVE, M.I., HUBER, W. & ANDERS, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 1–21.
- LUCHTEL, D. (1972) Gonadal Development and Sex Determination in Pulmonate Molluscs. *Z. Zellforsch*, 301, 279–280.
- LUGER, K., DECHASSA, M.L. & TREMETHICK, D.J. (2013) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 436–447.
- LUNA-ACOSTA, A., RENAULT, T., THOMAS-GUYON, H., FAURY, N., SAULNIER, D., BUDZINSKI, H., ET AL. (2012) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87, 1335–1340.
- LUNA, E. & TON, J. (2012) The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 615–618.
- LUQUET, E. & TARIEL, J. (2016) Offspring reaction norms shaped by parental environment : interaction between within- and trans-generational plasticity of inducible defenses. *BMC Evolutionary Biology*, 1–10. BMC Evolutionary Biology.
- LUTEIJN, M.J. & KETTING, R.F. (2013) PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature Publishing Group*, 14, 523–534. Nature Publishing Group.
- DILUZIO, N.R. & WILLIAMS, D.L. (1978) Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice. *Infection and Immunity*, 20, 804–810.
- LV, Z., LI, C., ZHANG, P., WANG, Z., ZHANG, W. & JIN, C.H. (2015) miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 431–436. Elsevier Ltd.
- MA, T., CHEN, Y., ZHANG, F., YANG, C.Y., WANG, S. & YU, X. (2013) RNF111-Dependent Neddylation Activates DNA Damage-Induced Ubiquitination. *Molecular Cell*, 49, 897–907. Elsevier Inc.
- MAHE, F., ROGNES, T., QUINCE, C., DE VARGAS, C. & DUNTHORN, M. (2014) Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593.
- MAHER, B. (2008) The case of the missing heritability. *Nature*, 456, 18–21.
- MAI, H., MORIN, B., PARDON, P., GONZALEZ, P., BUDZINSKI, H. & CACHOT, J. (2013) Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1–8. Elsevier.
- MARAKALALA, M.J., WILLIAMS, D.L., HOVING, J.C., ENGSTAD, R., NETEA, M.G. & BROWN, G.D. (2013) Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of β -glucan-rich ligands in vivo. *Microbes and Infection*, 15, 511–515. Elsevier Masson SAS.
- MARINUS, M.G. (2010) DNA Methylation and Mutator Genes in *Escherichia coli* K-12. *Mutation research*, 705, 71–76.
- MARTENOT, C., ODEN, E., TRAVAILLE, 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, 25–31. Elsevier B.V.
- MARTENS, J.H.A., O’SULLIVAN, R.J., BRAUNSCHWEIG, U., OPRAVIL, S., RADOLF, M., STEINLEIN, P. & JENUWEIN, T. (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the

- mouse epigenome. *EMBO Journal*, 24, 800–812.
- MARTIN, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17, 10–12.
- MARTIN, R., NAUTA, A.J., BEN AMOR, K., KNIPPERS, L.M.J., KNOL, J. & GARSSSEN, J. (2010) Early life: Gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes*, 1, 367–382.
- MARTINEZ-ZAMUDIO, R. & HA, H.C. (2012) Histone ADP-Ribosylation Facilitates Gene Transcription by Directly Remodeling Nucleosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2490–2502.
- MARTINEZ ARBIZU, P. (2019) pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. *R package version 0.3*.
- MARTINEZ CRUZ, P., IBAÑEZ, A.L., MONROY HERMOSILLO, O.A. & RAMIREZ SAAD, H.C. (2012) Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 916845. International Scholarly Research Network.
- MASLOWSKI, K.M. & MACKAY, C.R. (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology*, 12, 5–9. Nature Publishing Group.
- MATILAINEN, O., QUIROS, P.M. & AUWERX, J. (2017) Mitochondria and Epigenetics – Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends in Cell Biology*, 27, 453–463. Elsevier Ltd.
- MATZKE, M., KANNO, T., HUETTEL, B., DAXINGER, L. & MATZKE, A.J.M. (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 512–519.
- MAYNARD SMITH, J. (1990) Models of a dual inheritance system. *Journal of Theoretical Biology*, 143, 41–53.
- MAYR, E. (1982) The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance. Harvard University Press.
- MAYR, E. (1993) Darwin et la pensée moderne de l'évolution.
- MCCLINTOCK, B. (1948) Mutable loci in maize. *Carnegie Inst Wash Year Book*, 47, 155–169.
- MCDONALD, J.I., CELIK, H., ROIS, L.E., FISHBERGER, G., FOWLER, T., REES, R., ET AL. (2016) Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biology Open*, 5, 866–874.
- MCFALL-NGAI, M., HADFIELD, M.G., BOSCH, T.C.G., CAREY, H. V., DOMAZET-LOSO, T., DOUGLAS, A.E., ET AL. (2013) Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 3229–3236.
- MCGHEE, K.E. & BELL, A.M. (2014) Paternal care in a fish: epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281, 20141146.
- MCMURDIE, P.J. & HOLMES, S. (2013) PhyloSeq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8.
- MEABURN, K.J. & MISTELI, T. (2014) Chromosome territories.
- MECHIN, M.C., NACHAT, R., COUDANE, F., ADOUE, V., ARNAUD, J., SERRE, G. & SIMON, M. (2011) La désimination ou citrullination Une modification post-traductionnelle aux multiples facettes. *Medecine/Sciences*, 27, 49–54.
- VAN DER MEER, J.W.M., JOOSTEN, L.A.B., RIKSEN, N. & NETEA, M.G. (2015) Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence. *Molecular Immunology*, 68, 40–44. Elsevier Ltd.
- MELILLO, D., MARINO, R., ITALIANI, P. & BORASCHI, D. (2018) Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans : A Critical Appraisal, 9.
- MELLO, C.C. & CONTE JR, D. (2004) Revealing the world of RNA interference, 431.
- MENNELLA, M.R.F., FARINA, B., IRACE, M.V., DI CRISTO, C. & DI COSMO, A. (2002) Histone H1-like protein and a testis-specific variant in the reproductive tracts of *Octopus vulgaris*. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 355–365.
- MERCER, T.R., DINGER, M.E. & MATTICK, J.S. (2009) Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, 10, 155–159.
- MERCER, T.R. & MATTICK, J.S. (2013) Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20, 300–307.
- MESSNER, S. & HOTTIGER, M.O. (2011) Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 21, 534–542. Elsevier Ltd.
- METZGER, D.C.H. & SCHULTE, P.M. (2016) Epigenomics in marine fishes. *Marine Genomics*, 30, 43–54. Elsevier B.V.

- MIGICOVSKY, Z. & KOVALCHUK, I. (2011) Epigenetic memory in mammals. *Frontiers in Genetics*, 2, 1–7.
- MILUTINOVIC, B. & KURTZ, J. (2016) Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology*, 28, 328–342.
- MIRBAHAL, L. & CHIPMAN, J.K. (2014) Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 10–17. Elsevier B.V.
- MIRO-BLANCH, J. & YANES, O. (2019) Epigenetic Regulation at the Interplay Between Gut Microbiota and Host Metabolism. *Frontiers in Genetics*, 10, 1–9.
- MITRA, A., LUO, J., ZHANG, H., CUI, K., ZHAO, K. & SONG, J. (2012) Marek's disease virus infection induces widespread differential chromatin marks in inbred chicken lines. *BMC genomics*, 13, 557.
- MOELLER, A.H., SUZUKI, T.A., PHIFER-RIXEY, M. & NACHMAN, M.W. (2018) Transmission modes of the mammalian gut microbiota. *Science*, 362, 453–457.
- MOGENSEN, T.H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 240–273.
- MONTAGNANI, C., KAPPLER, C., REICHHART, J.M. & ESCOUBAS, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*, 561, 75–82.
- MONTAGNANI, C., LABREUCHE, Y. & ESCOUBAS, J.M. (2008) Cg-I κ B, a new member of the I κ B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 182–190.
- MORET, Y. & SIVA-JOTHY, M.T. (2003) Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 2475–2480.
- MORGAN, H.D., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W. & REIK, W. (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14, 47–58.
- MORGAN, H.D., SUTHERLAND, H.G., MARTIN, D.I. & WHITELAW, E. (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature genetics*, 23, 314–318.
- MOROZ, L.L. & KOHN, A.B. (2013) Single-Neuron Transcriptome and Methylome Sequencing for Epigenomic Analysis of Aging.
- MOUSSEAU, T.A. & FOX, C.W. (1998) The adaptive significance of maternal effects. *TREE*, 13, 403–407.
- MULDER, I.E., SCHMIDT, B., STOKES, C.R., LEWIS, M., BAILEY, M., AMINOV, R.I., ET AL. (2009) Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7, 1–20.
- MÜLLER, R., CHARAF, S., SCHERER, C., OPPOLD, A., OEHLMANN, J. & WAGNER, M. (2016a) Phenotypic and epigenetic effects of vinclozolin in the gastropod *Physella acuta*. *Journal of Molluscan Studies*, 82, 320–327.
- MÜLLER, R., CHARAF, S., SCHERER, C., OPPOLD, A., OEHLMANN, J. & WAGNER, M. (2016b) Phenotypic and epigenetic effects of vinclozolin in the gastropod *Physella acuta*. *Journal of Molluscan Studies*, 82, 320–327.
- MUNDAY, P.L. (2014) Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *F1000Prime Reports*, 6, 1–7.
- NAGATA, R., NAGANO, H., OGISHIMA, D., NAKAMURA, Y., HIRUMA, M. & SUGITA, T. (2012) Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. *Pediatrics International*, 54, 350–355.
- NAGY, C. & TURECKI, G. (2012) Sensitive periods in epigenetics: Bringing us closer to complex behavioral phenotypes. *Epigenomics*, 4, 445–457.
- NETEA, M.G., JOOSTEN, L.A.B., LATZ, E., MILLS, K.H.G., NATOLI, G., STUNNENBERG, H.G., ET AL. (2016) Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098–aaf1098.
- NETEA, M.G., LATZ, E., KINGSTON, H.G., MILLS, L.A. & NEILL, J.O.' (2015) Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nature Immunology*, 16, 675–679. Nature Publishing Group.
- NETEA, M.G. & MEER, J.W.M. VAN DER (2017) Commentary Trained Immunity : An Ancient Way of

- Remembering. *Cell Host and Microbe*, 21, 297–300. Elsevier Inc.
- NETEA, M.G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J.W.M. (2011) Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host and Microbe*, 9, 355–361. Elsevier Inc.
- NEUWIRTH, E. & BREWER, R.C. (2014) ColorBrewer palettes. *R package version*, 1.
- NEWTON, I.L.G., SAVYTSKY, O. & SHEEHAN, K.B. (2015) Wolbachia Utilize Host Actin for Efficient Maternal Transmission in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 11, 1–19.
- NICA, D., POPESCU, C., DRAGHICI, G., PRIVISTIRESCU, I., SUCIU, M. & STÖGER, R. (2017) Effect of cadmium on cytosine hydroxymethylation in gastropod hepatopancreas. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 15187–15195. Environmental Science and Pollution Research.
- NICA, D. V., POPESCU, C., DRAGHICI, G.A., ANDRICA, F.M., PRIVISTIRESCU, I.A., GERGEN, I.I. & STÖGER, R. (2017) High-level dietary cadmium exposure is associated with global DNA hypermethylation in the gastropod hepatopancreas. *PLoS ONE*, 12, 1–15.
- NICOGLOU, A. & MERLIN, F. (2017) Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 1–10.
- NILSSON, E.E. & SKINNER, M.K. (2015) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Translational Research*, 165, 12–17.
- NOROZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016a) Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, 21166. Nature Publishing Group.
- NOROZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016b) Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, 21166. Nature Publishing Group.
- NOVAKOVIC, B., HABIBI, E., WANG, S.Y., ARTS, R.J.W., DAVAR, R., MEGCHELENBRINK, W., ET AL. (2016) β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*, 167, 1354–1368.e14. Elsevier.
- NOWAK, R. (1994) Mining Treasures From ' Junk DNA '. *SCIENCE*, 263.
- O'CONNOR, T. (2015) Emergent Properties. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition*, 31, 433–437.
- ODLING-SMEE, F.J., LALAND, K.N. & FELDMAN, M.W. (1996) Niche construction. *The American Naturalist*, 147, 641–648. University of Chicago Press.
- ODLING-SMEE, F.J., LALAND, K.N. & FELDMAN, M.W. (2013) Niche construction: the neglected process in evolution (MPB-37). Princeton university press.
- ODLING-SMEE, J. (2007) Niche inheritance: a possible basis for classifying multiple inheritance systems in evolution. *Biological Theory*, 2, 276–289. Springer.
- OKSANEN, J.F., BLANCHET, G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., ET AL. (2019) vegan: Community Ecology Package.
- OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014) Indication of family-specific DNA methylation patterns in developing oysters *Claire*. *Igarss 2014*, 1–5.
- OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014a) Indication of family-specific DNA methylation patterns in developing oysters. *BioRxiv*.
- OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014b) Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in *Crassostrea gigas* male gametes. *Frontiers in Physiology*, 5, 224. Frontiers Media S.A.
- OTTAVIANI, E., ACCORSI, A., RIGILLO, G., MALAGOLI, D., BLOM, J.M.C. & TASCEDDA, F. (2013) Epigenetic modification in neurons of the mollusc *Pomacea canaliculata* after immune challenge. *Brain Research*, 1537, 18–26. Elsevier.
- OTURAN, N., TRAJKOVSKA, S., OTURAN, M.A., COUDERCHET, M. & AARON, J.-J. (2008) Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process "electro-Fenton". *Chemosphere*, 73, 1550–1556. Elsevier.
- PAN, W.H., SOMMER, F., FALK-PAULSEN, M., ULAS, T., BEST, P., FAZIO, A., ET AL. (2018) Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development. *Genome Medicine*, 10, 1–15. Genome Medicine.
- PANKHURST, N.W. & MUNDAY, P.L. (2011) Effects of climate change on fish reproduction and early

- life history stages. *Marine and Freshwater Research*, 62, 1015–1026.
- PARKER, L.M., COLEMAN, R.A., O’CONNOR, W.A., DOVE, M., BYRNE, M., GIBBS, M., ET AL. (2017) Adult exposure to ocean acidification is maladaptive for larvae of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* in the presence of multiple stressors. *Biology Letters*, 13.
- PARKER, L.M., O’CONNOR, W.A., RAFTOS, D.A., PÖRTNER, H.O. & ROSS, P.M. (2015) Persistence of positive carryover effects in the oyster, *Saccostrea glomerata*, following transgenerational exposure to ocean acidification. *PLoS ONE*, 10, 1–19.
- PARKER, L.M., ROSS, P.M., O’CONNOR, W.A., BORYSKO, L., RAFTOS, D.A. & PÖRTNER, H.O. (2012) Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. *Global Change Biology*, 18, 82–92.
- PASTOR, W., PAPE, U.J., HUANG, Y., HENDERSON, H.R., LISTER, R., KO, M., ET AL. (2011) Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 473, 394–397.
- PEARSON, R.G. & DAWSON, T.P. (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: Are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12, 361–371.
- PEIRSON, B.R. (2013) Wilhelm Johannsen’s Genotype-Phenotype Distinction. *Embryo Project Encyclopedia*. Arizona State University. School of Life Sciences. Center for Biology and ...
- PENKOV, S., MITROULIS, I., HAJISHENGALLIS, G. & CHAVAKIS, T. (2019) Immunometabolic Crosstalk: An Ancestral Principle of Trained Immunity? *Trends in Immunology*, 40, 1–11. Elsevier Ltd.
- PEREZ, P.F., DORE, J., LECLERC, M., LEVENEZ, F., BENYACOU, J., SERRANT, P., ET AL. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119.
- PERNET, F., LUPO, C., BACHER, C. & WHITTINGTON, R.J. (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*.
- PETRASEK, D. (2008) Systems biology: The case for a systems science approach to diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2, 131–134.
- PETROVIC, V., PEREZ-GARCIA, C., PASANTES, J.J., ATOVIC, E., PRATS, E. & PLOHL, M. (2009) A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: A dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research*, 124, 63–71.
- PETTON, B., BOUDRY, P., ALUNNO-BRUSCIA, M. & PERNET, F. (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 6, 205–222.
- PETTON, B., DE LORGERIL, J., MITTA, G., DAIGLE, G., PERNET, F. & ALUNNO-BRUSCIA, M. (2019) Fine-scale temporal dynamics of herpes virus and vibrios in seawater during a polymicrobial infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, 135, 97–106.
- PETTON, B., PERNET, F., ROBERT, R. & BOUDRY, P. (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environment interactions*, 3, 257–273.
- PHAM, L.N., DIONNE, M.S., SHIRASU-HIZA, M. & SCHNEIDER, D.S. (2007) A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3.
- PIGLIUCCI, M. (2007) Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution*.
- PIGLIUCCI, M. & MULLER, G. (2010) Evolution—the extended synthesis.
- PINAUD, S., PORTELA, J., DUVAL, D., NOWACKI, F.C., OLIVE, M.-A., ALLIENNE, J.-F., ET AL. (2016) A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Pathogens*, 12, e1005361.
- PLAISTOW, S.J., LAPSLEY, C.T. & BENTON, T.G. (2006) Context-Dependent Intergenerational Effects : The Interaction between Past and Present Environments and Its. *The American Naturalist*, 167, 206–215.
- PLAUTZ, S.C., GUEST, T., FUNKHOUSER, M.A. & SALICE, C.J. (2013) Transgenerational cross-tolerance to stress: Parental exposure to predators increases offspring contaminant tolerance. *Ecotoxicology*, 22, 854–861.
- PLAUTZ, S.C. & SALICE, C.J. (2013) Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: Developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology*, 22, 847–853.
- POIRIER, A.C., SCHMITT, P., ROSA, R.D., VANHOVE, A.S., KIEFFER-JAQUINOD, S., RUBIO, T.P., ET AL. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: Evidences in *Crassostrea gigas*. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 24821–24831.
- PORTELA, J., DUVAL, D., ROGNON, A., GALINIER, R., BOISSIER, J., COUSTAU, C., ET AL. (2013)

- Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan biomphalaria glabrata snail. *Journal of Innate Immunity*, 5, 261–276.
- VAN DER POST, D.J. & HOGEWEG, P. (2009) Cultural inheritance and diversification of diet in variable environments. *Animal Behaviour*, 78, 155–166.
- POTOK, M.E., NIX, D.A., PARNELL, T.J. & CAIRNS, B.R. (2013) Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Bone*, 23, 1–7.
- PRADEU, T. & PASQUIER, L. DU (2018) Immunological memory : What ' s in a name ?, 283, 7–20.
- PRADO-ALVAREZ, M., DARMODY, G., HUTTON, S., O'REILLY, A., LYNCH, S.A. & CULLOTY, S.C. (2016) Occurrence of OsHV-1 in Crassostrea gigas cultured in Ireland during an exceptionally warm summer. Selection of less susceptible oysters. *Frontiers in Physiology*, 7, 1–14.
- PU, C. & ZHAN, A. (2017) Epigenetic divergence of key genes associated with water temperature and salinity in a highly invasive model ascidian. *Biological Invasions*, 19, 1–14. Springer International Publishing.
- PUTNAM, H.M., DAVIDSON, J.M. & GATES, R.D. (2016) Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evolutionary Applications*, 9, 1165–1178.
- QU, T., ZHANG, L., WANG, W., HUANG, B., LI, Y., ZHU, Q., ET AL. (2015) Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in Crassostrea gigas clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 51, 74–78.
- QUINTIN, J., SAEED, S., MARTENS, J.H.A., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J., IFRIM, D.C., LOGIE, C., ET AL. (2012) Candida albicans infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host and Microbe*, 12, 223–232.
- R CORE TEAM (2013) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Au.
- RAJASETHUPATHY, P., ANTONOV, I., SHERIDAN, R., FREY, S., SANDER, C., TUSCHL, T. & KANDEL, E.R. (2012) A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*, 149, 693–707. Elsevier Inc.
- RAJEWSKY, N. (2006) microRNA target predictions in animals. *Nature Genetics*, 38, 8–13.
- RANDALL, R.E. & GOODBOURN, S. (2008) Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 89, 1–47.
- RANDO, O.J. & VERSTREPEN, K.J. (2007) Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*, 128, 655–668.
- RAVEN, P., JOHNSON, G.B., MASON, K., LOSOS, J. & SINGER, S. (2012) Biologie, 2e edition. de boeck, Bruxelles.
- RAWLINGS, J.S., ROSLER, K.M. & HARRISON, D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117, 1281–1283.
- READER, S.M. (2016) Animal social learning: associations and adaptations. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-2120. F1000Research, London, UK.
- REATEGUI-ZIRENA, E., FIDDER, B.N., OLSON, A.D., DAWSON, D.E., BILBO, T.R. & SALICE, C.J. (2017) Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of Lymnaea stagnalis exposed to. *Environmental Pollution*, 224, 572–580.
- REMY, J. (2010) Stable inheritance of an acquired behavior in Caenorhabditis elegans. *Current Biology*, 20, 877–878.
- RENAULT, T., MOREAU, P., FAURY, N., PEPIN, J.-F., SEGARRA, A. & WEBB, S. (2012) Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *Journal of Virology*, 86, 5942–5947.
- RICHARDS, C.L., SCHREY, A.W. & PIGLIUCCI, M. (2012) Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. *Ecology Letters*, 15, 1016–1025.
- RICHTER-BOIX, A., ORIZAOLA, G. & LAURILA, A. (2014) Transgenerational phenotypic plasticity links breeding phenology with offspring life-history. *Ecological Society of America*, 95, 2815–2825.
- RIGGS, A.D. (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, 14, 9–25. Karger Publishers.
- RIVERA-CASAS, C., GONZALEZ-ROMERO, R., GARDUÑO, R.A., CHEEMA, M.S., AUSIO, J. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2017) Molecular and biochemical methods useful for the epigenetic characterization of chromatin-associated proteins in bivalve molluscs. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–14.

- RIVERA-CASAS, C., GONZALEZ-ROMERO, R., VIZOSO-VAZQUEZ, Á., CHEEMA, M.S., CERDAN, M.E., MENDEZ, J., ET AL. (2016) Characterization of mussel H2A.Z.2: a new H2A.Z variant preferentially expressed in germinal tissues from *Mytilus*. *Biochemistry and Cell Biology*, 94, 480–490.
- RIVIERE, G., HE, Y., TECCHIO, S., CROWELL, E., GRAS, M., SOURDAINE, P., ET AL. (2017) Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genetics*, 13, 1–16.
- RIVIERE, G., WU, G.C., FELLOUS, A., GOUX, D., SOURDAINE, P. & FAVREL, P. (2013) DNA Methylation Is Crucial for the Early Development in the Oyster *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, 15, 739–753.
- ROCHELEAU, C.E., DOWNS, W.D., LIN, R., WITTMANN, C., BEI, Y., CHA, Y., ET AL. (1997) Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. elegans* Embryos, 90, 707–716.
- RODRIGUES, J., BRAYNER, F.A., ALVES, L.C., DIXIT, R. & BARILLAS-MURY, C. (2010) Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*, 329, 1353–1356.
- RODRIGUES, L.C., BERGH, J.C.J.M. VAN DEN, MASSA, F., THEODOROU, J.A., ZIVERI, P. & GAZEAU, F. (2015) Sensitivity of Mediterranean Bivalve Mollusc Aquaculture to Climate Change, Ocean Acidification, and Other Environmental Pressures: Findings from a Producer Survey. *Journal of Shellfish Research*, 34, 1161–1176.
- RODRIGUEZ-ROMERO, A., JARROLD, M.D., MASSAMBA-N’SIALA, G., SPICER, J.I. & CALOSI, P. (2016) Multi-generational responses of a marine polychaete to a rapid change in seawater pCO₂. *Evolutionary Applications*, 9, 1082–1095.
- ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C. & MAHE, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- ROHART, F., GAUTIER, B., SINGH, A. & LE CAO, K.-A. (2017) mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13, e1005752. Public Library of Science.
- ROMALDE, J.L., DIEGUEZ, A.L., LASA, A. & BALBOA, S. (2014) New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: A review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–11.
- RONDON, R., GRUNAU, C., FALLET, M., CHARLEMAGNE, N., SUSSARELLU, R., CHAPARRO, C., ET AL. (2017a) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environmental Epigenetics*, 3, 1–13.
- RONDON, R., GRUNAU, C., FALLET, M., CHARLEMAGNE, N., SUSSARELLU, R., CHAPARRO, C., ET AL. (2017b) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environmental Epigenetics*, 3.
- ROOT, T., PRICE, J., HALL, K. & SCHNEIDER, S. (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57–60.
- ROQUE, A., CARRASCO, N., ANDREE, K.B., LACUESTA, B., ELANDALOUSSI, L., GAIRIN, I., ET AL. (2012) First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*, 324–325, 303–306. Elsevier B.V.
- ROQUIS, D., ROGNON, A., CHAPARRO, C., BOISSIER, J., ARANCIBIA, N., COSSEAU, C., ET AL. (2016) Frequency and mitotic heritability of epimutations in *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology*, 25, 1741–1758.
- ROSA, R.D., DE LORGERIL, J., TAILLIEZ, P., BRUNO, R., PIQUEMAL, D. & BACHERE, E. (2012) A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics*, 13.
- ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R. & ZILBER-ROSENBERG, I. (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 355–362.
- ROSS, P.M., PARKER, L. & BYRNE, M. (2016a) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. *ICES J. Mar. Sci.*, 73, 537–549.
- ROSS, P.M., PARKER, L. & BYRNE, M. (2016b) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. *ICES Journal of Marine Science*, 73, 537–549.
- ROTH, O., BEEMELMANNS, A., BARRIBEAU, S.M., SADD, B.M. & ROTH, O. (2018) Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution.
- ROTH, S.Y., DENU, J.M. & ALLIS, C.D. (2001) Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 81–120. Annual Reviews.

- ROTHSCHILD, D., WEISSBROD, O., BARKAN, E., KURILSHIKOV, A., KOREM, T., ZEEVI, D., ET AL. (2018) Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555, 210–215. Nature Publishing Group.
- ROUX, F., COLOME-TATCHE, M., EDELIST, C., WARDENAAR, R., GUERCHE, P., HOSPITAL, F., ET AL. (2011) Genome-wide epigenetic perturbation jump-starts patterns of heritable variation found in nature. *Genetics*, 188, 1015–1017.
- LE ROUX, F., GOUBET, A., THOMPSON, F.L., FAURY, N., GAY, M., SWINGS, J. & SAULNIER, D. (2005) *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2251–2255.
- LE ROUX, F., WEGNER, K.M. & POLZ, M.F. (2016) Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends in Microbiology*, 24, 568–580. Elsevier Ltd.
- ROYET, J., GUPTA, D. & DZIARSKI, R. (2011) Peptidoglycan recognition proteins: Modulators of the microbiome and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 837–851. Nature Publishing Group.
- SADD, B.M., KLEINLOGEL, Y., SCHMID-HEMPEL, R. & SCHMID-HEMPEL, P. (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters*, 1, 386–388.
- SADD, B.M. & SCHMID-HEMPEL, P. (2006) Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, 16, 1206–1210.
- SAEED, S., QUINTIN, J., KERSTENS, H.H.D., RAO, N.A., MATARESE, F., CHENG, S., ET AL. (2014) Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345, 1–26.
- SAINT-CARLIER, E. & RIVIERE, G. (2015) Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Letters*, 589, 1459–1466. Federation of European Biochemical Societies.
- SALEM, H., FLOREZ, L., GERARDO, N. & KALTENPOTH, M. (2015) An out-of-body experience: The extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282.
- SALINAS, S., BROWN, S.C., MANGEL, M. & MUNCH, S.B. (2013) Non-genetic inheritance and changing environments. *Non-Genetic Inheritance*, 38–50.
- SANCHEZ-ARGÜELLO, P., APARICIO, N., GUEVARA, M.A., DIAZ, L., CERVERA, M.T. & FERNANDEZ, C. (2016) Effects on reproduction, genotoxicity and DNA methylation pattern after chronic exposure of the freshwater snail *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) to vinclozolin. *Austin Journal of Environmental Toxicology*, 2, 1008.
- SANDER, K. (1992) Shaking a concept: Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 201, 265–267.
- SANDERS, M.E. (2008) Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46, S58–S61.
- SANTAGUIDA, S. & MUSACCHIO, A. (2009) The life and miracles of kinetochores. *EMBO Journal*, 28, 2511–2531.
- SARDA, S., ZENG, J., HUNT, B.G. & YI, S. V. (2012) The evolution of invertebrate gene body methylation. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1907–1916.
- SARKER, G. & PELEG-RAIBSTEIN, D. (2019) Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients*, 11.
- SASAKI, H. & MATSUI, Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 9, 129–140.
- SCHAEFER, M. (2010) Lack of evidence for DNA methylation of *Invader4* retroelements in *Drosophila* and implications for *Dnmt2*-mediated epigenetic regulation, 42, 3–5.
- SCHLICHTING, C.D. & WUND, M.A. (2014) Phenotypic plasticity and epigenetic marking: An assessment of evidence for genetic accommodation. *Evolution*, 68, 656–672.
- SCHMITT, P., DUPERTHUY, M., MONTAGNANI, CAROLINE BACHERE, EVELYNE DESTOUMIEUX-GARZON, D. & ECOLOGY (2011) Immune responses in the pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In *Seminars in Oncology Nursing* p. .
- SCHMITT, P., DUPERTHUY, M., MONTAGNANI, C., BACHERE, E. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. (2012) Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: An overview with focus on summer mortalities. In *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality* p. .

- SCHRADER, L. & SCHMITZ, J. (2019) The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Molecular Ecology*, 28, 1537–1549.
- SCHÜBELER, D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321–326.
- SCHUETTENGRUBER, B., CHOURROUT, D., VERVOORT, M., LEBLANC, B. & CAVALLI, G. (2007) Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*, 128, 735–745.
- SCHULZ, L.C. (2010) The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 16757–16758.
- SCHWAB, D.B., RIGGS, H.E., NEWTON, I.L.G. & MOCZEK, A.P. (2016) Developmental and ecological benefits of the maternally transmitted microbiota in a dung beetle. *American Naturalist*, 188, 679–692.
- SCHWARTZ, S., FRIEDBERG, I., IVANOV, I. V., DAVIDSON, L.A., GOLDSBY, J.S., DAHL, D.B., ET AL. (2012) A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biology*, 13.
- SCHWINDT, A.R. (2015) Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there evidence of transgenerational inheritance? *General and Comparative Endocrinology*, 219, 152–164. Elsevier Inc.
- SCOTTI, P.D., DEARING, S.C. & GREENWOOD, D.R. (2007) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 41, 91–101.
- SEELEY, J.J., BAKER, R.G., MOHAMED, G., BRUNS, T., HAYDEN, M.S., DESHMUKH, S.D., ET AL. (2018) Induction of innate immune memory via microRNA targeting of chromatin remodelling factors. *Nature*, 559, 114. Nature Publishing Group.
- 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, 30–32.
- SEGARRA, A., MAUDUIT, F., FAURY, N., TRANCART, S., DEGREMONT, L., TOURBIEZ, D., ET AL. (2014) Dual transcriptomics of virus-host interactions: Comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics*, 15, 1–13.
- 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 Research*, 153, 92–99.
- SEXTON, T., YAFFE, E., KENIGSBERG, E., BANTIGNIES, F., LEBLANC, B., HOICHMAN, M., ET AL. (2012) Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell*, 148, 458–472.
- SHAMA, L.N.S., STROBEL, A., MARK, F.C. & WEGNER, K.M. (2014) Transgenerational plasticity in marine sticklebacks : maternal effects mediate impacts of a warming ocean. *Functional Ecology*, 28, 1482–1493.
- SHAMA, L.N.S. & WEGNER, K.M. (2014) Grandparental effects in marine sticklebacks: Transgenerational plasticity across multiple generations. *Journal of Evolutionary Biology*, 27, 2297–2307.
- SHEN, H. & LAIRD, P.W. (2013) Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, 153, 38–55. Elsevier Inc.
- SHIIO, Y. & EISENMAN, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13225–13230.
- SHIMAHARA, Y., KURITA, J., KIRYU, I., NISHIOKA, T., YUASA, K., KAWANA, M., ET AL. (2012) Surveillance of type 1 ostreid herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathology*, 47, 129–136. The Japanese Society of Fish Pathology.
- SIJEN, T. & PLASTERK, R.H.A. (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*, 426, 310–314.
- SIMMEN, M.W., LEITGEB, S., CHARLTON, J., JONES, S.J.M., HARRIS, B.R., CLARK, V.H. & BIRD, A. (1999) Nonmethylated Transposable Elements and Methylated Genes in a Chordate Genome. *Science*, 283, 1164–1168.
- SIMONE, C. & PESERICO, A. (2011) Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

- SKINNER, M.K. (2008) What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, 25, 2–6.
- SKINNER, M.K. (2016) Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. *Nature Reviews Endocrinology*, 12, 68. Nature Publishing Group.
- SKINNER, M.K., GURRERRO-BOSAGNA, C., HAQUE, M.M., NILSSON, E.E., KOOP, J.A.H., KNUTIE, S.A. & CLAYTON, D.H. (2014) Epigenetics and the evolution of Darwin's Finches. *Genome biology and evolution*, 6, 1972–1989.
- SLOTKIN, R.K. & MARTIENSSSEN, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8, 272–285.
- SMALL, C. & NICHOLLS, R.J. (2003) A global analysis of human settlement in coastal zones. *Journal of Coastal Research*, 19, 584–599.
- SMISETH, P.T., KÖLLIKER, M. & ROYLE, N.J. (2012) What is parental care? In *The Evolution of Parental Care* (ed. and M.K. Nick J. Royle, Per T. Smiseth), pp. 1–17 First Edit. Oxford University Press.
- SMISETH, P.T., SCOTT, M.P. & ANDREWS, C. (2011) Hormonal regulation of offspring begging and mediation of parent–offspring conflict. *Animal Behaviour*, 81, 507–517.
- SONG, K., LI, L. & ZHANG, G. (2017) The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 12, 1–12.
- SPEMANN, H. & MANGOLD, H. (1924) Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species. *Archiv*.
- VAN SPEYBROECK, L., WAELE, D. & VIJVER, G. (2006) Theories in Early Embryology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981, 7–49.
- STANDEN, B.T., RAWLING, M.D., DAVIES, S.J., CASTEX, M., FOEY, A., GIOACCHINI, G., ET AL. (2013) Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1097–1104.
- STAREGA-ROSLAN, J., KROL, J., KOSCIANSKA, E., KOZLOWSKI, P., SZLACHCIC, W.J., SOBCZAK, K. & KRZYZOSIAK, W.J. (2011) Structural basis of microRNA length variety, 39, 257–268.
- VAN STEENSEL, B. (2011) Chromatin: Constructing the big picture. *EMBO Journal*, 30, 1885–1895. Nature Publishing Group.
- STENDER, J.D. & GLASS, C.K. (2013) Epigenomic control of the innate immune response. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 582–587. Elsevier Ltd.
- STOREY, J.D. & TIBSHIRANI, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9440–9445.
- STRAHL, B. & ALLIS, C. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41–5.
- SUAREZ-ULLOA, V., GONZALEZ-ROMERO, R. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2015) Environmental epigenetics: A promising venue for developing next-generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 98, 5–13. Elsevier Ltd.
- SUAREZ-ULLOA, V., RIVERA-CASAS, C. & MICHEL, M. (2019) Seasonal DNA Methylation Variation in the Flat Tree Oyster *Isognomon Alatus* from a Mangrove Ecosystem in North Biscayne Bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*, 38, 79.
- SUKA, N., NAKASHIMA, E., SHINMYOZU, K., HIDAKA, M. & JINGAMI, H. (2006) The WD40-repeat protein Pwp1p associates in vivo with 25S ribosomal chromatin in a histone H4 tail-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 34, 3555–3567.
- SUN, J.C., UGOLINI, S. & VIVIER, E. (2014) Immunological memory within the innate immune system. *EMBO Journal*, 33, 1295–1303.
- SUN, Y., HOU, R., FU, X., SUN, C., WANG, S., WANG, C., ET AL. (2014) Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *PLoS ONE*, 9.
- SUSKI, J.G., SALICE, C.J. & PATINOS, R. (2012) Species-specific and transgenerational responses to increasing salinity in sympatric freshwater gastropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31.
- SUSSARELLU, R., LEBRETON, M., ROUXEL, J., AKCHA, F. & RIVIERE, G. (2018) Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 196, 70–78. Elsevier.
- SYLVAIN, F.É. & DEROME, N. (2017) Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports*, 7, 1–14.

- SZCZERBAL, I., FOSTER, H.A. & BRIDGER, J.M. (2009) The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system, 647–663.
- SZULWACH, K.E., LI, X., LI, Y., SONG, C.X., HAN, J.W., KIM, S.S., ET AL. (2011) Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genetics*, 7.
- SZYF, M. (2015) Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in Molecular Medicine*.
- TABARA, H., SARKISSIAN, M., KELLY, W.G., FLEENOR, J., GRISHOK, A., TIMMONS, L., ET AL. (1999) The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99, 123–132.
- TAHILIANI, M., KOH, K.P., SHEN, Y., PASTOR, W.A., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., ET AL. (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324, 930–935.
- TANAY, A., O'DONNELL, A.H., DAMELIN, M. & BESTOR, T.H. (2007) Hyperconserved CpG domains underlie Polycomb-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5521–5526.
- TANGUY, A., BOUTET, I., LAROCHE, J. & MORAGA, D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal*, 272, 390–403.
- TARIEL, J., PLENET, S. & LUQUET, É. (2019) Transgenerational plasticity of inducible defenses: combined effects of grand-parental, parental and current environments. *bioRxiv*, 1–17.
- THERNEAU, T. (2015) A Package for Survival Analysis in S. version 2.38.
- THOMAS, C.D., CAMERON, A., GREEN, R.E., BAKKENES, M., BEAUMONT, L.J., COLLINGHAM, Y.C., ET AL. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, 427, 145–148.
- THOMAS, F., LEFEVRE, T. & RAYMOND, M. (2016) Biologie évolutive de boeck. Louvain-la-Neuve.
- THOMAS, J.O. & KORNBERG, R.D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 2626–2630.
- THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., HOSTE, B., VANDEMEULEBROECKE, K., GULLIAN, M. & SWINGS, J. (2003) *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1495–1501.
- THOMSON, J.M. (1959) The naturalization of the pacific oyster in Australia. *Marine and Freshwater Research*, 10, 144–149.
- THOMSON, J.P. & MEEHAN, R.R. (2017) The application of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine studies in cancer research. *Epigenomics*, 9, 77–91.
- THORSON, J.L.M., SMITHSON, M., BECK, D., SADLER-RIGGLEMAN, I., NILSSON, E., DYBDAHL, M. & SKINNER, M.K. (2017) Epigenetics and adaptive phenotypic variation between habitats in an asexual snail. *Scientific Reports*, 7, 1–11. Springer US.
- THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J.T. & MESIROV, J.P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14, 178–192.
- TIRAPE, A., BACQUE, C., BRIZARD, R., VANDENBULCKE, F. & BOULO, V. (2007) Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 859–873.
- TRABAL FERNANDEZ, N., MAZON-SUASTEGUI, J.M., VAZQUEZ-JUAREZ, 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, 69–83.
- TRABAL, N., MAZON-SUASTEGUI, J.M., VAZQUEZ-JUAREZ, R., ASCENCIO-VALLE, F., MORALES-BOJORQUEZ, E. & ROMERO, J. (2012) Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. *Microbial Ecology*, 64, 555–569.
- TRAN, T.K.A., MACFARLANE, G.R., KONG, R.Y.C., O'CONNOR, W.A. & YU, R.M.K. (2016) Potential mechanisms underlying estrogen-induced expression of the molluscan estrogen receptor (ER) gene. *Aquatic Toxicology*, 179, 82–94. Elsevier B.V.

- TREROTOLA, M., RELI, V., SIMEONE, P. & ALBERTI, S. (2009) Epigenetic inheritance and the missing heritability problem. *Genetics*, 182, 845–850. Human Genomics.
- TUDDENHAM, L., WHEELER, G., NTOUNIA-FOUSARA, S., WATERS, J., HAJIHOSEINI, M.K., CLARK, I. & DALMAY, T. (2006) The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells, 580, 4214–4217.
- TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V.M., AMARAL, L.S., DA SILVA GARCIA, J., LIMA, M.G., DAMATTA, R.A. & PINHEIRO, J. (2019) Alterations in the Mitochondrial Physiology of Biomphalaria glabrata (Mollusca: Gastropoda) After Experimental Infection by Angiostrongylus cantonensis (Nematoda: Metastrongylidae). *Acta Parasitologica*. Springer International Publishing.
- TWEEDIE, S., CHARLTON, J. & CLARK, V. (1997) Methylation of Genomes and Genes at the Invertebrate-Vertebrate Boundary, 17, 1469–1475.
- UBEDA, C. & PAMER, E.G. (2012) Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends immunology*, 33, 459–466.
- UEDA, K. & HAYAISHI, O. (1985) ADP-ribosylation. *Annual review of biochemistry*, 54, 73–100. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- VANDEGEHUCHTE, M.B. & JANSSEN, C.R. (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 36–45. Elsevier B.V.
- DE VANSAY, A., BOUGE, A.L., BOIVIN, A., HERMANT, C., TEYSSET, L., DELMARRE, V., ET AL. (2012) Paramutation in Drosophila linked to emergence of a piRNA-producing locus. *Nature*, 490, 112–115.
- VAQUERO, A., LOYOLA, A. & REINBERG, D. (2003) The Constantly Changing Face of Chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2003.
- VASCONCELOS, G.J. & LEE, J.S. (1972) Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied microbiology*, 23, 11–16.
- VEENENDAAL, M.V.E., PAINTER, R.C., DE ROOIJ, S.R., BOSSUYT, P.M.M., VAN DER POST, J.A.M., GLUCKMAN, P.D., ET AL. (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 120, 548–553.
- VERDEL, A., VAVASSEUR, A., GORREC, M.L.E. & TOUAT-TODESCHINI, L. (2009) Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways, 257, 245–257.
- VIGNAL, A., BOITARD, S., THEBAULT, N., DAYO, G.K., YAPI-GNAORE, V., YOUSAO ABDU KARIM, I., ET AL. (2019) A guinea fowl genome assembly provides new evidence on evolution following domestication and selection in galliformes. *Molecular Ecology Resources*, 19, 997–1014.
- VILLA MARTIN, P., MUÑOZ, M.A. & PIGOLOTTI, S. (2019) Bet-hedging strategies in expanding populations. *PLoS computational biology*, 15, e1006529.
- VITOUSEK, P.M., MOONEY, H. A, LUBCHENCO, J. & MELILLO, J.M. (1997) Human Domination of Earth 's Ecosystems. *Science*, 277, 494–499.
- VOLKER, M., BACKSTROM, N., SKINNER, B.M., LANGLEY, E.J., BUNZEY, S.K., ELLEGREN, H. & GRIFFIN, D.K. (2010) Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. *Genome Research*, 20, 503–511.
- WADDINGTON, C.H. (1942) The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18–20.
- WADDINGTON, C.H. (1953) Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution*, 7, 118.
- WALSH, M.R., IV, F.C., BILES, K. & MUNCH, S.B. (2014) Predator-induced phenotypic plasticity a challenge for theory? *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 1–9.
- WANG, L., SONG, X. & SONG, L. (2018) The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 99–118. Elsevier Ltd.
- WANG, T., HUANG, X., JIANG, X., HU, M., HUANG, W. & WANG, Y. (2019) Differential in vivo hemocyte responses to nano titanium dioxide in mussels: Effects of particle size. *Aquatic Toxicology*, 28–36. Elsevier B.V.
- WANG, W., ZHANG, T., WANG, L., XU, J., LI, M., ZHANG, A., ET AL. (2016) A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 182–190. Elsevier Ltd.
- WANG, X., LI, Q., LIAN, J., LI, L., JIN, L., CAI, H., ET AL. (2014) Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics*, 15.
- WANG, Y., LI, M., STADLER, S., CORRELL, S., LI, P., WANG, D., ET AL. (2009) Histone

- hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184, 205–213.
- WANG, Y. & ROZEN, D.E. (2017) Gut Microbiota Colonization and *Nicrophorus vespilloides* throughout Development, 83, 1–13.
- WATANABE, T., TAKEDA, A., TSUKIYAMA, T., MISE, K., OKUNO, T., SASAKI, H., ET AL. (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: Retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes and Development*, 20, 1732–1743.
- WATKINS, A.J., LUCAS, E.S. & FLEMING, T.P. (2010) Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1, 87–95.
- WEI, L., XU, F., WANG, Y., CAI, Z., YU, W., HE, C., ET AL. (2018) The Molecular Differentiation of Anatomically Paired Left and Right Mantles of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 20, 425–435. *Marine Biotechnology*.
- WEINHOLD, A. (2018) Transgenerational stress-adaption : an opportunity for ecological epigenetics. *Plant Cell Reports*, 37, 3–9. Springer Berlin Heidelberg.
- WEINHOUSE, C. (2017) Mitochondrial-epigenetic crosstalk in environmental toxicology. *Toxicology*, 391, 5–17. Elsevier Ireland Ltd.
- WEISS, K.M. (2018) Evolution. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*. <https://doi.org/10.1002/9781118584538.ieba0167>.
- WEITERER, S., UHLE, F., LICHTENSTERN, C., SIEGLER, B.H., BHUJU, S., JAREK, M., ET AL. (2015) Sepsis induces specific changes in histone modification patterns in human monocytes. *PLoS ONE*, 10, 1–13.
- WENG, M. & WALKER, W.A. (2013) The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease*, 71, 233–236.
- WESTERN, D. (2001) Human-modified ecosystems and future evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5458–5465.
- WHITEN, A., HORNER, V. & DE WAAL, F.B.M. (2005) Conformity to cultural norms of tool use in chimpanzees. *Nature*, 437, 737–740.
- WICKHAM, H. (2016) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer.
- WICKHAM, H. & HENRY, L. (2017) Tidy: Easily tidy data with 'spread ()' and 'gather ()' functions. *R package version 0.6*, 1.
- WINTHER, R.G. (2001) August Weismann on germ-plasm variation. *Journal of the History of Biology*, 34, 517–555.
- WOODCOCK, D.M., LAWLER, C.B., LINSENMEYER, M.E., DOHERTY, J.P. & WARREN, W.D. (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7810–7816.
- WRIGHT, S.L., THOMPSON, R.C. & GALLOWAY, T.S. (2013) The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, 483–492. Elsevier Ltd.
- WU, H.J. & WU, E. (2012) The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, 3.
- YAMAMOTO, Y. & GAYNOR, R. (2005) Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States. *Current Molecular Medicine*, 1, 287–296.
- YANG, N. & KAZAZIAN, H.H. (2006) L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 763–771.
- YIN, J., LEAVENWORTH, J.W., LI, Y., LUO, Q., XIE, H., LIU, X., ET AL. (2015) Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201521740.
- YIN, J., ZHOU, M., LIN, Z., LI, Q.Q. & ZHANG, Y. (2019) Transgenerational effects benefit offspring across diverse environments: a meta-analysis in plants and animals. *Ecology Letters*, 1976–1986.
- YU, H., ZHAO, X. & LI, Q. (2016) Genome-wide identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster. *Scientific Reports*, 6, 20796.
- ZEMACH, A., MCDANIEL, I.E., SILVA, P. & ZILBERMAN, D. (2010) Genome-Wide Evolutionary

- Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 328, 916–919.
- ZHANG, G., FANG, X., GUO, X., LI, L., LUO, R., XU, F., ET AL. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49–54.
- ZHANG, G., HUANG, H., LIU, D., CHENG, Y., LIU, X., ZHANG, W., ET AL. (2015) N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 161, 893–906. Elsevier Inc.
- ZHANG, H. & ZHU, J.-K. (2011) RNA-directed DNA Methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 142–147.
- 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, 1–11.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. (2011a) A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 653–660.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. (2011b) Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 603–610.
- ZHANG, T., QIU, L., SUN, Z., WANG, L., ZHOU, Z., LIU, R., ET AL. (2014) The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 45, 141–150.
- 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, 1–15.
- ZHANG, Y. & REINBERG, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15, 2343–2360.
- ZHAO, L., SCHÖNE, B.R., MERTZ-KRAUS, R. & YANG, F. (2017) Sodium provides unique insights into transgenerational effects of ocean acidification on bivalve shell formation. *Science of the Total Environment*, 577, 360–366. Elsevier B.V.
- ZHAO, L., YANG, F., MILANO, S., HAN, T., WALLISER, E.O. & SCHÖNE, B.R. (2018) Transgenerational acclimation to seawater acidification in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: Preferential uptake of metabolic carbon. *Science of the Total Environment*, 627, 95–103. Elsevier B.V.
- ZHAO, X., YU, H., KONG, L., LIU, S. & LI, Q. (2016) High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two *Crassostrea* oysters identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- ZHOU, V.W., GOREN, A. & BERNSTEIN, B.E. (2011) Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, 12, 7–18.
- ZHOU, Z., WANG, L., SONG, L., LIU, R., ZHANG, H., HUANG, M. & CHEN, H. (2014) The identification and characteristics of immune-related MicroRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 9, 1–9.
- ZIEGLER, C., RICHTER, J., MAHR, M., GAJEWSKA, A., SCHIELE, M.A., GEHRMANN, A., ET AL. (2016) MAOA gene hypomethylation in panic disorder - Reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy. *Translational Psychiatry*, 6, 1–8. Nature Publishing Group.
- 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, 723–735.
- ZIMMER, C. (2012) Introduction à l'évolution Ce merveilleux bricolage de boeck.
- DE ZOYSA, M., NIKAPITIYA, C., WHANG, I., LEE, J.S. & LEE, J. (2009) Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 27, 639–646. Elsevier Ltd.

Figures and tables:

Figure 1: Experimental design for gold standard studies on intergenerational effects

Design 1 aims at deciphering the appropriate developmental window which will better integrate the environmental information and to study the persistence (or reversibility) of phenotypic response and chromatin states. Sampling across generation on different tissues and/or stages from individuals has to be performed. Tissue and stage have to be appropriate and relevant to the environmental effect.

Phenotypic traits on individuals (1, 2), chromatin states (3) and genetic based events (4) have to be followed across generation to investigate **how and to what extent are the chromatin states related to the phenotypic variation over generations**. Deciphering the chromatin states through multi-omic approaches may lead to epimarker design which are potential candidates for targeted epimutations (5). This targeted epimutation could allow to **investigate the adaptive nature of intergenerational effect and chromatin states**. Once the appropriate window is determined (Design 1), full factorial experiments where phenotypes are investigated in both control and stress environment across generation have to be designed (Design 2). Studies on a range of phenotypic traits on individuals (1) should allow **investigating the adaptive nature of the observed intergenerational effect and chromatin states**. The epimarkers have to be followed through the chain of transmission from soma to germ cells, from gamete to soma (6) to investigate the **chromatin state across generations**

Continuous arrow indicates sexual reproduction event and meiosis heritability. Dashed arrows indicate development and mitosis heritability.

*(1) Whether, the observed effect is a multi or a transgenerational effect will rely on the developmental window during which the individuals have been exposed. In the case of our proposed experimental design, we have considered that germ cells are present during exposure and therefore are indirectly exposed to the environment. Consequently, the F1 generation studies are restricted to multigenerational plasticity.

Table 1: Methods to study DNA methylation

Table 2: References about DNA methylation events in mollusks species

Table 3: Methods to study Histones

Table 4: References about intergenerational events in mollusks species

Figure 1: Experimental design for gold standard studies on intergenerational effects

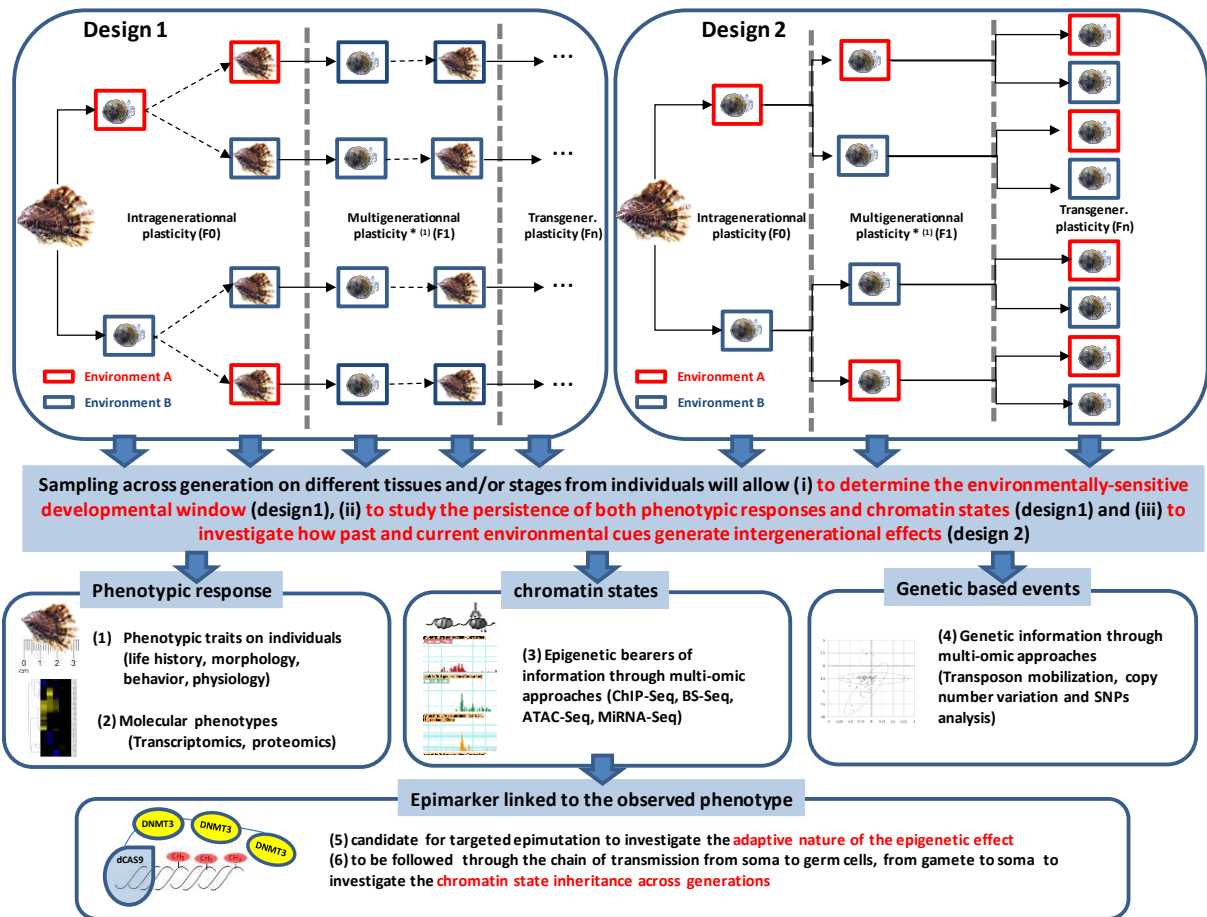


Table 1:

LC-MS/MS	
Mononucleotides generated after DNA digestion with DNA degradase are separated by liquid chromatography and analyzed by mass spectrometry. Allows for determination of the overall cytosine methylation level in a DNA sample. (Fneich et al. 2013)	Low resolution, Sensitive, Quantitative, Medium cost
CpG observed/expected (CpG o/e) ratios	
Higher mutability of methylated CpG introduces a bias in the observed CpG content. Calculating the ratio CpG o/e can infer the 5mC type. On line tools are available to calculate the ratio starting from input fasta files. Allows for prediction of DNA methylation type (Bulla et al. 2018)	Low resolution, fast, low cost, requires cDNA or gDNA sequences
Anti-5mC antibodies techniques	
<i>Anti-5mC antibodies are commercially available and can specifically recognize 5mC in DNA extracted samples</i>	
ELISA based kits are commercially available and allows the detection of 5mC overall variation in DNA samples (Geyer et al. 2017)	Low resolution, not sensitive, quantitative, fast, medium cost
Anti-5mC antibodies coupled with secondary antibody can detect 5mC overall variation in DNA samples spotted on nitrocellulose membrane using a simple Dot Blot assay (Luviano et al. 2018)	Low resolution, not sensitive, quantitative, fast, low cost
Anti-5mC antibodies can be used to immunoprecipitate DNA (MeDIP) which can subsequently be analyzed by highthrough put sequencing technology (or microarray). Method to determine the average level of cytosine methylation in a region, at the whole genome scale (Rivière et al. 2017)	High resolution, sensitive, quantitative, high cost
Methyl sensitive restriction assay	
<i>DNA samples are digested with methyl sensitive restriction enzymes</i>	
The methyl sensitive restriction assay can be analyzed by gel agarose separation . This allows to visualize a band shift in the sample digested with the non-sensitive enzyme compared to the sensitive one for which digestion event is more rare and size fragment are bigger (Fneich et al. 2013)	Low resolution, not sensitive, not quantitative, fast, low cost
The methyl sensitive restriction assay can be analyzed by AFLP . The restriction assay is followed by a ligation of adaptors to restriction fragments which can be PCR amplified with primers complementary to adaptor sequence. The amplified fragment can be visualized on gel electrophoresis or via capillary sequencing instrument. Allows for identification of genomic region which display differences of methylation between samples (Jiang et al, 2013)	Medium resolution ,Medium cost, Sensitive, Possible confounding effect with genetic diversity
The methyl sensitive restriction assay can be analyzed by qPCR using primers designed in CpG rich regions. Allows for identification of locus which display differences of methylation between samples (Ittiprasert et al. 2015)	Medium resolution, medium cost, fast, sensitive
Bisulfite treatment of gDNA	
<i>Treatment of DNA with sodium bisulfite converts cytosine residues to uracil, but leaves 5-methylcytosine residues unaffected</i>	

In the Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA), bisulfite treated DNA is PCR amplified, resulting in cytosine residues at initially methylated positions, and thymine residues at initially unmethylated position. Digestion with appropriate enzymes will allow for detection of methylation dependent retention or loss of CpG-containing restriction enzyme sites. Allows for detection of DNA methylation presence at a specific genomic locus	Medium resolution, sensitive, low cost, fast
PCR amplified fragments from bisulfite converted DNA are PCR amplified and analyzed by sanger sequencing (BS-PCR-Seq). Allows for identification of accurate 5mC position within a locus (Fneich et al. 2013, Geyer et al. 2017, Rondon et al. 2017)	Medium resolution, sensitive, quantitative, low cost, fast
Bisulfite converted DNA is analyzed by high throughput sequencing (BS-Seq). Allows for identification of accurate 5mC position at the whole genome scale (Rondon et al. 2017)	Very high resolution, sensitive, quantitative, very high cost ^{*(1)}

^{*(1)} BS-Seq analysis can be combined with other techniques which allow to decrease the sequencing effort and therefore the cost of the technique. Before bisulfite conversion, genomic regions containing 5mC or genomic region of interest can be enriched and therefore less sequencing effort is necessary to reach a good coverage of these regions of interest.

- The immunoprecipitation with antibodies which target Methyl Binding Domain proteins (MBD2/3 in mollusks) or antibodies which target 5mC (MB-Seq = combination of MeDIP and BS-Seq, (Jia et al., 2018) and ensure an enrichment of methylated DNA. This is worth in mollusk species since DNA methylation is organized in a mosaic pattern and long genomic regions are totally devoid of methylated DNA (Gavery & Roberts, 2013; Moroz & Kohn, 2013).

-Using exon capture probe to specifically target intragenic methylation is worth in mollusk species since DNA methylation is essentially intragenic. This can be applied in *C. gigas* in large range of samples (J. Vidal-Dupiol, personal communication).

- Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) uses a restriction enzyme which specifically cuts in CGs and therefore ensure enrichment for CpG regions of the genome. This technique has not been applied in mollusks yet and is not suitable for mosaic type DNA methylation.

Table 2: References about DNA methylation and histone modifications events in mollusks species:

DNA methylation				
<i>References about DNA methylation events in mollusks species</i>				
Specie	Taxonomy	Reference	Function	Method
<i>Aplysia</i>	<u><i>Aplysiidae</i></u>	Rajasethupathy et al. 2012	Memory formation	Bisulfite conversion
<i>Aplysia</i>	<u><i>Aplysiidae</i></u>	Moroz and Kohn, 2013	Senescence	DNA methylation assays
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<u><i>Planorbidae</i></u>	Fneich et al, 2013	Description	Bisulfite conversion
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<u><i>Planorbidae</i></u>	Geyer et al, 2017	Biotic stress	Bisulfite conversion
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<u><i>Planorbidae</i></u>	Ittiprasert et al, 2015	Biotic stress	Methylation-sensitive qPCR
<i>Cantareus aspersus</i>	<u><i>Helicidae</i></u>	Nica et al, 2017 (a)	Abiotic stress	ELISA
<i>Cantareus aspersus</i>	<u><i>Helicidae</i></u>	Nica et al, 2017 (b)	Abiotic stress	ELISA
<i>Chlamys farreri</i>	<u><i>Pectinidae</i></u>	Sun et al, 2014	Description	MSAP
<i>Chlamys farreri</i>	<u><i>Pectinidae</i></u>	Lian et al, 2015	Aging	ELISA
<i>Crassostrea gasar</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Farias et al, 2017	Biotic stress	ELISA
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Wei et al, 2018	Description	Pyrosequencing/Sodium bisulfite
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Sussarellu et al, 2018	Abiotic stress/Development	UV-HPLC/MEDIP
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Rondon et al, 2017	Abiotic stress/Transgenerational	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Gavery and Roberts, 2010	Description	MS-PCR/BS-PCR
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Olson and Roberts, 2014a	Transgenerational	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Olson and Roberts, 2014b	Description	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Jiang et al, 2016	Transgenerational	F-MSAP
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Wang et al, 2014	Description	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Gavery and Roberts, 2013	Gene expression	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Jiang et al, 2013	Description	AFLP/MSAP
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Saint-Carlier and Riviere, 2015	Gene regulation	BS-Seq
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Song et al, 2017	Gene expression	BS-Seq

<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Riviere et al, 2017	Development	MeDIP
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Riviere et al, 2013	Development	MeDIP
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Gonzalez-Romero et al, 2017	Biotic stress	MSAP
<i>Haliotis discus hannai</i>	<u><i>Haliotididae</i></u>	Kong et al, 2017	Abiotic stress	MSAP
<i>Lymnae</i>	<u><i>Lymnaeidae</i></u>	Forest et al, 2016	Long term memory, Biotic stress	DNA methylation inhibitor
<i>Octopus vulgaris</i>	<u><i>Octopodidae</i></u>	Díaz-Freije et al, 2014	Development	MSAP
<i>Octopus vulgaris</i>	<u><i>Octopodidae</i></u>	García-Fernández et al, 2017	Development/Abiotic stress	MSAP/ELISA
<i>Physa acuta</i>	<u><i>Physidae</i></u>	Bal et al, 2017	Abiotic stress	Global DNA methylation assay
<i>Physa acuta</i>	<u><i>Physidae</i></u>	Muller et al. 2016	Abiotic stress and development	DNA methylation assay
<i>Physa acuta</i>	<u><i>Physidae</i></u>	Sánchez-Argüello et al, 2016	Abiotic stress and development	MSAP
<i>Pinctada fucata</i>	<u><i>Pteriidae</i></u>	Li et al, 2015	blesure biotic or abiotic?	MSAP
<i>Pinctada fucata</i>	<u><i>Pteriidae</i></u>	Li et al, 2014	Development	MSAP
<i>Saccostrea glomerata</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Tran et al, 2016	Oestrogen/Metabolism?	Bisulfite conversion
<i>Xenostrobus securis</i>	<u><i>Mytilidae</i></u>	Ardura et al, 2017	Adaptation	MSAP
<i>Zeacumantus subcarinatus</i>	<u><i>Batillariidae</i></u>	Joe, 2013	Biotic stress	ELISA
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<u><i>Tateidae</i></u>	Thorson et al, 2017	Adptation to habitat	MeDIP
Histones modification				
<i>References about histones modification events in mollusks species</i>				
<i>Aplysia</i>	<u><i>Aplysiidae</i></u>	Guan et al, 2002	Memory formation	ChIP
<i>Aplysia</i>	<u><i>Aplysiidae</i></u>	Chen et al, 2014	Memory formation	Fluorescence imaging
<i>Aplysia</i>	<u><i>Aplysiidae</i></u>	Hart et al, 2011	Memory formation	ChIP
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<u><i>Planorbidae</i></u>	Bouchut et al, 2006	Biotic stress	SDS-Page
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<u><i>Planorbidae</i></u>	Adema et al, 2010	Biotic stress	Microarray scanning/qPCR
<i>Chlamys farreri</i>	<u><i>Pectinidae</i></u>	Li et al, 2006	Description/Evolution	Homology cloning
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Fellous et al, 2015	Abiotic stress	ELISA
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Fellous et al, 2014	Reproduction/Development	RT-qPCR
<i>Crassostrea gigas</i>	<u><i>Ostreidae</i></u>	Bouilly et al, 2010	Description	PCR/FISH

<i>Crassostrea virginica</i>	<u>Ostreidae</u>	Gonzalez-Romero et al, 2017	Biotic stress	Western blot
<i>Helix lucorum</i>	<u>Helicidae</u>	Danilova et al, 2010	Memory formation	Western blot
<i>Helix lucorum</i>	<u>Helicidae</u>	Danilova and Grinkevich, 2012	Memory formation	Western blot
<i>Helix lucorum</i>	<u>Helicidae</u>	Grinkevich, 2014	Memory formation	Western blot
<i>Lucina pectinata</i>	<u>Lucinidae</u>	Montes-Rodriguez et al, 2018	Description	DNA-RNA sequencing/BLAST
<i>Several mollusks species</i>		Ausio, 1992	Description	Electrophoresis
<i>Mytilus edulis</i>	<u>Mytilidae</u>	Albig et al, 2003	Description	Cloning/BLAST
<i>Mytilus edulis</i>	<u>Mytilidae</u>	Drabent et al, 1999	Description	Cloning/Rotating Field Electrophoresis
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<u>Mytilidae</u>	Gonzalez-Romero et al, 2012	Description	PAGE
<i>Mytilus spp</i>	<u>Mytilidae</u>	Eirin-Lopez et al, 2002	Description/Evolution	FISH
<i>Mytilus spp</i>	<u>Mytilidae</u>	Eirin-Lopez et al, 2004	Description/Evolution	PCR amplification/ FISH
<i>Mytilus</i>	<u>Mytilidae</u>	Rivera-Casas et al, 2016	Description	BLAST/PCR/qPCR
<i>Octopus vulgaris</i>	<u>Octopodidae</u>	Mennella et al, 2002	Reproduction/Description	RP-HPLC
<i>Pomacea canaliculata</i>	<u>Ampullariidae</u>	Ottaviani et al, 2013	Biotic stress	Western blot
<i>Sepia officinalis</i>	<u>Sepiidae</u>	Kurt et al, 2007	Spermatogenesis	Western blot
<i>Zeacumantus subcarinatus</i>	<u>Batillariidae</u>	Joe, 2013	Biotic stress	SDS-Page

Table 3:

Anti-modified histones antibodies techniques applied on protein extracts	
<i>Anti-histones marks antibodies are commercially available and can specifically recognize histones marks in proteins extracted samples</i>	
SDS-PAGE / Western-Blot : protein extracts are separated by SDS PAGE, the gel is transferred on a membrane and revelation is performed using an antibody which targets a specific histone mark. It allows the detection of modified histone overall variation between samples (Gonzalez-Romero et al., 2017).	Low resolution, not sensitive, quantitative, fast, medium cost
ELISA based kits are commercially available and allows for the detection of modified histones using antibodies targeting specific histone marks in proteins samples extracted from tissues, it allows the detection of modified histone overall variation between samples (Fellous et al., 2015)	Low resolution, not sensitive, quantitative, fast, medium cost, more expensive than Western-Blot.
Anti-modified histones antibodies techniques applied on chromatin extracts – Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP)	
<i>Anti-histones marks antibodies are used to immunoprecipitate chromatin extracted from tissue samples</i>	
Immunoprecipitated DNA is analysed by qPCR(ChIP-qPCR) (Guan et al., 2002) and allows for comparison of histone enrichment profile at a specific locus between several samples.	Medium resolution, quantitative, medium cost
Immunoprecipitated DNA is analysed by high throughput sequencing techniques (ChIP-Seq) or by microarray (ChIP on chip). Allows for accurate localization of modified histone peaks at the whole genome scale (Never applied in mollusk species), possible quantitative comparison of histone enrichment profile between two samples	High resolution, quantitative, very high cost
Immunoprecipitated DNA is bisulfite treat and analysed by high throughput sequencing techniques (ChIP-BS-Seq). Allows to investigate the cross talk between DNA methylation and chromatin features (Brinkman et al., 2012).	High resolution, quantitative, very high cost
Studies on histones modifying enzymes	
<i>Histone modifying enzymes are highly conserved and can be targeted in a wide range of species</i>	
Commercially available inhibitors of histones modifying enzymes can be used and subsequent phenotype can be registered following treatment. (Chen et al., 2014, Geyer et al. 2017)	Low resolution, low cost, fast, correlative analysis
Analysis of expression of histone modifying enzyme by qPCR analysis or commercially available ELISA assay may indicate variation in modified histones between samples (Fellous et al 2015)	Low resolution, medium cost, fast, correlative analysis
Imaging techniques	
<i>Identification and visualization of histones coding genes and modified histone proteins</i>	
Interphase chromosome can be hybridised with fluorescent DNA probed targeting histones loci (Fluorescence in situ hybridisation (FISH)) (Bouilly et al., 2010)	Qualitative, medium cost, time consuming
Nuclei from tissue sections can be targeted by antibodies targeting modified histones and revealed by immunofluorescence (Immunolocalisation). Allows for detection of particular histone marks in samples (Odoelman et al. 2009)	Qualitative, medium cost, time consuming
Gene and protein analysis techniques	

<i>Identification and molecular description of histone</i>	
Proteins like histones can be purified with high-pressure liquid chromatography (HPLC) , this technique coupled with mass spectrometry allows to detect and characterized chemical structure of proteins (Mennella et al., 2002)	Qualitative, medium cost, low resolution
Identification of core histones genes and histones variants are possible via PCR, homology search and sequencing (Li et al., 2006)	Qualitative, low cost, medium resolution

Table 4:

Intergenerational effects								
<i>References about intergenerational events in mollusks species</i>								
Specie	Taxonomy	Reference	Environmental factor	Timing of exposure	Offspring trait	Timing of phenotypic measurements	Nb of generations	Type of effect
<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Planorbidae</i>	<i>Plautz et al. 2013</i>	<i>Predation</i>	<i>Post-embryonic to adult</i>	<i>survival challenges to contaminants (cadmium, malathion)</i>	embryonic to post-embryonic	2	multi
<i>Chlamys farreri</i>	<i>Pectinidae</i>	<i>Yue et al, 2013</i>	<i>bacterial challenge</i>	<i>Adult</i>	<i>bactericidal effet, increase expression of mRNA, survival</i>	eggs, embryonic and post-embryonic	2	multi
<i>Crassostrea gasar</i>	<i>Ostreidae</i>	<i>Green et al. 2016</i>	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	<i>Adult</i>	<i>survival to exposure</i>	post-embryonic	2	multi
<i>Crassostrea gasar</i>	<i>Ostreidae</i>	<i>Lafont et al 2019</i>	<i>Ostreid herpesvirus 1</i>	<i>Adult</i>	<i>survival to exposure</i>	post-embryonic	2	multi
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Ostreidae</i>	<i>Rondon et al, 2017</i>	<i>Herbicide (diuron)</i>	<i>Adult</i>	<i>DNA methylation</i>	embryonic	2	multi
<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Ostreidae</i>	<i>Jiang et al, 2016</i>	<i>None</i>	<i>Adult</i>	<i>Transmission of methylated loci</i>	None	2	multi
<i>Helisoma trivolvis</i>	<i>Planorbidae Physidae</i>	<i>Suski et al. 2012</i>	<i>Salinity</i>	<i>post-embryonic to adult</i>	<i>hatching success, time-to-hatch)</i>	embryonic	2	multi

<i>Physa pomillia</i>								
<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Lymnaeidae</i>	Reategui-Zirena et al 2017	Contaminant (cadmium)	Adult	hatching success, time to hatch, juvenile survival	embryonic to post-embryonic	2	multi
<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Lymnaeidae</i>	Fidder et al. 2016	Fungicide (pyraclostrobin)	Adult	hatching success, time to hatch	embryonic	2	multi
<i>Mercenaria mercenaria</i> <i>Argopecten irradians</i>	<i>Veneridae</i> <i>Pectinidae</i>	Griffith & Gobler 2017	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	survival, development, size	post-embryonic	2	multi
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Mytilidae</i>	Fitzer et al. 2014	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	shell composition	post-embryonic	2	multi
<i>Mytilus edulis</i>	<i>Mytilidae</i>	Kjong et al, 2019	Acidification, hypoxia	Adult and embryos	fertilization, deformation, shell length	embryonic to post-embryonic	2	multi
<i>Mytilus chilensis</i>	<i>Mytilidae</i>	Diaz et al. 2018	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	shell length, ingestion rate	post-embryonic	2	multi
<i>Nucella lapillus</i>	<i>Muricidae</i>	Donelan & Trussel 2018	Predation	Adult	behaviour, tissue growth, growth efficiency	post-embryonic	2	multi
<i>Nucella lapillus</i>	<i>Muricidae</i>	Donelan & Trussel 2018	Predation	Adult	offspring size at emergence	embryonic	2	multi
<i>Nucella lapillus</i>	<i>Muricidae</i>	Donelan & Trussel 2015	Predation	Adult	behaviour, foraging, mass	post-embryonic	2	multi
<i>Physa acuta</i>	<i>Physidae</i>	Beaty et al 2016	Predation	Post-embryoniand adult	behaviour, shell size, shape, crush-resistance	post-embryonic/adult	2	multi

<i>Physa acuta</i>	<i>Physidae</i>	Luquet & Tariel 2016	Predation	post-embryonic to adult	behaviour, weight, shell thickness, shell size, shape	Adult	2	multi
<i>Physa acuta</i>	<i>Physidae</i>	Tariel et al. 2019	Predation	post-embryonic to adult	behaviour, weight, shell thickness, shell size, shape	Adult	3	trans
<i>Physa acuta</i>	<i>Physidae</i>	Bal et al, 2017	Synthetic molecule (glucocorticoid)	Adult	survival, hatching success shell length, shell thickness shell structure, shell calcification	embryonic to adult	3	multi
<i>Physa acuta</i>	<i>Physidae</i>	Muller et al, 2016	Endocrine-disruptor (Vinclozolin)	Adult	Size, mortality, deformation		3	multi
<i>Physa pomilia</i>	<i>Physidae</i>	Plautz & Salice 2013	Contaminant (cadmium)	Adult	juvenile survival challenges to contaminants (cadmium)	post-embryonic	2	multi
<i>Physa pomilia</i>	<i>Physidae</i>	Kimberly & Salice 2014	Contaminant (cadmium)	Embryonic and post-embryonic	hatching success	embryonic	2	multi
<i>Ruditapes philippinarum</i>	<i>Veneridae</i>	Zhao et al. 2017 Zhao et al. 2018	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	shell growth, Na/Ca ratio shell growth, condition index, standard metabolic rate, delta C13	post-embryonic	2	multi
<i>Saccostrea glomerata</i>	<i>Ostreidae</i>	Parker et al. 2017	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	growth and developmental rates, survival, standard metabolic rate	post-embryonic	2	multi
<i>Saccostrea glomerata</i>	<i>Ostreidae</i>	Parker et al. 2015	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	survival, shell length, developmental rate	post-embryonic	3	multi
<i>Saccostrea glomerata</i>	<i>Ostreidae</i>	Parker et al. 2012	pH/pCO ₂ /Acidification	Adult	survival, shell length, developmental rate	post-embryonic	2	multi

Chapitre 2 : Influence de différents types de stress sur la réponse multi/transgénérationnelle des huitres

I. Introduction et principaux résultats

Des facteurs environnementaux abiotiques ou biotique peuvent induire des changements phénotypiques chez les individus touchés (González-Romero et al., 2012; Schwindt, 2015) et ce parfois de façon transgénérationnelle. Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu étudier l'influence d'un stress abiotique (une exposition au diuron) sur la descendance et d'un stress biotique (une exposition précoce à une microflore environnementale) sur les huitres exposées et leurs descendants sur deux générations successives. Ces deux expériences font l'objet de ce chapitre.

1. La réponse à un stress abiotique : le diuron

L'étude de la réponse à un stress abiotique a été réalisée au cours de la thèse de Rodolfo Rondon, thèse effectuée dans le cadre du projet ANR GIMEPEC (Génotoxicité, Immunotoxicité et rEprotoxicité des Pesticides chez *Crasostrea gigas*, ANR CESA-01601, coordinatrice F. Akcha).

L'utilisation de produits phytosanitaires, notamment dans le domaine agricole peut conduire à l'accumulation de ces substances chimiques dans les sols. Le diuron est un pesticide herbicide persistant interdit d'usage en France depuis 2008 mais encore détecté à de fortes concentrations sur les côtes françaises et dans les estuaires (Caquet et al., 2013) où il peut affecter les espèces marines dont les huitres. Les huitres sont plus sensibles aux stress environnementaux pendant la gamétogénèse où la reproduction nécessite la majorité de l'énergie. Les descendants des huitres exposées au diuron pendant la gamétogénèse subissent des effets génotoxiques et immunotoxiques. Ils pourraient alors être plus susceptibles à d'autres pressions environnementales comme les infections. De plus, plusieurs études ont montré l'impact de contaminations environnementales sur la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones chez différentes espèces (Collotta et al., 2013; Alonso-Magdalena et al., 2016; Skinner, 2016).

La thèse de Rodolfo Rondon (doctorant au laboratoire IHPE de 2012 à 2015) avait pour objectif d'étudier l'impact d'une exposition parentale au diuron, sur le transcriptome et le méthylome des larves. J'ai eu la chance, au cours de mon master 2 et au début de ma thèse, de pouvoir contribuer à l'analyse des données de méthylation produites au cours de la thèse de Rodolfo. J'ai ainsi pu me familiariser avec les outils d'analyse de méthylation et ai pu participer à la valorisation d'une partie des travaux de Rodolfo.

Ces travaux ont permis via séquençage bisulfite massif du génome (Figure 21), de mettre en évidence l'impact intergénérationnel de l'exposition au diruon sur les huitres.

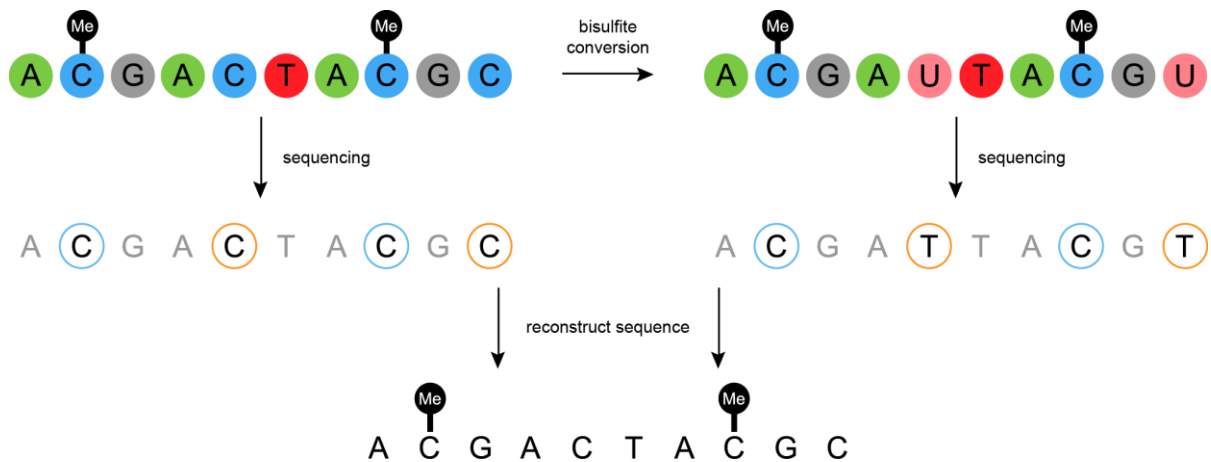


Figure 21 : Principe de la conversion de l'ADN au bisulfite.

Le traitement au bisulfite des séquences d'ADN entraîne la conversion des cytosines non méthylées en uraciles. Après séquençage, la comparaison entre la séquence d'origine et la séquence convertie via bisulfite permet l'identification des cytosines méthylées.

Ainsi, 236 zones différemment méthylées (DMRs pour *Differentially Methylated Regions*) entre des larves issues de parents exposés au diruon et des larves issues de parents qui n'ont pas été exposés, ont été identifiées comme directement impactées par l'exposition au pesticide. Parmi ces différences, un nombre semblable d'hyper et d'hypo méthylation (121 vs. 115) a été observé. Ces DMRs sont majoritairement retrouvées dans des zones intragéniques et préférentiellement en fin de région codante (derniers exon et intron). Une analyse ciblée a ensuite été réalisée sur 10 DMRs, présentant les différences les plus importantes entre conditions. Parmi ces DMRs, 2 ont été identifiées comme pouvant servir d'indicateur de la pollution marine avec un niveau de confiance de 85.7%.

Ce travail a été le premier à étudier les effets intergénérationnels d'un polluant sur les marques épigénétiques d'une espèce aquatique. Il a permis la mise en évidence de l'impact de polluants chimiques comme le diruon sur le méthylome de descendants d'huitres exposées. En revanche, le lien entre méthylation et expression chez ces descendants n'a pas pu être établi, seulement quelques gènes ayant été identifiés comme différemment méthylés entre conditions. De même, l'existence d'un lien entre méthylation de l'ADN et abondance ou épissage des ARNs n'a pas pu être avéré.

2. Les effets d'un stress biotique : une exposition microbienne précoce

Les huitres juvéniles subissent des mortalités alarmantes qui menacent la filière ostréicole en France mais également dans le reste du monde. Ces mortalités ont été identifiées comme dues au « Pacific Oyster Mortality Syndrome » (POMS), un syndrome infectieux décimant jusqu'à 100% des larves (Segarra et al., 2010; Martenot et al., 2011; Barbosa Solomieu et al., 2015). Le mécanisme de la

pathogénèse du POMS a été identifié par De Lorgeril et al., 2018, montrant l'implication centrale du virus OsHV1- μ var. Ce virus colonise les tissus de l'huitre et induit chez celle-ci une immunosuppression, permettant une seconde infection par des bactéries opportunistes, qui vont tuer l'huitre par septicémie. Même si les causes microbiennes de ces mortalités sont maintenant clairement identifiées, il n'existe à l'heure actuelle pas de solution prophylactique pour protéger les huitres de cette maladie. C'est de ce postulat, de travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur le priming immunitaire chez l'huitre, et du projet Decipher qu'a émergé le projet Transgigas dont l'objectif est d'améliorer la survie des huitres au POMS via une exposition microbienne précoce. L'hypothèse est qu'une telle exposition va stimuler le système immunitaire des larves, avant qu'elles ne rencontrent la maladie pour la première fois.

Cette thèse est adossée au projet Transgigas et les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont essentiellement porté sur l'étude de cette exposition microbienne précoce. Ainsi, les larves d'huitres de deux familles présentant des phénotypes contrastés de réponse à la maladie (Famille 11, phénotype sensible et famille 32 phénotype intermédiaire) ont été exposées juste après la fécondation à une flore environnementale microbienne. Les effets de cette exposition sur les huitres ont été testés plus tard dans la vie des individus, lors d'une induction du syndrome de mortalité POMS. L'exposition à la microflore environnementale a modifié le microbiote des huitres sur au moins deux générations (F1 exposée et F2 descendance des parents exposés). L'exposition a également eu un impact sur le transcriptome des larves et des gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont été surexprimés chez les huitres exposées par rapport aux huitres élevées en condition contrôle. Lors de l'induction du POMS, une amélioration de la survie des huitres exposées par rapport aux huitres contrôle a été observée. Cette amélioration de la survie a également été observée chez les deux générations suivantes (F2 et F3), bien que l'exposition à la microflore environnementale n'ait été effectuée que sur la génération F1, mettant en évidence un effet transgénérationnel. La réponse transcriptomique à POMS a également été étudiée ce qui a notamment révélé une surexpression de gènes impliqués dans l'immunité à la F1 mais également à la F2. Les déterminants génétiques et épigénétiques de ce phénotype ont été étudiés révélant la présence de régions différenciellement méthylées entre individus de la condition exposée et de la condition contrôle sur les deux générations (F1 et F2). Une absence de sélection génétique due à l'exposition survenue à la F1 a également été démontrée.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois un effet immunitaire mémoriel et transgénérationnel chez *C. gigas*. Nos résultats suggèrent qu'une interaction complexe entre le microbiote et la mémoire immunitaire innée est responsable de la transmission du phénotype et que des modifications épigénétiques interviennent dans cette interaction.

II. Article 1 : Effet d'une exposition parentale au diuron sur le méthylome de larves de l'huitre du Pacifique

Publication : "Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome."

RONDON Rodolfo, GRUNAU Christoph, FALLET Manon, CHARLEMAGNE Nicolas, SUSSARELLU Rossana, CHAPARRO Cristian, MONTAGNANI Caroline, MITTA Guillaume, BACHERE Evelyne, AKCHA Farida et COSSEAU Céline

Article publié dans Environmental Epigenetics en 2017.

RESEARCH ARTICLE

Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome

Rodolfo Rondon^{1,2}, Christoph Grunau², Manon Fallet²,
Nicolas Charlemagne³, Rossana Sussarellu³, Cristian Chaparro²,
Caroline Montagnani¹, Guillaume Mitta², Evelyne Bachère¹, Farida Akcha³
and Céline Cosseau^{2,*}

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

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

and ³Ifremer, Department of Biogeochemistry and Ecotoxicology, Laboratory of Ecotoxicology, Rue de l'île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France

*Correspondence address. IHPE UMR 5244, Université de Perpignan via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France.

Tel: +33(0)4-68-66-21-80; Fax: 33 (0)4-68-66-22-81; E-mail: celine.cosseau@univ-perp.fr

Abstract

Environmental epigenetic is an emerging field that studies the cause–effect relationship between environmental factors and heritable trait via an alteration in epigenetic marks. This field has received much attentions since the impact of environmental factors on different epigenetic marks have been shown to be associated with a broad range of phenotypic disorders in natural ecosystems. Chemical pollutants have been shown to affect immediate epigenetic information carriers of several aquatic species but the heritability of the chromatin marks and the consequences for long term adaptation remain open questions. In this work, we investigated the impact of the diuron herbicide on the DNA methylation pattern of spat from exposed *Crassostrea gigas* genitors. This oyster is one of the most important mollusk species produced worldwide and a key coastal economic resource in France. The whole genome bisulfite sequencing (WGBS, BS-Seq) was applied to obtain a methylome at single nucleotide resolution on DNA extracted from spat issued from diuron exposed genitors comparatively to control spat. We showed that the parental diuron exposure has an impact on the DNA methylation pattern of its progeny. Most of the differentially methylated regions occurred within coding sequences and we showed that this change in methylation level correlates with RNA level only in a very small group of genes. Although the DNA methylation profile is variable between individuals, we showed conserved DNA methylation patterns in response to parental diuron exposure. This relevant result opens perspectives for the setting of new markers based on epimutations as early indicators of marine pollutions.

Key words: *Crassostrea gigas*; mollusk; DNA methylation; herbicide; epigenetic

Received 13 December 2016; revised 14 February 2017; accepted 7 March 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Introduction

The role of environmental stressors in altering the physiological performance of aquatic wildlife is a fundamental topic that has recently attracted strong attention. Chronic environmental exposure to chemical compounds, including metals, pesticides, endocrine disrupting compounds can affect the behavior, and the physiological or developmental performance of aquatic organisms [1, 2]. Environmental epigenetics investigates the cause–effect relationships between specific environmental factors and the subsequent epigenetic modifications [3–7]. Chromatin structure is generally admitted as the epigenetic element of non-genetic inheritance system. Chromatin is a complex of DNA associated to proteins and epigenetic information carriers are the element which influences its structure. Non-coding RNA, methylation of cytosine residues and histone post translational modification are the main epigenetic information bearers known to affect chromatin structure. The epigenotype is mitotically and to some degree meiotically heritable, but unlike in the genotype, changes in the epigenotype are reversible. Therefore, the epigenetic information system (EIS, epigenetics) can provide heritable, novel phenotypes without variation in DNA sequence [8, 9]. The production of this heritable phenotypic variation may be essential for evolution [10] or may result in mal-adaptation of an organism experiencing changing environments as exemplified by several emerging disease disorders [11–13]. Various environmental contaminations have been shown to alter DNA methylation and histone patterns in animal species [14–17]. Currently, most of evidence of the association of altered epigenotypes and phenotypic disorders is provided from laboratory animal models and human epidemiological studies. Despite the extensive use of aquatic organisms in an ecotoxicological context, only a few studies provide information about the epigenetic mechanisms that may influence phenotypic variations in response to environmental factors in aquatic species [2, 18–22].

Amongst hazardous substances, diuron (N0-[3,4-dichlorophenyl]-N,N-dimethyl-urea) is a biologically active and quite persistent pollutant present in soil, water and sediments. This herbicide was used to eradicate weeds in non-agricultural areas (roadsides, railways, parks, etc.) [23]. Diuron is prohibited in France since 2008 as a phytosanitary substance and as a biocide since 2009 (Directive 2008/91/EC). But, since it is not well degraded naturally [24], it is still detected at high concentrations in French coastal and fresh waters [25]. Consequently, it is considered as a potential Persistent Organic Pollutants (POP), and is currently evaluated under the Stockholm Convention (<http://chm.pops.int>) [26]. Diuron's ecotoxicological impacts have been studied on several aquatic species [27–29] including invertebrates of economic interest such as the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. This species is reared in coastal areas (estuaries, lagoons and open sea) under the persistent threat of chemical pollution pressure. *C. gigas* is a successive and irregular protandrous hermaphroditic mollusc. Gonads are diffuse and non-permanent and their development is strongly influenced by seasonal seawater temperature variations upon which oysters release sperm and eggs into the seawater. Within 6h, fertilized eggs develop into embryo and larvae in a planktonic stage lasting 2–3 weeks before entering metamorphosis leading to settlement to a solid substrate [30]. A few studies have investigated the gonadal and germline establishment in this species during development. However, following an orthologous to the vasa gene (called Oyvlg), Fabioux et al. [31] were able to follow primordial germ cells (PGCs) that would arise from 4day blastomeres, hence

suggesting that the PGCs specification mode in this species is preformation, i.e. maternally inherited [31–33]. Genomic and epigenomic resources for this species have recently become available [34, 35] and DNA methylation has been recently suggested to be involved in phenotypic variation in this organism [36]. The main goal of the present study was to determine how a parental exposure to the herbicide diuron can affect the DNA methylation pattern in *C. gigas* offspring. Some results were previously obtained demonstrating both direct and indirect effects of the parental herbicide exposure on oyster genome. A genotoxic effect has been detected through the evidence of primary DNA damages in both somatic, germinal and reproductive cells of diuron-exposed genitors [37, 38]. Moreover, the vertical transmission of damaged DNA was confirmed by the detection of chromosomal abnormalities in the offspring (DNA aneuploidy) [38]. By a transcriptional approach, we showed that exposure of oyster genitors to diuron at environmental concentrations affected gene expression including genes encoding enzymes involved in DNA methylation machinery [39]. In the offspring, a RNA-seq analysis demonstrated significant change in the transcriptional profile on F1 spat as well [40] that could explain developmental and growth impairment observed in F1 early life stages [37, 38].

In our study, we showed that a parental diuron exposure strongly affected spat DNA methylation pattern predominantly in intragenic regions and we discussed the possible consequences of this change on molecular phenotypes.

Results

Parental Diuron Exposure Causes Differential DNA Methylation in the Offspring

Whole Genome Bisulfite Sequencing was performed on three biological replicates for two investigated conditions (diuron-exposed (D) and seawater control (SWC)). Sequencing of the samples yielded 620 166 410 100bp illumina paired-end reads, with an average of 103 361 068 paired-end reads by library (Supplementary Fig. S1). After quality control and alignment, an average of 36 965 778 (17.9%) reads by library was mapped (Supplementary Fig. S1).

On average, 16.6% of CpGs and 0.5% of CHH were found methylated, and the total methylation was 2.0% (5 mC of total DNA). There was no statistically significant difference in global methylation between D and SWC samples. The clustering analysis showed that the methylation profile obtained in exposure sample did not differ globally compared to the SWC as the different samples did not cluster according to their treatment (Fig. 1). For the three individual samples analyzed per group, parental diuron exposure did not globally modify the DNA methylation. Distance method used to produce the clustering is Pearson. We reasoned that if the epimutation rate would be higher in the diuron treated samples then the control samples should cluster together. Pearson correlation is also considered very sensitive to outliers. Strong differences in epimutation rates within diuron samples should produce such outliers, which is not the case. Consequently, differential methylation was restricted to specific regions. After visual inspection of methylation profiles we decided to use a window size of 500bp for further analysis. Of the total of 1 124 112 500bp windows of the genome in average 251 069 fulfilled the criterion of 10× coverage (Supplementary Fig. S1). However, in one sample, due to relatively poor coverage, only 57 819 windows were ≥10-fold covered. Within these 57 819 eligible windows, we found 1967

differentially methylated regions (DMRs) (3.4% of eligible windows): 1060 were hypermethylated and 907 hypomethylated in the D compared to SWC samples (Supplementary Table S2, sheet “MethDiff - Global results”).

Target-Induced DMRs Occur Predominantly in Genes

Although the 1967 detected regions were statistically significantly differentially methylated between the D and the SWC individuals, it appeared that in many cases one individual among the three was less impacted. Therefore, we thoroughly examined the 1967 detected regions one by one to retain only those that are affected in the same way in the three biological replicates. This led to the selection of 236 DMRs (12% of DMRs, 0.4% of eligible windows). We therefore identified two types of epimutations: (i) environment-induced epimutations (in 0.4% of the epigenome, epimutation rate 4×10^{-3}), and (ii) spontaneous epimutations (in 3% of the epigenome, epimutation rate 3×10^{-2}). Following an earlier naming convention, we used the term “targeted epimutation” for type 1 epimutation, and “random epimutations” for type 2 [41]. Among the targeted DMRs, 121 were hypermethylated and 115 hypomethylated in D compared to SWC samples (Supplementary Table S2). The majority of these DMRs (73.2%) were found in genes, with 38.2% and 34.8% localized in exons and introns, respectively (Supplementary Table S2). Intergenic regions contain 30% DMRs among which 0.7% were found in putative promoter regions (only two DMRs). The distribution of hypermethylated and hypomethylated regions follows roughly the same pattern (Fig. 2, Supplementary Table S2). We found 170 DMRs located within genes of which 83 were hypermethylated and 87 hypomethylated (Supplementary Table S2, sheet “MethDiff—targeted epi hyper” and sheet “MethDiff—targeted epi hypo”). We further investigated the accurate location of the DMRs within the genes. 36.4% of the exon specific DMRs occurred in the last exon genes. 25.5% of the intron specific DMRs occurred in the last intron genes (Fig. 2). This overrepresentation of the DMRs was not observed in the first exon of genes if we counted the number of DMRs from the first exon position (data not shown). Therefore, we observed that DMRs preferentially occurred at the end of the coding sequences.

Interestingly, we found several genes strongly affected by the parental diuron exposure (Fig. 3 and Supplementary Fig. S2). For these candidates, several 500bp DMRs accumulates within the coding sequence. XLOC_005912 (CGI_10018082) encodes an uncharacterized protein with two conserved domains, one found in chromosome partitioning proteins and another one found in mitochondria eating proteins. It contained 63 intragenic CpG sites in a 1.437 kb window which were strongly methylated in the three SWC biological replicates. All these sites were poorly methylated in the three samples from the D individuals. XLOC_030549 (CGI_10011718) encodes a serine protease with domains found in fibrinolytic proteins. 16 strongly methylated CpG sites were found in a 1.132 kb window upstream of the transcriptional start site in the SWC group. These sites were unmethylated in the D group. The scaffold309 from position 131250 to position 137240 contains 67 CpG sites highly methylated in the individuals from D group compared to SWC group. This region contained four transposon-like elements (XLOC_019653, XLOC_019654, XLOC_019655, XLOC_019656) for which transcripts had been detected in previous RNA-Seq experiment [40]. In summary, among the 1967 differentially methylated regions, we found 12% which were targeted

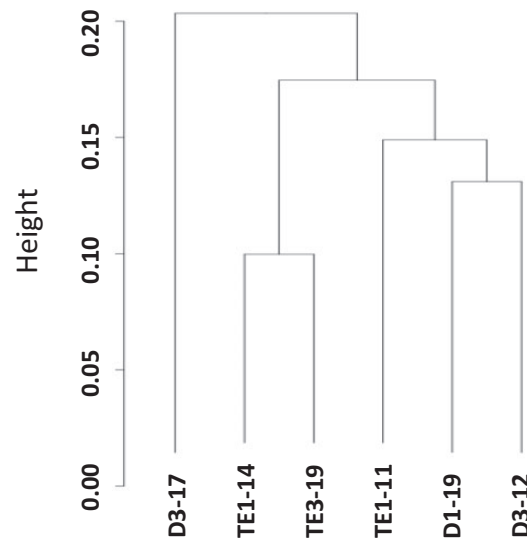


Figure 1: CpG methylation clustering. DNA methylation pattern clustering of the different samples is based on the Ward’s method and was performed with Bismark. Samples D3-17, D1-19, D3-12 correspond to spats from D samples TE1-14, TE3-19, TE1-11 correspond to spats from SWC

epimutations. These epimutations mostly occurred within coding sequences and preferentially at the end of genes.

About 80% of Environmentally Induced DMRs Are Specifically Targeted

As outlined above we identified 236 targeted DMRs using an epigenome-wide screen in single nucleotide resolution in three individuals. However, roughly 88% or all detected DMRs were random epimutations. It was therefore conceivable that all DMRs were actually random and just by chance, overlapping existing DMRs in our three replicates that were mistakenly assigned to be environmentally induced. We therefore randomly sampled 10 candidate DMRs among those that showed the most pronounced differences in DNA methylation and performed DNA methylation analysis on offspring spat of 10 individuals of each group (D, SC, SWC) by targeted bisulfite sequencing (T-BS-Seq) (Table 1, Supplementary Fig. S2). For 8 out of 10 samples, we observed a correlation between the BS-Seq and target analysis (Supplementary Fig. S2). In one loci (Scaffold42366:107142.107725, Supplementary Fig. S2) we found good correlation between BS-Seq and T-BS-Seq for the three individuals studied by BS-Seq but not for the others. In one candidate (Scaffold1720:210182.210722), we did not confirm the BS-Seq results. Moreover, we observed several scenarios of diuron/solvent effect (Table 1 and Supplementary Fig. S2): a diuron specific effect was observed in a unique region. Otherwise, we observed a solvent specific effect in another region, a synergistic/same/antagonist effect was observed in two, three and one regions, respectively. And finally, two regions displayed really complex profile where the diuron/solvent mixture effect relied on each CpG site individually. Finally, we barely found the same DNA methylation profile between individuals whatever the environmental conditions (Supplementary Fig. S2). Despite this individual variation, we found two consistent loci for which DNA methylation pattern was really conserved between individuals. The diuron/solvent suppressed the methylation of all the CpG sites in all the tested individuals in the loci XLOC_005912/CGI_10018082 present on scaffold1255 (365000–370000), whereas

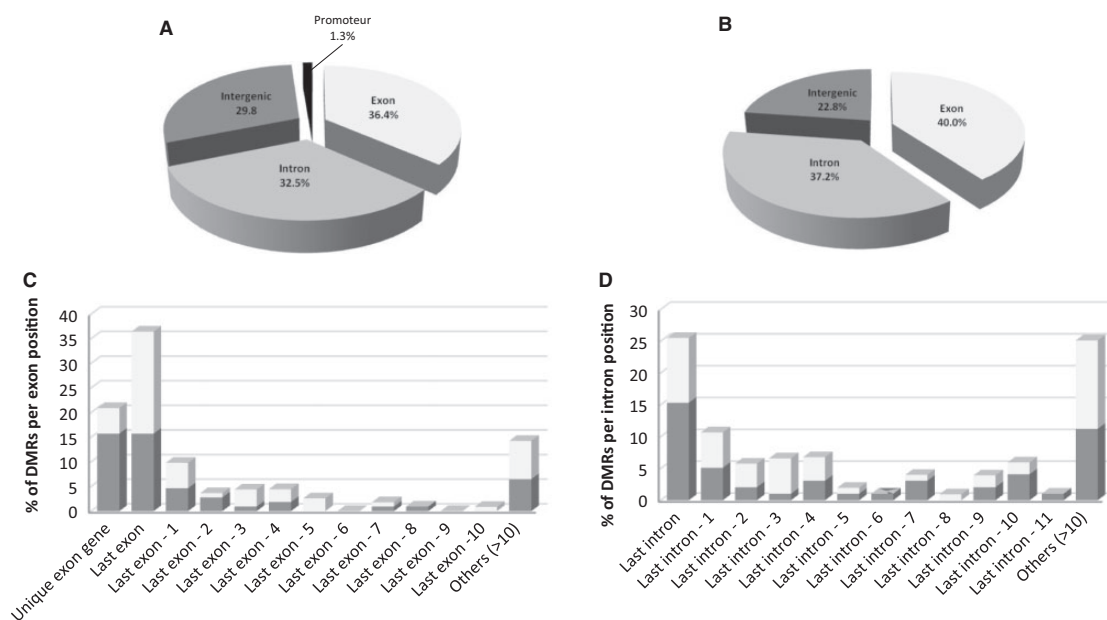


Figure 2: Genomic feature of the target DMRs. The genomic features of the target DMRs were determined using as a guide the gene annotation obtained from previous transcriptomic data [40]. Hypo/hypermethylation refers to methylation level in D as compared to SWC. A and B represent genomic features for hypermethylated and hypomethylated regions, respectively. C and D represent the number of DMRs per exon or intron, respectively, counting from the last exon or intron position, dark and pale grey represents the hypermethylation and hypomethylation, respectively

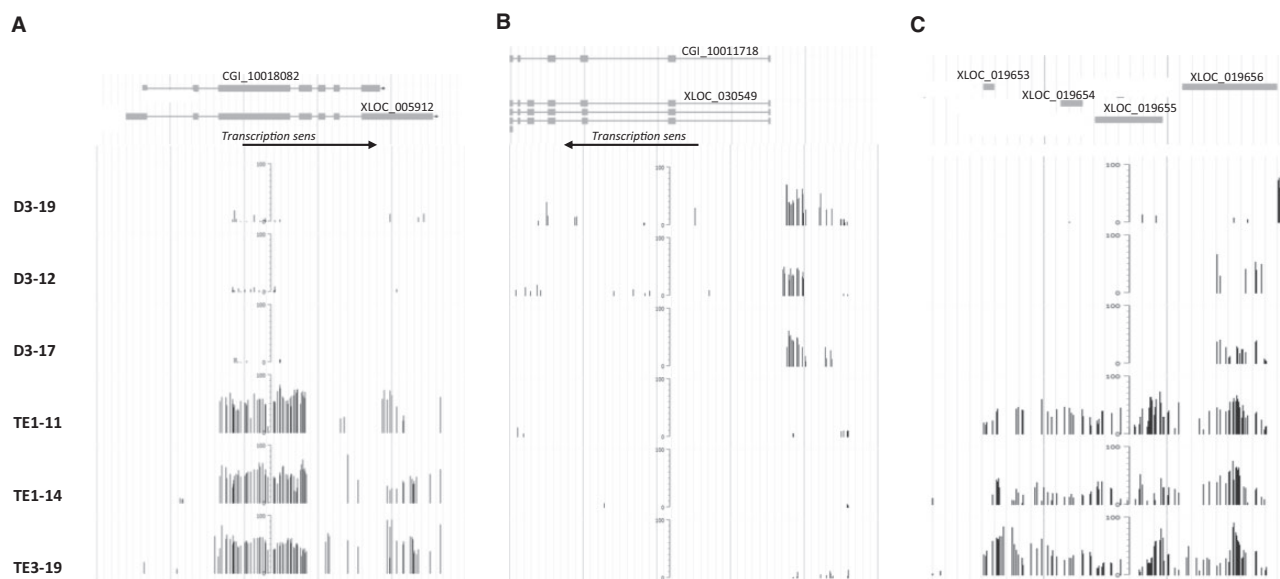


Figure 3: Example of strongly impacted regions. Extract of the *C. gigas* jbrowse interface which allows visualization of transcriptomic and DNA methylation data for three regions: (A) Scaffold 1255 from 364500 to 370000 containing XLOC_005912 (CGI_10018082), (B) Scaffold 43664 from 222500 to 235000 containing XLOC_030549 (CGI_10011718), and (C) Scaffold 309 from 130000 to 137500 containing four unique exon genes (XLOC_019653, XLOC_019654, XLOC_019655, XLOC_019656). Upper panel represents the annotation of genes in the current genome assembly V9 (CGI number), and the CDS according to previous transcriptomic data [40]. Bottom panel represents the methylated cytosine position. X-axis represents the position of each methylated cytosine. Y axis (bars) represents the % of methylation observed for each methylated cytosine (scale is 0–100). The six tracks represent the three biological replicates of individual spats from genitors treated with diuron or control (from top to bottom)

this mixture induced an overall increase in DNA methylation on several CpG sites of a region spanning 3 kb of the scaffold33832 (12000–15000). These consistent results within the 10 tested individuals led us to calculate a positive predictive value (PPV). The PPV tests the performance of a diagnostic based on the proportion of positive and negative results. It aims at checking if the two candidate regions can be used as potential environmental contamination marker based on DNA methylation profile. A PPV

of 85.7% was obtained when taking into account the combined results of these two loci (Supplementary Fig. S3).

No Indication of Genetic Selection Following Parental Diuron Exposure

Diuron exposure could have led to selection of genetically encoded phenotypes and the observed DNA methylation

Table 1: DNA methylation analysis on target loci

Targeted loci	Diuron/solvent effect
Scaffold1154:309231.309691	Diuron specific effect
Scaffold433: 896527.897085	Solvent specific effect
Scaffold33832: 13205.13768	Solvent effect, further
Scaffold1255: 75.750	increased with diuron
Scaffold41174: 81270.81829	Same effect for solvent
Scaffold42366: 108172.108673	and diuron
Scaffold43170: 116309.116863	
Scaffold37178: 4921.5527	Antagonist effect between
	solvent and diuron
Scaffold1720: 210182.210722	Diuron or solvent effect
Scaffold42366: 107142.107725	rely on CpG sites

Ten loci were selected as indicated in column 1 and targeted by PCR after DNA bisulfite conversion. Ten individuals were analyzed per condition (SWC, SC, D). Detailed results are given in Supplementary Fig. S2.

(epiallele frequency) differences could be an expression of such underlying genetic (allele frequency [AF]) difference. We used the genetic variants obtained with MethylExtract to search for signs of selection on a genome wide level. We used a total of 11 425 759 SNPs (control) and 9 517 133 SNPs (diuron) to calculate Tajima's D in 200 kb sliding windows. Genome wide scan's of Tajima's D in sliding windows can identify regions whose D greatly deviates from the bulk of the empirical distribution and such windows are reported as significant. Frequency distribution of Tajima's D indicates that most 200kb windows have a value of around 0 and that there are no major differences in D distribution between SWC and D conditions. For a high-resolution analysis, we also cloned and sequenced a 2.198 kb amplified cDNA fragment from the locus XLOC_005912/CGI_10018082 in which DNA methylation is strongly affected by the diuron parental exposure. 248 SNPs and 14 Indels were detected in this 2.198 kb fragment of XLOC_005912/CGI_10018082 cDNA. The clustering analysis performed groups according to individuals rather than condition (Supplementary Fig. S4). While we could not formally exclude that minor changes in allele frequency occurred during parental diuron exposure, it is sure that there was no strong and systematic AF distortion.

Relationship between DNA Methylation and RNA Abundance

After having firmly established that parental diuron exposure led to either random or targeted changes in DNA methylation profiles we wondered if such changes could affect the level of RNA abundance. To establish the regions of methylation enrichment around genes we produced average methylation profiles for all 42 463 genes (Fig. 4). As expected, gene bodies were highly enriched for methylation and no difference could be detected between SWC and D offspring. Visual inspection of genome-wide methylation profiles confirmed the mosaic-style methylation with large blocks of high methylation separated by blocks with no or weak methylation. We established the following criteria for both methylation types: regions with at least 5 CpGs that are all at least 70% methylated, and having a maximum distance of 2 kb between them (read coverage ≥ 10) were considered as "high methylation region" (HMR). All other regions were considered as "low methylation region" (LMR) (Supplementary Fig. S1). HMRs contain 5 655 genes (13%) whereas LMRs contain 36 808 genes (87%). We then used our earlier RNA-Seq data [40] to evaluate the relationship between gene body DNA

methylation and RNA abundance. For genes located in HMRs, we observed a weak correlation (Pearson coefficient 0.4) between degree of methylation and RNA abundance (Fig. 5). No correlation was found for genes located in the LMRs. For genes in the high methylation compartment, it was therefore in principle conceivable that changes in methylation could translate into changes in RNA level (or vice versa). Amongst the top 25 483 differentially expressed genes (abs(log2) fold change ≥ 2) only 80 were located in HMRs. Within these genes we observed two populations: (i) those that showed only moderate changes in RNA abundance and this despite strong changes in DNA methylation, and (ii) a smaller fraction where increase in DNA methylation correlated with increase in RNA amounts (Fig. 6). Amongst the above mentioned conserved 170 DMGs, high methylation compartment contains 84 (49%) (54 hypomethylated after diuron, and 30 hypermethylated). However, their abs(log2) expression differences were < 2 . In summary, it appeared that DNA methylation changes correlated directly with RNA level only in a very small group of genes, and only for genes located in the high methylation compartment of the (epi)genome. For this analysis, we used pooled BS-Seq data and compared them with pooled RNA-Seq data. A potential caveat of this approach is that potential individual differences in RNA abundance and DNA methylation were leveled out by absence of such differences in the replicates. Therefore, we performed qPCR experiments targeting arbitrarily selected candidate genes in DMRs using cDNA from the same individuals used for the BS-Seq experiment. We chose different contexts of DMR position: promoter, within genes, 3' distant regulatory region (Table 2). Amongst the 12 tested genes, only two (XLOC_005912/CGI_10018082 and XLOC_032365/CGI_10010585) showed a significant difference in their expression levels between control and parental diuron exposure. XLOC_005912 was 1.80 times more expressed in the D than in the SWC sample. This gene was hypomethylated in the D sample all along its coding sequence (Table 2 and Fig. 3). Reversely, XLOC_032365 was 1.66 times less expressed in the D than in the SWC sample although it was hypomethylated in the D sample in an intronic region (Table 2). The other candidates did not show significant differences in their expression profiles although DNA methylation pattern was sometimes strongly affected by the parental diuron exposure (Fig. 3).

Since it has been suggested that intragenic DNA methylation plays a role in splice variant regulation [42], we investigated the occurrence of different splice variants between the D and SWC group. We amplified by conventional PCR long fragments that covered almost the full CDS for three candidate genes (XLOC_005912/CGI_10018082, XLOC_032353/CGI_10010582 and XLOC_032353/CGI_10010585) in 15 individuals per condition including the individuals which had been used for the BS-Seq experiment. The size of amplified products was checked on agarose gels and we observed a unique fragment of the expected size in both conditions for each targeted locus (data not shown), suggesting that differential methylation did not systematically lead to splice variants. Taken together, our data indicated that although the diuron exposure strongly affected the DNA methylation profile of spat from exposed genitors, differential methylation had generally no direct impact on RNA abundance and splicing.

Discussion

A growing body of evidence shows that environmental stressors can be responsible for changes in epigenetic marks, which may

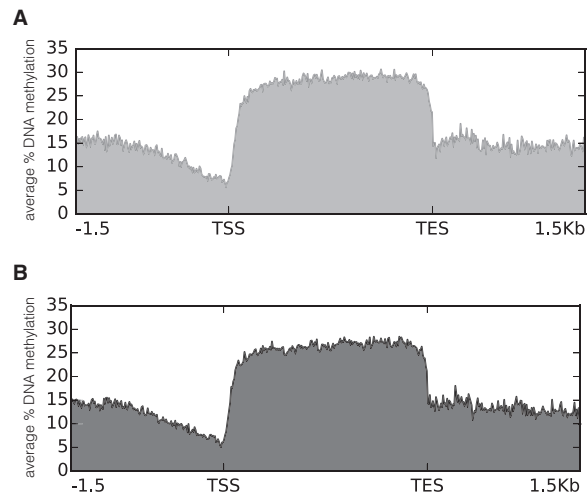


Figure 4: Average DNA methylation for transcripts. The average DNA methylation pattern around genes in offspring from diuron exposed parents (A) and from sea water control parents (B) was generated using Deeptool based on 67 754 transcripts produced earlier by RNA-Seq [40]. X axis represents the gene context; gene body was scaled to 2 kb. Y axis represents the average percentage of DNA methylation

result in heritable phenotypic outcomes and changes in life history trait of living species [43–45]. The increasing data regarding the influence of the environment on chromatin structure has led to the emergence of the “environmental epigenetics” discipline [7, 19, 46, 47]. Recently, this field has received many attentions since DNA methylation and histone modifications have been shown to be associated with a broad range of disease outcomes, including cancer, metabolic disorders, allergies, asthma, and reproductive disabilities [16, 48–50]. Although the majority of the efforts are oriented to the context of human health, growing evidences suggest that epigenetic based events play also a major role in natural ecosystems [18, 51]. Substantial efforts have been devoted to the study of multigenerational impacts of the climate change (ocean acidification and temperature increase) [52, 53] and chemical pollution on several marine species [2], including mollusks [54, 55]. Diverse examples illustrate how parental exposure could benefit to the offspring which exhibit traits with increased fitness in the environmental conditions experienced by their parents [54, 55]. Other studies have shown how chemical pollutants such as endocrine disrupting compounds can have a negative impact on different life history traits such as fertilization success, egg viability, reproductive behaviors, hatch success and development [2, 56]. Although, there are evidences for an impact of the environment, including chemical pollutants, on DNA methylation content of several aquatic species [57–59], no studies have investigated the multigenerational or intergenerational effect of pollutants on epigenetic marks of the offspring of aquatic relevant species. In this work, we investigated for the first time the impact of a parental exposure to the herbicide diuron on epigenetic marks of *C. gigas*. The effect of this herbicide on different *C. gigas* life history traits has been demonstrated several times on exposed individuals but also on the progeny of exposed parents [37, 38, 60–62]. In the present study, we showed by BS-seq analysis on a restricted number of samples the existence of 1967 differentially methylated regions (DMRs) after a parental diuron exposure. These DMRs could be produced by the parental stress, but some of these differences could be the product of an interindividual

variability of DNA methylation in the spats used. Among the 1967 DMRs, 88% are spontaneous epimutations and therefore the results of interindividual variability whereas 12% of these methylation differences are target-induced epimutations and therefore those regions are the results of the diuron-solvent mixture effect on the DNA methylation pattern. We then established the CpG methylation profile of 10 regions in a more subsequent number of samples by conventional PCR target analysis after DNA conversion with a bisulfite treatment. This analysis reveals the complexity of the diuron/solvent mixture effect on *C. gigas* methylome as we barely observed the same consequences depending on the considered loci, CpG within each loci and individuals. A diuron specific effect was observed in a unique case and we rather showed that the differential CpG methylation pattern were the result of different scenarios, including solvent effect only and a synergistic or antagonist effect of the diuron/solvent combination. Although we observed a strong individual variation in response to the exposure, two regions were consistently affected in the 10 tested individuals by the solvent/diuron combination. Using the combination of DNA methylation in both these markers, we calculated a positive predictive value which suggests that these two regions could indicate pollution in marine environment by a confidence level of 85.7% and could be used as potential biomarkers for marine risk assessment. The use of DNA methylation patterns as an early indicator of general disease disorder is already applied successfully in cancer diagnostics [63–65]. Further application as biomarkers in the evaluation of the carcinogenic potential of environmental factors has also been suggested [66]. The same kind of application in an ecologically relevant context to detect contamination in the environment on sentinel species has been already discussed but never applied [19, 51, 67]. In this context, these two regions represent relevant candidates which could be tested for the biomonitoring of pollution in the marine environment although further appropriate validations are required. Especially, it will be important to study whether the impact of parental diuron exposure on the DNA methylation profile of its progeny mirrors a general stress effect or corresponds to specific effect of this class of chemical pollutants.

Most of the studies conducted so far in the field of environmental epigenetic have been centered on DNA methylation. This covalent modification is conserved in most major eukaryotic groups [68–70], although it has been lost in certain model species [69, 71, 72]. The levels, patterns and function of DNA methylation vary among species. In invertebrates, it occurs in many taxa [69, 73–79] whose genomes are characterized by interspaced regions of methylated and unmethylated DNA. Intragenic (exon and intron) methylation is a general feature of invertebrate animals while methylation of repetitive elements and intergenic regions occurs only at moderate level [80]. The role of intragenic DNA methylation in invertebrate species remains an open question. It is more abundant in the 5' region of open reading frame and associated with histone marks indicative of open chromatin structure in insect species [74, 81]. Our work confirmed previous data on the DNA methylation pattern in *C. gigas* [35, 77]. We showed that 2% of total cytosine was methylated predominantly in the CpG context, DNA methylation was organized as a mosaic feature and was higher in the coding region. Furthermore, our work highlighted that this pattern was sensitive to environmental condition and could be involved in intergenerational effects. The majority of DMRs that we identified was essentially found in intragenic regions. We investigated the consequences of these DMRs which occurred within genes on their corresponding transcripts.

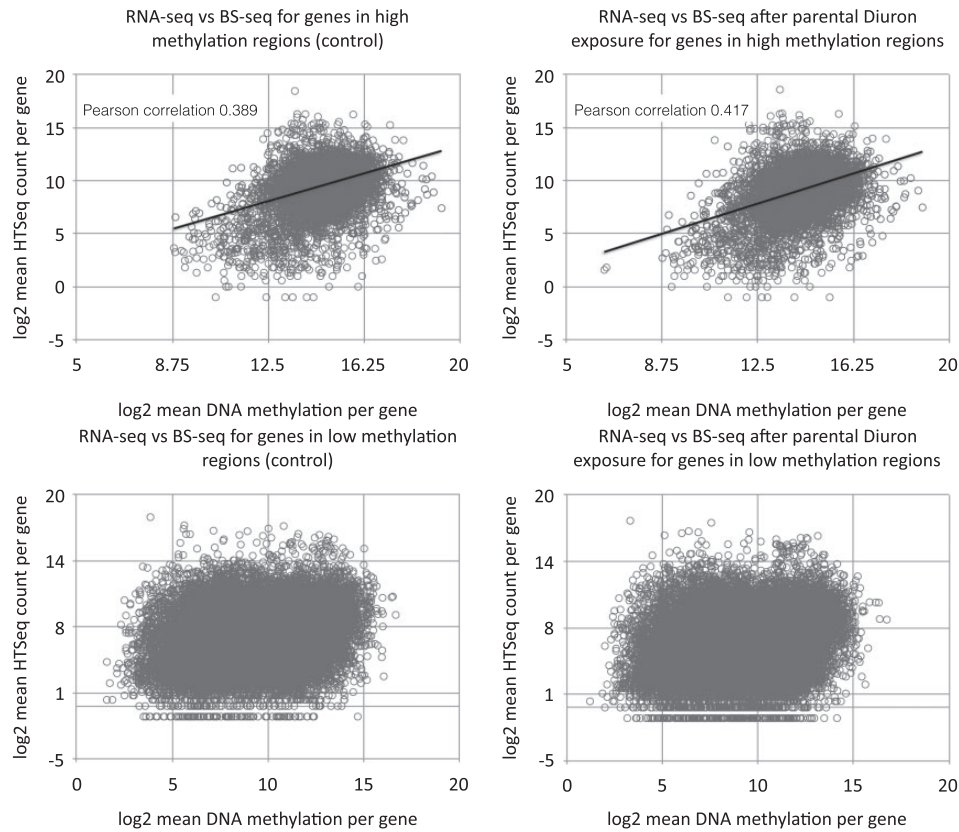


Figure 5: Correlation between DNA methylation and gene expression. Correlation was performed using the HTSeq counts from previous RNA-Seq experiment [40] and average DNA methylation level per gene from the three biological replicates of each condition

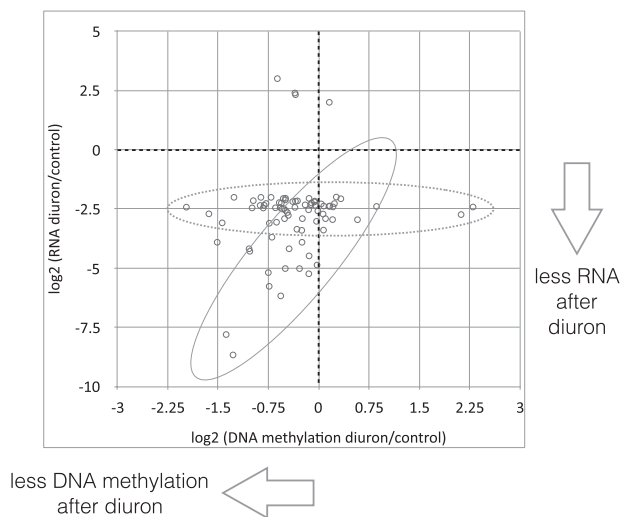


Figure 6: Correlation between the change in methylation level and change in expression level. The fold change in expression observed between the diuron and sea water control conditions (output from DESeq analysis [40]) was compared with the fold change in DNA methylation between the D and SWC conditions

Some studies have shown that intragenic methylation is likely to occur in genes associated with stable transcription [74, 80] while other studies have suggested that DNA methylation may regulate gene expression by altering the landscape of splice variants [73, 82]. In our case, we observed that DNA methylation changes correlated with RNA level only in a very small

group of genes, located in the high methylated regions. The target expression analysis confirmed the absence of obvious impact on gene expression and splice variant generation, although, some of these candidates displayed a striking difference in their CpG methylation profile and in one case a strong difference was observed in a promoter region. This lack of obvious phenotype raised the question of the function of DNA methylation for molecular phenotypes, if not playing a role in controlling gene expression as clearly demonstrated in flowering plants and mammals [68]. Another striking result of our study was the severe impact of the diuron parental exposure on several unique exon genes that encode transposon relic. These mobile genetic elements seemed to be active since we could detect their transcripts. However, there were no differences in their level of expression between the SWC and the D groups which further questions the role of CpG methylation for transposon silencing in *C. gigas*. Previous work has shown that DNA methylation only targeted some classes of repetitive elements in *C. gigas* [77] and therefore mobile elements were not a preferential target of DNA methylation as observed in plants and mammals for which their role as a genome defense has been largely demonstrated [68]. Consequently, our study confirmed previous observations that DNA methylation in invertebrates do not follow the general paradigm concerning its role for gene silencing [83–85]. We suggest that the admitted role of DNA methylation for heterochromatization of DNA must be revisited and its function in controlling gene expression in invertebrates, if there is any, may be restricted to really conserved pathway such as those encountered for developmental and key signaling pathways [86–89]. Our analysis further

Table 2: Effect of DNA methylation on gene transcription

CGI number	XLOC number	Annotation	DMR positions	Context	Fold change
CGI_10018082	XLOC_005912	Centromeric protein	Scaffold 1255 366001–367000	Intronic and exonic Hypomethylation	1.80
CGI_10026162	XLOC_004001	Thap domain-containing protein 9-like	Scaffold 1154 309001–311000	Exonic and intronic Hypermethylation	No significant difference
	XLOC_020586	Myb-related transcription factor, partner of profilin	Scaffold 33832 12001–12500	Exonic and 3' distant reg. region Hypermethylation	No significant difference
CGI_10009103	XLOC_029410	Hypothetical protein	Scaffold 43170 116501–117000	Exonic Hypomethylation	No significant difference
	XLOC_030549	Hepatocyte growth factor-like protein	Scaffold 43664 232001–232500	Promoter Hypermethylation	No significant difference
CGI_10011372	XLOC_017268	Reverse transcriptase	Scaffold 206 81001–81500	Exonic Hypomethylation	No significant difference
CGI_10010582	XLOC_032353	Synaptic vesicle glycoprotein 2c-like	Scaffold 473 121501–122000	Exonic Hypomethylation	No significant difference
CGI_10010585	XLOC_032365	28s ribosomal protein mitochondrial-like	Scaffold 473 130001–130500	Intronic Hypomethylation	0.60
CGI_10017761	XLOC_037874	Beta-arrestin1	Scaffold 713 415001–415500	Exonic (3'UTR) Hypomethylation	No significant difference
	XLOC_019656	Retrovirus polyprotein	Scaffold 309 136001–136500	Exonic Hypomethylation	No significant difference
CGI_10026723	XLOC_019464	Paired box pox meso protein	Scaffold 301 516001–516500	Exonic Hypermethylation	No significant difference
			Scaffold 54 79501–80000	Intronic Hypermethylated	No significant difference

Genes have been chosen according to different context of DMR position. DMRs context are indicated in the “context” column. The accurate position on *C. gigas* genome assembly V9 is indicated in column “DMRs position.” Hypo/hypermethylation and difference in expression refers to D compared to SWC. Fold changes are indicated only in the case of significant *P* value ($P < 0.01$).

highlighted that a bias exists in the position of the DMRs which preferentially occurred in the 3' end region of the genes. Given that little information exists on the possible role of invertebrate intragenic DNA methylation, the meaning of such a bias certainly deserves further attention. An important issue to address is whether the observed effect is linked to the genotoxic effects of diuron observed in parallel during this experiment or whether it is a general feature that is observed whatever the stress experienced. As a matter of fact, some studies pointed out a possible interaction between genotoxicity and DNA methylation mechanisms [90].

In conclusion, we have investigated the impact of a parental diuron exposure on the DNA methylation profile of *C. gigas*. We showed that a parental chemical stress effect can have an impact on the DNA methylation pattern of the progeny. This is the first evidence for the implication of epigenetic marks for a parental effect in aquatic species. Our work showed that epigenetic changes might represent an important pathway by which environmental factors influence phenotypic outcomes, within individuals and across generations in invertebrate aquatic species of economic and ecological importance.

Methodology

Genitor Origin, Parental Diuron Exposure, and Production of the Next Generation

The biological material used for the present study was obtained at the experimental hatchery of Ifremer La Tremblade in the frame of the GIMEPEC project funded by the French National Agency for Research (ANR-CESA-01601) [37]. Briefly, wild adult

oysters from Marennes-Oléron Bay (France) were transferred from the field to the hatchery. Seawater was pumped directly from the Seudre river Estuary, filtered through a sand filter (40 μm) and passed through UV rays before draining the tanks in a continuous oxygenated flow system. Oysters were fed daily with a mixture of four marine microalgae and the water temperature was maintained at 8°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) throughout the 1 month acclimatization period. In order to initiate the oyster gonad maturation process, the temperature was then raised by two degrees per day for 1 week, to reach 19.8°C ($\pm 0.3^\circ\text{C}$) at the start of the experiment. A total of 720 individuals were divided into three experimental groups (three replicate tanks per group): a diuron-exposed group (D), a solvent-exposed group as diuron was prepared in 0.005% acetonitrile (SC) and a seawater control group (SWC). At the start and the mid-course of gametogenesis, the oysters were exposed during two 7-day periods to pulses of 0.2 and 0.3 $\mu\text{g/l}$ of diuron, respectively, and of 0.005% (50 $\mu\text{l/l}$) acetonitrile for the SC group. The effective diuron concentrations reached into the assay tanks were measured thanks to the use of Polar Organic Chemical Integrative Samplers (POCIS) [37]. This exposure scenario is expected to be environmentally realistic with an exposure time which mimics rain events at diuron concentrations close to those detected in coastal waters [25, 91]. In France, Diuron has been detected at concentrations up to 0.25 $\mu\text{g l}^{-1}$ [92]. At time of spawning, male and female gametes from each genitor lots (“SWC”, “SC” and “D”) were recovered and used to produce the next generation as previously described [37].

Genomic Isolation

Individual whole tissue samples of spat oysters previously frozen in liquid nitrogen were homogenized in RL1 lysis buffer

supplied by the NucleoSpin 96 RNA Tissue Core kit from Macherey-Nagel. Genomic DNA (gDNA) was isolated individually as previously described [93]. Briefly, 100 µl of oyster tissue were incubated overnight at 55 °C in 500 µl of DNA extraction buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml protease K). Following a step of phenol/chloroform extraction, gDNA samples were precipitated by addition of cold ethanol and treated with 50 µg/ml RNase A (Invitrogen) for 30 min at 37 °C to eliminate contaminating RNA.

Genome Wide Methylome Analysis

gDNA (3.02–5.44 µg) was sent to GATC (Germany) for bisulfite conversion, BS-seq paired-end library construction and sequencing. Bisulfite conversion rate was 99.5%. Three libraries per oyster group (SWC and D) were constructed as biological triplicates. One library corresponds to whole DNA sample from a single individual. Individual D3-17, D1-19, and D3-12 were chosen for the D group and individuals TE1-14, TE3-19, and TE1-11 were chosen for the SWC group. These individuals are from the same study for which we previously generated a RNA-Seq experiment except that in this RNA-Seq study, reverse transcription has been realized on pool of RNA from 10 individuals including the one analyzed here [40]. The workflow applied for BS-Seq analysis is shown in Supplementary Fig. S1. Fastq reads of six libraries (three per condition) were filtered separately based on quality phred-score. Reads with <95% of nucleotides with a quality phred-score equal or higher than 26 were discarded with the Filter by quality tool. Interlace of forward and reverse libraries per sample were performed to discard unpaired reads. De-interlace step was performed per sample to separate forward and reverse libraries previous to mapping. The reference genome, CgigasV9 [34], was modified for the subsequent mapping step by discarding contigs ≤ 5 Kb. Bismark [94] was used to map the filtered reads to the modified genome with zero mismatch allowed in the 100 bp reads. Bismark sorted alignment output (BAM file) were converted to SAM file on a local Galaxy instance. Coverage was analyzed using “bedtools makewindows” [95] and “samtools bedcov” [96]. The methylkit software (R packages) [97] was used for comparative statistical analysis between the samples using the SAM files as input. Criteria used to determine differentially methylated regions (DMRs) of 500 bp were as follow: a minimum coverage of 10× in all replicates, a minimum of 25% of methylation difference between conditions with a corresponding adjusted P value (FDR) of 0.01. Methylkit defines methylation difference as absolute value of methylation percentage change between test and control. Since there is no data in oyster about the degree of methylation change that is necessary to obtain a biological impact we tentatively used the 25% default value. MethylExtract 1.8.1 [98] was used to generate Methylation Wiggle and BED files that were displayed in IGV [99] for visual inspection of the data genomic regions (promoter, exon, intron or intergenic region) affected by parental exposure to diuron. MethylExtract served also to generate genetic variant calls in VCF format. VCF files were analyzed with VCFTools v0.1.12b [100]. Average methylation profiles over transcribed regions were generated with DeepTools [101] on the public Galaxy instance (<https://usegalaxy.org/>). We used our earlier produced RNA-Seq based annotation of the genome [40]. Correlation analysis between DNA methylation and gene expression was performed using the Pearson and Apos correlation tool under the public galaxy instance (<https://usegalaxy.org/>). Average HTSeq count per gene [40] was used for the gene expression level. Average DNA

methylation profile per gene for the three biological replicates was generated. The fold change in expression observed between the diuron and seawater control conditions was the result of the DESeq analysis [40]. The fold change in DNA methylation between the diuron and seawater control conditions was the result of the Bismark analysis. For the bioinformatic pipeline, scripts are available upon request.

Visual inspection of the methylation profile of each replicates in IGV software was performed in order to identify DMRs for which all biological replicates were affected in the same way. We determined the genomic features of these target DMRs as being localized either within coding region (exon or intron), promoter or intergenic region using the gene annotation obtained with previous RNA-seq data [40]. A 500 bp DMRs which was encompassing two genomic features were counted as being located in the two contexts. Promoter regions were considered to be the 1 kb region upstream of the first exon of an annotated gene. For accurate exonic position within the genes, we defined 13 possible positions: position in unique exon, in last exon, in last exon –1 to last exon –10 and others which concerns genes with more than 10 exons. The same definition was used to localize the accurate intronic position within the genes.

DNA Methylation of Target Gene Analysis

Bisulfite treatment was done as described before [102] (http://ihpe.univ-perp.fr/methods/methods/bisulphite_engl_mc.html) on gDNA extracted from SWC, SC and D groups. Ten individuals were analyzed for each experimental condition. Briefly, 300 ng of DNA was denaturated with 3 M NaOH, treated with a solution of sodium-bisulfite and hydroquinone at pH 5 in the dark for 4 h at 55 °C; desalted (Amicon Ultra column, UFC510024 Millipore), desulfonated by adding 350 µl of 0.1 M NaOH to the DNA in the Microcon column, and finally dissolved in 10 mM Tris/Cl pH 8. The genomic sequence of 10 DMRs was targeted by nested PCR on 10 individuals per group (SWC, SC, D). Primer pairs (Supplementary Table S1) were designed using MethPrimer [103]. PCR amplification was performed in 50 µl using 1.25 U of the M0495L-Hot start Taq DNA polymerase (Biolabs), 1× Hot start Taq buffer, 0.2 µM of primers, 200 µM of dNTP. PCR cycles were: 94 °C for 2 min, five cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 2 min, and 72 °C for 3 min; followed by 25 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 2 min, and 72 °C for 1 min 30 s and finally 72 °C for 10 min on a thermocycler (Electrocon corporation HBPX2220). 2.5 µl of the bisulfite treated DNA was used as template for the first round of PCR using external primers, then 2.5 µl of the PCR product was used as template for the nested PCR using internal primers. Primers were used at 0.2 µM and dNTP at 200 µM. Products were sequenced using the genoscreen sequencing facilities (<http://www.genoscreen.fr/fr/>). Chromatograms were edited using MEGA 6 [104] and DNA Chromatogram Explorer (<http://www.dnabaser.com/download/chromatogram-explorer/>). For each methylated cytosine, the percentage of methylation was determined according to five levels (0, 25, 50, 75, and 100%) depending on the height of the chromatogram peaks for the cytosine (non-converted methylated cytosine) compared to the height of the thymine (converted non-methylated cytosine) overlapping at the same position on the forward strand (and reversely on the reverse strand). For positive predictive value (PPV) calculation, the two regions: scaffold1255:365901.366597 and scaffold33832:13205.13768 were considered “diuron exposed profile” when individuals displayed percentage of methylation of 0 and above 25, respectively. The PPV value was calculated using a MedCalc based interface

(https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) and true positive took into account a positive occurrence in the two markers. The disease group was the 10 D samples; the non-disease group was the 10 SWC samples. True positives (a) are individuals for which DNA methylation profile is typical of “diuron exposed profile” in the D group. False positives (c) are individuals for whom DNA methylation profile is typical of “diuron exposed profile” but those individuals are from the control group. PPV equals $a/(a + c)$ (Supplementary Fig. S3).

Expression Analysis of Target Genes

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as previously described [40]. Briefly, individual whole tissue samples of oyster spat previously frozen in liquid nitrogen were homogenized in RL1 lysis buffer supplied by the NucleoSpin 96 RNA Tissue Core kit (Macherey-Nagel, France). Total RNA was extracted according to the manufacturer protocol. RNA samples were treated with DNase to prevent DNA contamination. cDNAs were synthesized from 300 ng of total individual RNA samples using VILO Superscript enzyme according to manufacturer’s instruction (Invitrogen). Primer specificity was tested performing a blastN against *C. gigas* genome version 9 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Primer sequences and expected PCR product sizes are listed in Supplementary Table S1.

End point Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to check for the presence of alternative transcripts in the three candidates XLOC_005912 (CGI_10018082), XLOC_032353 (CGI_10010582) and XLOC_032365 (CGI_10010585) and amplified, respectively, with the following primer pairs XLOC_005912.3for/XLOC_005912.5rev, XLOC_032353.2for/XLOC_032353.1rev and XLOC_032365.1for and XLOC_032365.3rev. A total of 20 individuals were tested per condition (SWC, SC and D). PCR amplification was performed in 25 μ l using 0.625 U of GoTaq DNA (Promega kit: GoTaq G2 Hot Start Polymerase), 1 \times GoTaq buffer, 0.2 μ M of each primer, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂. PCR cycles were: 95 °C for 3 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min and finally 72 °C for 10 min. PCR were accomplished on MastercyclerEpp Gradient Eppendorf thermocycler. 3 μ l of the cDNA matrix were used. PCR product sizes were checked by electrophoresis (TAE 1%). For high resolution analysis on cDNA sequence, a 2.198 kb fragment from CGI_10018082 was amplified with XLOC_005912.3for and XLOC_005912.5rev. 1 μ l of this PCR product was cloned into pCR4 (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) and the inserts (17 inserts per condition) derived from amplified cDNA of D (D3-17, D3-12, D3-19) and SWC (TE1-11, TE1-14, TE1-19) individuals were sequenced with primers (M13F, M13R and XLOC_005912.1rev) using the genoscreen sequencing facilities (<http://www.genoscreen.fr/fr/>). Chromatograms were edited using Sequencher Software, and a total of 34 sequences (combining several clones of each individual from each condition) were thoroughly examined for final analysis. Phylogeny analysis was performed using the on line phylogeny analysis tools [105].

Real time PCR (qPCR) were performed in duplicates in a total volume of 10 μ l with 1.5 μ l of H₂O, 0.5 μ l of each primers, 5 μ l of MelTaq and 2.5 μ l of cDNA (Roche kit: LightCycler® 480 SYBR Green I Master). qPCR were accomplished on the LightCycler480 II (Roche Diagnostics). For each reaction, the crossing point (Cp) was determined using the second derivative maximum method using Light Cycler Software version 3.3 (Roche Diagnostics). For each reaction, the level of transcription was normalized using the mean geometric transcription rate of three reference sequences: Elongation factor 1: EKC33063.1 Ubiquitin 60S ribosomal protein L40: EKC19428.1

40S ribosomal protein S6: AFJ91756.1 as previously described [106] (Supplementary Table S1). Difference between SWC and D individuals was tested statistically using Student’s test on R software.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Agency for Research (GIMEPEC project, ANRCESA-01601), by the CNRS program EC2CO (GENEPIH), by the Région Languedoc Roussillon (TRANSGIGAS, Chercheur d’avenir 2015), the “Institut Français de Recherche pour l’Exploitation de la Mer” (“French Research Institute for Sea Exploration”-Ifremer), the “Centre National de la Recherche Scientifique” (National Centre for Scientific Research-CNRS) and the University of Perpignan via Domitia. R. Rondon was supported by a PhD grant from Ifremer.

Conflict of interest statement. None declared.

Data Availability

BS-Seq and RNA-Seq reads are available at the NCBI-SRA under the BioProject accession number PRJNA291364.

Author’s Contributions

F. Akcha, C. Cosseau, E. Bachere, C. Grunau designed research; R. Rondon, M. Fallet, C. Chaparro and N. Charlemagne performed research; R. Sussarellu, R. Rondon, C. Grunau and C. Cosseau analyzed the data; C. Grunau, C. Montagnani, R. Rondon C. Cosseau and G. Mitta wrote the paper.

Authorship

E.B. and F.A. designed the study. R.R., M.F., C.C., R.S., and N.C. performed the experiments and acquired the data. R.R., C.G., C.C., and C.C. analyzed the data. R.R., C.M., G.M., C.G., and C.C. wrote the manuscript. All authors edited and approved the manuscript.

Supplementary data

Supplementary data is available at *EnvEpig* online.

References

- Gonzalez-Romero R, Rivera-Casas C, Fernandez-Tajes J, Ausio J, Mendez J, Eirin-Lopez JM. Chromatin specialization in bivalve molluscs: a leap forward for the evaluation of Okadaic Acid genotoxicity in the marine environment. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2011; **155**:175–81.
- Schwindt AR. Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: is there evidence of transgenerational inheritance? *Gen Comp Endocrinol* 2015; **219**:152–64.
- Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annu Rev Nutr* 2010; **30**:315–39.
- Champagne FA. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**:386–97.

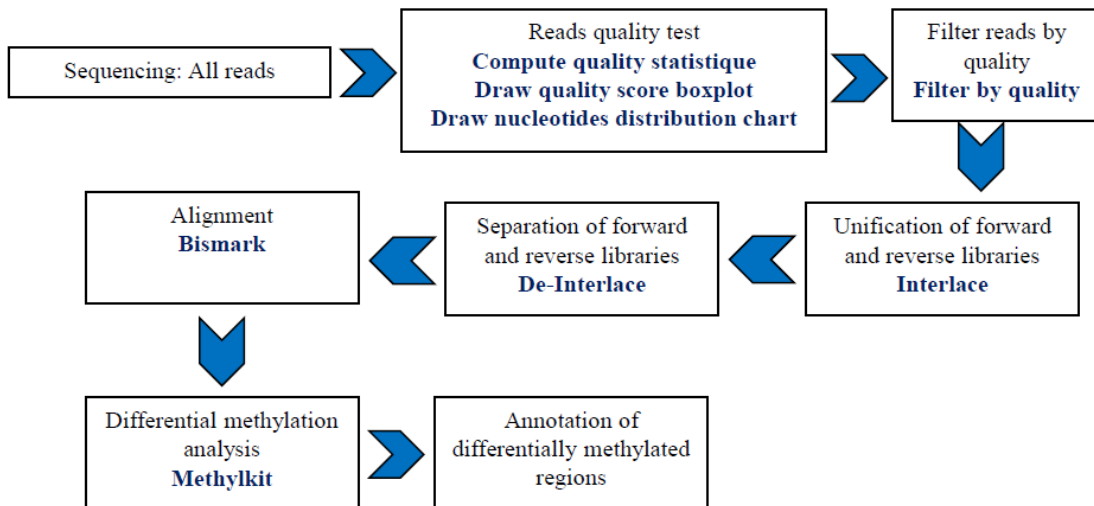
5. Angers B, Castonguay E, Massicotte R. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. *Mol Ecol* 2010; **19**:1283–95.
6. Hala D, Huggett DB, Burggren WW. Environmental stressors and the epigenome. *Drug Discov Today Technol* 2014; **12**:e3–8.
7. Cortessis VK, Thomas DC, Levine AJ, Breton CV, Mack TM, Siegmund KD, Haile RW, Laird PW. Environmental epigenetics: prospects for studying epigenetic mediation of exposure-response relationships. *Hum Genet* 2012; **131**:1565–89.
8. Day T, Bonduriansky R. A unified approach to the evolutionary consequences of genetic and nongenetic inheritance. *Am Nat* 2011; **178**:E18–36.
9. Geoghegan JL, Spencer HG. Population-epigenetic models of selection. *Theor Popul Biol* 2012; **81**:232–42.
10. Skinner MK, Gurrero-Bosagna C, Haque MM, Nilsson EE, Koop JA, Knutie SA, Clayton DH. Epigenetics and the evolution of Darwin's Finches. *Genome Biol Evol* 2014; **6**:1972–89.
11. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:17046–9.
12. Steenaard RV, Ligthart S, Stolk L, Peters MJ, van Meurs JB, Uitterlinden AG, Hofman A, Franco OH, Dehghan A. Tobacco smoking is associated with methylation of genes related to coronary artery disease. *Clin Epigenetics* 2015; **7**:54.
13. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation? *Semin Cell Dev Biol* 2015; **43**:66–75.
14. Skinner MK. Endocrine disruptors in 2015: epigenetic transgenerational inheritance. *Nat Rev Endocrinol* 2015; **12**:68–70.
15. Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 2013; **307**:35–41.
16. Vaiserman A. Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? *Clin Epigenetics* 2015; **7**:96.
17. Alonso-Magdalená P, Rivera FJ, Guerrero-Bosagna C. Bisphenol-A and metabolic diseases: epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environ. Epigenetics* 2016; **2**(3): dvw022.
18. Head JA. Patterns of DNA methylation in animals: an ecotoxicological perspective. *Integr Comp Biol* 2014; **54**:77–86.
19. Suarez-Ulloa V, Gonzalez-Romero R, Eirin-Lopez JM. Environmental epigenetics: a promising venue for developing next-generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. *Mar Pollut Bull* 2015; **98**:5–13.
20. Pierron F, Baillon L, Sow M, Gotreau S, Gonzalez P. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environ Sci Technol* 2014; **48**:797–803.
21. Pierron F, Bureau du, Colombier S, Moffett A, Caron A, Peluhet L, Daffe G, Lambert P, Elie P, Labadie P, Budzinski H, et al. Abnormal ovarian DNA methylation programming during gonad maturation in wild contaminated fish. *Environ Sci Technol* 2014; **48**:11688–95.
22. Tran TK, MacFarlane GR, Kong RY, O'Connor WA, Yu RM. Potential mechanisms underlying estrogen-induced expression of the molluscan estrogen receptor (ER) gene. *Aquat Toxicol* 2016; **179**:82–94.
23. Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 2004; **56**:1021–32.
24. Tixier C, Sancelme M, Bonnemoy F, Cuer A, Veschambre H. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environ Toxicol Chem* 2001; **20**:1381–9.
25. Caquet T, Roucaute M, Mazzella N, Delmas F, Madigou C, Farcy E, Burgeot T, Allenou JP, Gabellec R. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; **20**:651–66.
26. Scheringer M, Stempel S, Hukari S, Ng CA, Blepp M, Hungerbühler K. How many persistent organic pollutants should we expect? *Atmos Pollut Res* 2012; **3**:383–91.
27. Korkaric M, Xiao M, Behra R, Eggen RI. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to ultraviolet radiation and its impact on chemical toxicity. *Aquat Toxicol* 2015; **167**:209–19.
28. Alyürük H, Çavas L. Toxicities of diuron and irgarol on the hatchability and early stage development of *Artemia salina*. *Turkish J Biol* 2013; **37**:151–7.
29. Nélieu S, Bonnemoy F, Bonnet JL, Lefeuvre L, Baudiffier D, Heydorff M, Quéméneur A, Azam D, Ducrot PH, Lagadic L, et al. Ecotoxicological effects of diuron and chlorotoluron nitrate-induced photodegradation products: monospecific and aquatic mesocosm-integrated studies. *Environ Toxicol Chem* 2010; **29**:2644–52.
30. Guo XM, Hedgecock D, Hershberger WK, Cooper K, Allen SK. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 1998; **52**:394–402.
31. Fabioux C, Pouvreau S, Le Roux F, Huvet A. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **315**:897–904.
32. Naimi A, Martinez AS, Specq ML, Diss B, Mathieu M, Sourdain P. Molecular cloning and gene expression of Cg-Foxl2 during the development and the adult gametogenic cycle in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2009; **154**:134–42.
33. Obata M, Komaru A. The mechanisms of primordial germ cell determination during embryogenesis in molluscan species. *Isj-Invert Surviv* 2012; **19**:223–9.
34. Zhang G, Fang X, Guo X, Li L, Luo R, Xu F, Yang P, Zhang L, Wang X, Qi H, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 2012; **490**:49–54.
35. Olson CE, Roberts SB. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in *Crassostrea gigas* male gametes. *Front Physiol* 2014; **5**:224.
36. Roberts SB, Gavery MR. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates? *Front Physiol* 2012; **2**:116.
37. Barranger A, Akcha F, Rouxel J, Brizard R, Maurouard E, Pallud M, Menard D, Tapie N, Budzinski H, Burgeot T, et al. Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat Toxicol* 2014; **146**:93–104.
38. Barranger A, Benabdelmouna A, Degremont L, Burgeot T, Akcha F. Parental exposure to environmental concentrations of diuron leads to aneuploidy in embryos of the Pacific oyster, as evidenced by fluorescent in situ hybridization. *Aquat Toxicol* 2015; **159**:36–43.
39. Akcha F, Barranger A, Bachère E, Berthelin CH, Piquemal D, Alonso P, Sallan RR, Dimastrogiovanni G, Porte C, Menard D,

- et al. Effects of an environmentally relevant concentration of diuron on oyster genitors during gametogenesis: responses of early molecular and cellular markers and physiological impacts. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016; **23**:8008–20.
40. Rondon R, Akcha F, Alonso P, Menard D, Rouxel J, Montagnani C, Mitta G, Cosseau C, Grunau C. Transcriptional changes in *Crassostrea gigas* oyster spat following a parental exposure to the herbicide diuron. *Aquat Toxicol* 2016; **175**:47–55.
 41. Roquis D, Rognon A, Chaparro C, Boissier J, Arancibia N, Cosseau C, Parrinello H, Grunau C. Frequency and mitotic heritability of epimutations in *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol* 2016; **25**:1741–58.
 42. Foret S, Kucharski R, Pellegrini M, Feng S, Jacobsen SE, Robinson GE, Maleszka R. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**:4968–73.
 43. Youngson NA, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; **9**:233–57.
 44. Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 2008; **319**:1827–30.
 45. Verhoeven KJ, Jansen JJ, van Dijk PJ, Biere A. Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytol* 2010; **185**:1108–18.
 46. Talbert PB, Henikoff S. Environmental responses mediated by histone variants. *Trends Cell Biol* 2014; **24**:642–50.
 47. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 2009; **21**:243–51.
 48. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab* 2010; **21**:214–22.
 49. DeVries A, Vercelli D. Epigenetics in allergic diseases. *Curr Opin Pediatr* 2015; **27**(6):719–23.
 50. Huo X, Chen D, He Y, Zhu W, Zhou W, Zhang J. Bisphenol-A and female infertility: a possible role of gene-environment interactions. *Int J Environ Res Public Health* 2015; **12**:11101–16.
 51. Vandegheuchte MB, Janssen CR. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; **764–765**:36–45.
 52. Foo SA, Byrne M. Acclimatization and adaptive capacity of marine species in a changing ocean. *Adv Mar Biol* 2016; **74**:69–116.
 53. Calosi P, De Wit P, Thor P, Dupont S. Will life find a way? evolution of marine species under global change. *Evol Appl* 2016; **9**:1035–42.
 54. Parker LM, O'Connor WA, Raftos DA, Portner HO, Ross PM. Persistence of positive carryover effects in the oyster, *Saccostrea glomerata*, following transgenerational exposure to ocean acidification. *PLoS One* 2015; **10**:e0132276.
 55. Ross PM, Parker L, Byrne M. Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. *ICES J Mar Sci* 2016; **73**:537–49.
 56. Nice HE, Morritt D, Crane M, Thorndyke M. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*. Possible endocrine disruption? *Mar Ecol Prog Ser* 2003; **256**:293–300.
 57. Metzger DC, Schulte PM. Epigenomics in marine fishes. *Mar Genomics* 2016; **30**: 43–54.
 58. Putnam HM, Davidson JM, Gates RD. Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evol Appl* 2016; **9**:1165–78.
 59. Marsh AG, Pasqualone AA. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, *Spiophanes tcherniai*. *Front Physiol* 2014; **5**:173.
 60. Akcha F, Spagnol C, Rouxel J. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat Toxicol* 2012; **106–107**:104–13.
 61. Mai H, Morin B, Pardon P, Gonzalez P, Budzinski H, Cachot J. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Environ Res* 2013; **89**:1–8.
 62. Bouilly K, Bonnard M, Gagnaire B, Renault T, Lapegue S. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007; **52**:58–63.
 63. Dirks RA, Stunnenberg HG, Marks H. Genome-wide epigenomic profiling for biomarker discovery. *Clin Epigenetics* 2016; **8**:122.
 64. Zhang Y, Breitling LP, Balavarca Y, Holleczeck B, Schottker B, Brenner H. Comparison and combination of blood DNA methylation at smoking-associated genes and at lung cancer-related genes in prediction of lung cancer mortality. *Int J Cancer* 2016; **139**:2482–92.
 65. Partin AW, Van Neste L, Klein EA, Gee JR, Troyer DA, Rieger-Christ K, Jones JS, Magi-Galluzzi C, Mangold LA, Trock BJ, et al. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J Urol* 2014; **192**:1081–7.
 66. LeBaron MJ, Rasoulpour RJ, Klapacz J, Ellis-Hutchings RG, Hollnagel HM, Gollapudi BB. Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutat Res* 2010; **705**:83–95.
 67. Mirbahai L, Chipman JK. Epigenetic memory of environmental organisms: a reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; **764–765**:10–7.
 68. Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature* 2015; **517**:321–6.
 69. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 2010; **328**:916–9.
 70. Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, Hetzel J, Jain J, Strauss SH, Halpern ME, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**:8689–94.
 71. Capuano F, Mulleder M, Kok R, Blom HJ, Ralser M. Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Anal Chem* 2014; **86**:3697–702.
 72. Simpson VJ, Johnson TE, Hammen RF. *Caenorhabditis elegans* DNA does not contain 5-methylcytosine at any time during development or aging. *Nucleic Acids Res* 1986; **14**:6711–19.
 73. Bonasio R, Li Q, Lian J, Mutti NS, Jin L, Zhao H, Zhang P, Wen P, Xiang H, Ding Y, et al. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Curr Biol* 2012; **22**:1755–1764.
 74. Hunt BG, Glastad KM, Yi SV, Goodisman MA. Patterning and regulatory associations of DNA methylation are mirrored by histone modifications in insects. *Genome Biol Evol* 2013; **5**:591–8.
 75. Beeler SM, Wong GT, Zheng JM, Bush EC, Remnant EJ, Oldroyd BP, Drewell RA. Whole-genome DNA methylation profile of the jewel wasp (*Nasonia vitripennis*). *G3 (Bethesda)* 2014; **4**:383–8.
 76. Gao F, Wang R, Liu M. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. *Front Physiol* 2014; **4**:410.

77. Wang X, Li Q, Lian J, Li L, Jin L, Cai H, Xu F, Qi H, Zhang L, Wu F, et al. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics* 2014; **15**:119.
78. Dabe EC, Sanford RS, Kohn AB, Bobkova Y, Moroz LL. DNA methylation in basal metazoans: insights from ctenophores. *Integr Comp Biol* 2015; **55**(6):1096–110.
79. Fneich S, Dheilly N, Adema C, Rognon A, Reichelt M, Bulla J, Grunau C, Cosseau C. 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors* 2013; **6**:167.
80. Sarda S, Zeng J, Hunt BG, Yi SV. The evolution of invertebrate gene body methylation. *Mol Biol Evol* 2012; **29**:1907–16.
81. Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MA. DNA methylation and chromatin organization in insects: insights from the ant *Camponotus floridanus*. *Genome Biol Evol* 2015; **7**:931–42.
82. Lyko F, Foret S, Kucharski R, Wolf S, Falckenhayn C, Maleszka R. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol* 2010; **8**:e1000506.
83. Zhu A, Chen M, Zhang X, Storey KB. Gene structure, expression, and DNA methylation characteristics of sea cucumber cyclin B gene during aestivation. *Gene* 2016; **594**:82–8.
84. Patalano S, Vlasova A, Wyatt C, Ewels P, Camara F, Ferreira PG, Asher CL, Jurkowski TP, Segonds-Pichon A, Bachman M, et al. Molecular signatures of plastic phenotypes in two eusocial insect species with simple societies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**:13970–5.
85. Galbraith DA, Yang X, Nino EL, Yi S, Grozinger C. Parallel epigenomic and transcriptomic responses to viral infection in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS Pathog* 2015; **11**:e1004713.
86. Riviere G, Wu GC, Fellous A, Goux D, Sourdain P, Favrel P. DNA methylation is crucial for the early development in the Oyster *C. gigas*. *Mar Biotechnol (NY)* 2013; **15**:739–53.
87. Li Y, Huang X, Guan Y, Shi Y, Zhang H, He M. DNA methylation is associated with expression level changes of galectin gene in mantle wound healing process of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol* 2015; **45**:912–8.
88. Saint-Carlier E, Riviere G. Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Lett* 2015; **589**(13):1459–66.
89. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T, Kandel ER. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* 2012; **149**:693–707.
90. Denissenko MF, Chen JX, Tang MS, Pfeifer GP. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**:3893–8.
91. Munaron D, Tapie N, Budzinski H, Andral B, Gonzalez JL. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar Coast Shelf Sci* 2012; **114**:82–92.
92. Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, Malas JP, Costil K. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J Environ Sci Health B* 2008; **43**:655–64.
93. Rosa RD, Alonso P, Santini A, Vergnes A, Bachere E. High polymorphism in big defensin gene expression reveals presence-absence gene variability (PAV) in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 2015; **49**:231–8.
94. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 2011; **27**:1571–2.
95. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010; **26**:841–2.
96. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; **25**:2078–9.
97. Akalin A, Kormaksson M, Li S, Garrett-Bakelman FE, Figueroa ME, Melnick A, Mason CE. methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol* 2012; **13**:R87.
98. Barturen G, Rueda A, Oliver JL, Hackenberg M. MethylExtract: High-Quality methylation maps and SNV calling from whole genome bisulfite sequencing data. *F1000Res* 2013; **2**:217.
99. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 2012; **14**:178–92.
100. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 2011; **27**:2156–8.
101. Ramirez F, Ryan DP, Gruning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dundar F, Manke T. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* 2016; **44**:W160–5.
102. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**:E65.
103. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; **18**:1427–31.
104. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**:2725–9.
105. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**:W465–9.
106. Rosa RD, de Lorgeril J, Tailliez P, Bruno R, Piquemal D, Bachere E. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics* 2012; **13**:252.

Supplementary data:

Figure S1: Workflow of bioinformatics procedure of BS-seq data.



Number of reads by step per each library.

	Sea water controls			Diuron exposed samples			Total	Average
Sample names	TE1-11	TE1-14	TE3-19	D3-17	D1-19	D3-12		
Raw reads forward	76947787	99450823	135093644	78957937	100256574	129459645	620166410	103361068
Raw reads reverse	76947787	99450823	135093644	78957937	100256574	129459645	620166410	103361068
Filter by quality forward	63893441	80059937	107827971	34306993	82902496	106249848	475240686	79206781
Filter by quality reverse	61610394	79060596	102015384	59809977	80811534	97446437	480754322	80125720,3
Reads pairs interlace	56813297	71877493	93170937	29052121	74333200	89366412	414613460	69102243,3
Aligned reads ⁽¹⁾	30603790	39276420	56044244	15822868	39697570	40349780	221794672	36965778,7
500 bp windows with ≥10x cov.	201,672	287,928	398,091	57,819	281,736	279,167		251,069
Large highMeth regions	9,339	10,344	11,332	4,956	7,529	10,242		8,957

⁽¹⁾ Final line represent reads number obtained after alignment with Bismark and used for differential of methylation.

Figure S2: List of the 10 sequenced regions targeted by PCR after DNA bisulfite conversion.

Data contents and legends

List of the 10 sequenced regions targeted by PCR after DNA bisulfite conversion. The CGI number according to genome assembly V9 and the XLOC number according to previous RNA-Seq data [40] is given when present. The number of CpG sites for each amplicon is given. Primers details are given in Table S1. The slide numbers containing detailed information for each sequenced amplicon are indicated.

Region	CGI number	XLOC number	Number of CpG sites	Slide number
Scaffold1255:365901..366597	cgl_10018082	XLOC_005912	25	2, 3, 4
Scaffold1154:309231..309691	cgl_10026162	XLOC_004001	15	5, 6, 7
Scaffold37178:4921..5527	cgl_10002304	XLOC_022371	7	8, 9, 10
Scaffold41174:81270..81829	cgl_10004794	XLOC_025872	20	11, 12, 13
Scaffold33832:13205..13768			6	14, 15, 16
Scaffold42366:107142..107725	cgl_10006702	XLOC_027741	20	17, 18, 19
Scaffold42366:108172..108673	cgl_10006702	XLOC_027741	11	20, 21, 22
Scaffold1720:210182..210722	cgl_10011947	XLOC_013090	7	23, 24, 25
Scaffold433:896527..897085			12	26, 27, 28
Scaffold43170:116309..116863	cgl_10009103	XLOC_029410	4	29, 30, 31

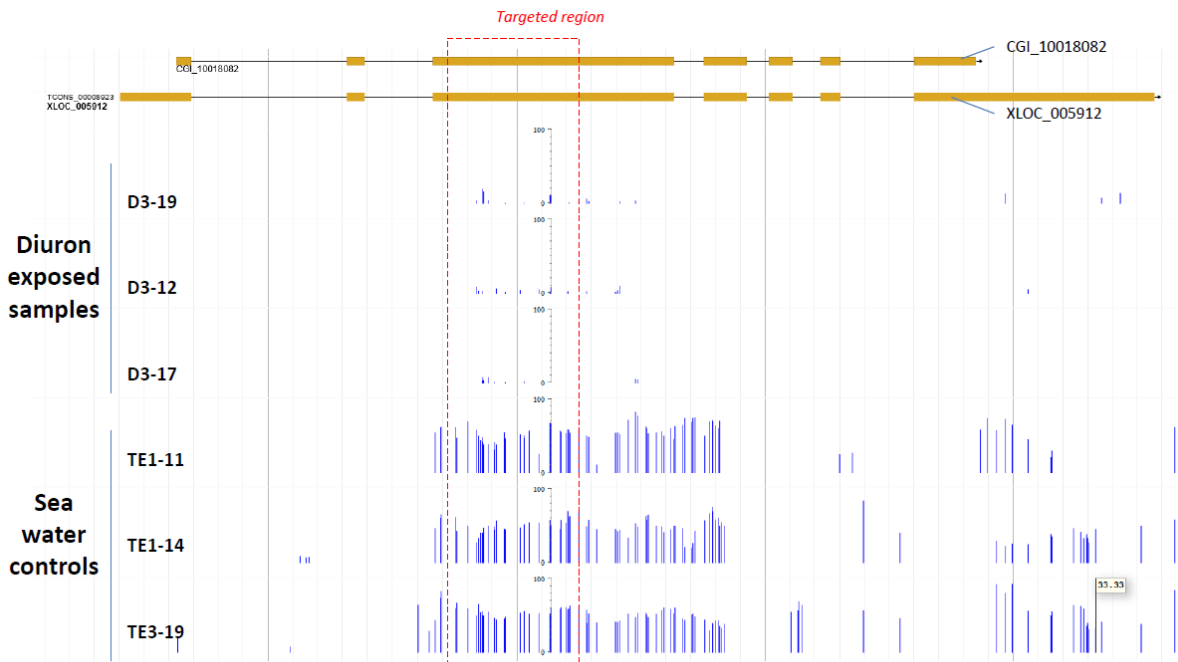
For a targeted region, each data set contains:

- **A Screenshot of the BS-Seq results for the three individuals per condition.** This screenshot is an extract of the *C. gigas* jbrowser interface which allows visualization of transcriptomic and DNA methylation data. Upper panel represents the annotation of genes in the current genome assembly V9 (CGI number), and the CDS according to previous transcriptomic data [40]. Bottom panel represents the methylated cytosine position. X-axis represents the position of each methylated cytosine. Y axis (bars) represents the % of methylation observed for each methylated cytosine (scale is 0 to 100). The 6 tracks represent the 3 biological replicates of individual spat from genitors treated with diuron or control (from top to bottom).
- **The comparison between the BS-Seq and the target analysis using conventional sanger sequencing**
- **The graphic results indicating interindividual variability and treatment effect on each CpG sites:**
 - **DNA methylation interindividual variability in each condition:** This graph represents the average methylation of all the CpG sites included in the tested region for each of the 10 individual tested per condition
 - **Effect of each treatment on DNA methylation level for each CpG sites:** This graph represents the average methylation of all the individuals for each of the CpG sites included in the tested region.

The individuals 1 to 10 correspond to sea water controls (SWC - blue color). The individuals 11 to 20 correspond to solvent control (SC - Orange color). The individuals 21 to 30 correspond to diuron exposed samples (D - Gray color).

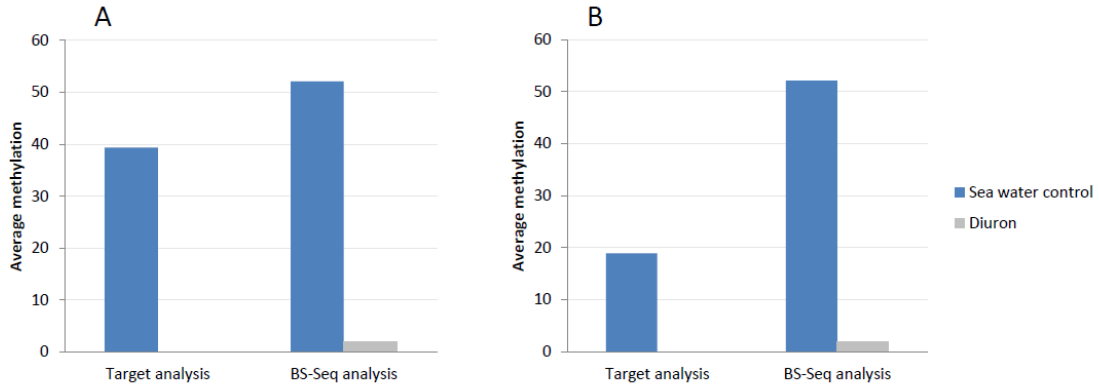
Scaffold1255:365901...366597 – Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract of scaffold1255:363148..369661 (6.51 Kb)



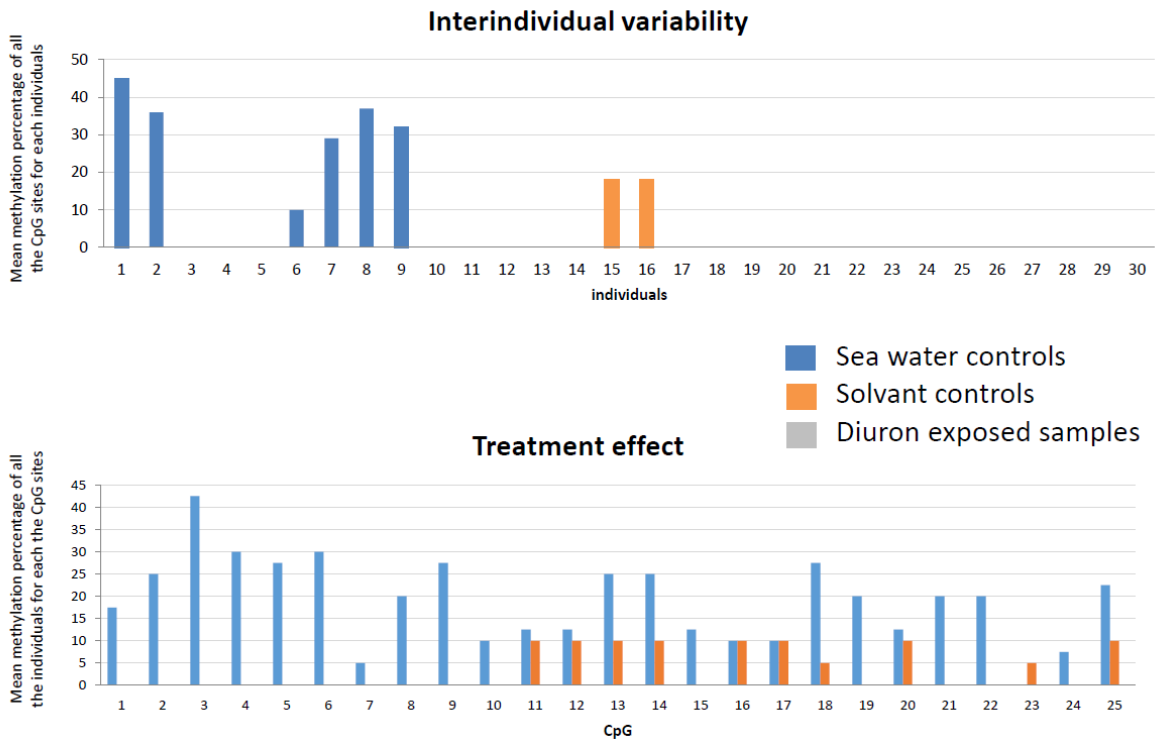
Blue bars represent the percentage of methylation at CpG position

Scaffold1255: 365901...366597 Comparison Sanger/BS-Seq



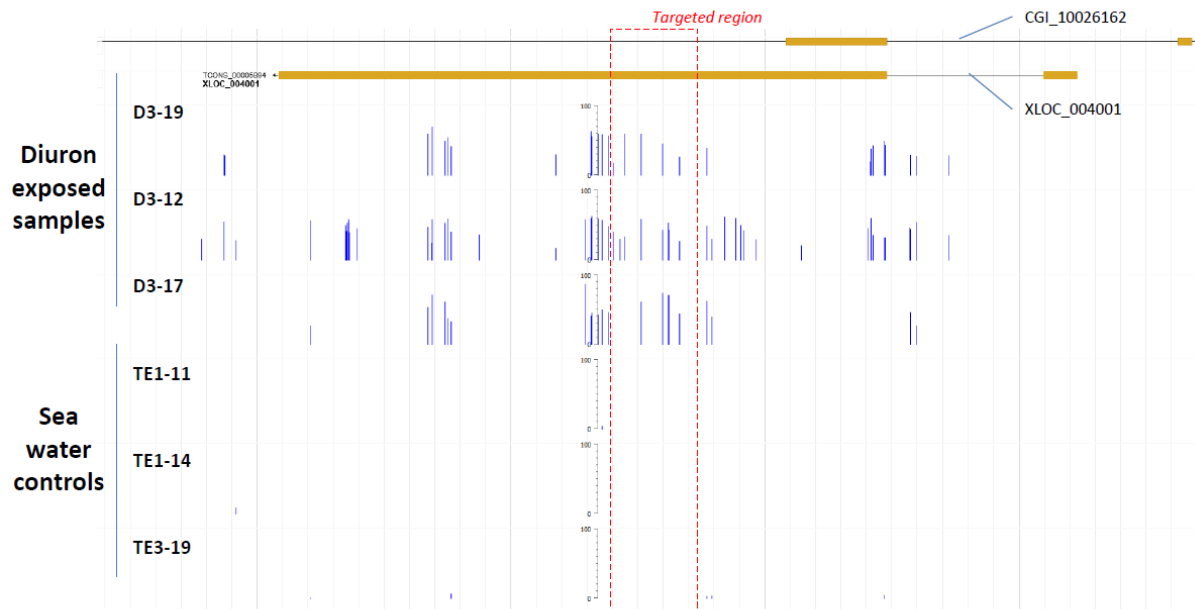
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold1255: 365901...366597



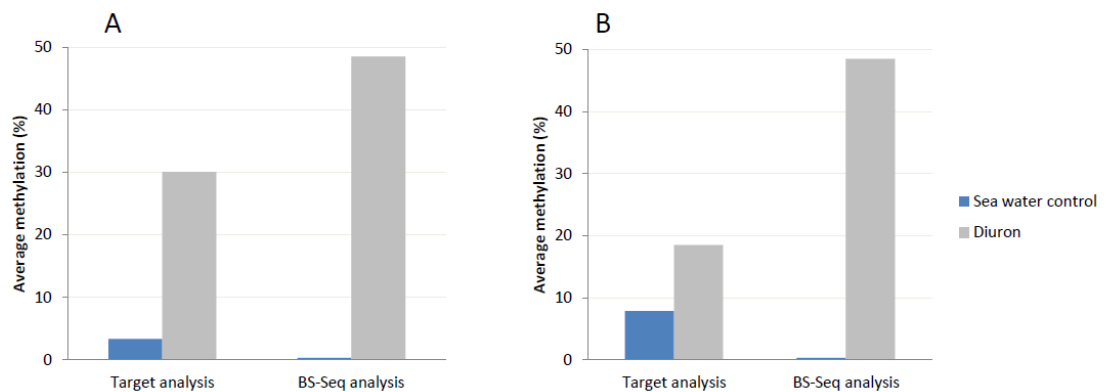
Scaffold1154:309231..309691 Screen shot of BS-Seq data

*J*browser extract of scaffold1154:306155..312161 (6.01 Kb)



Blue bars represent the percentage of methylation at CpG position

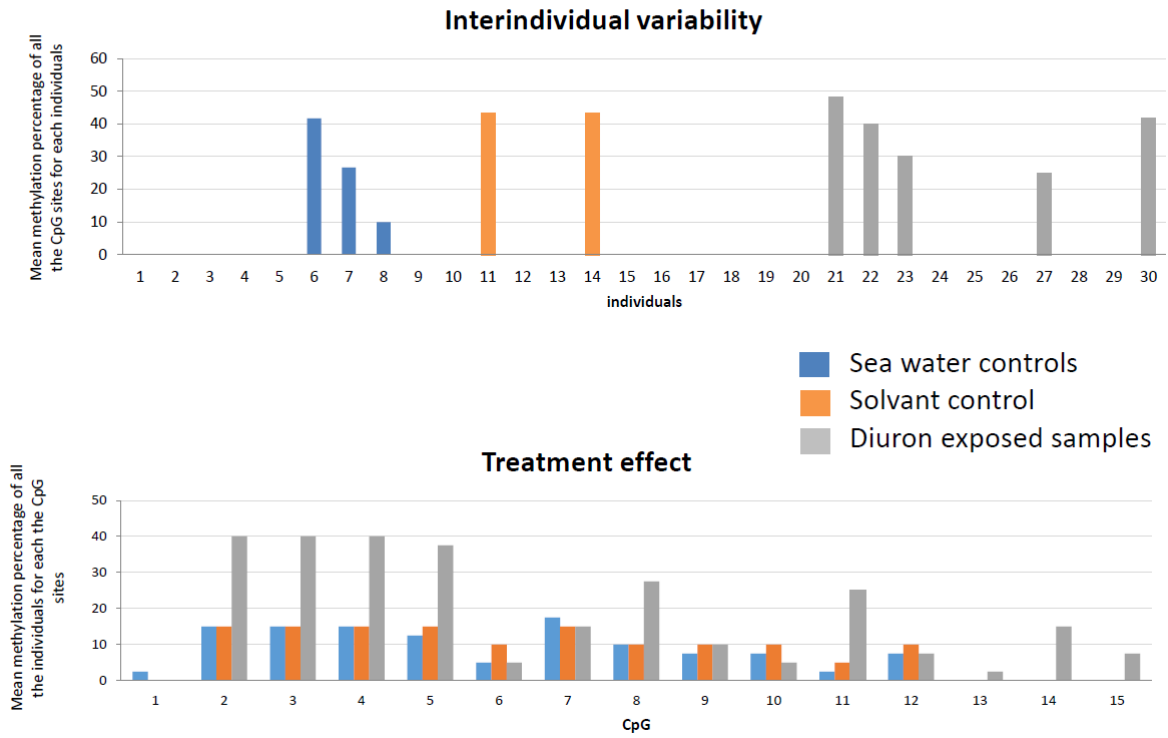
Scaffold1154:309231..309691 Comparison Sanger/BS-Seq



A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.

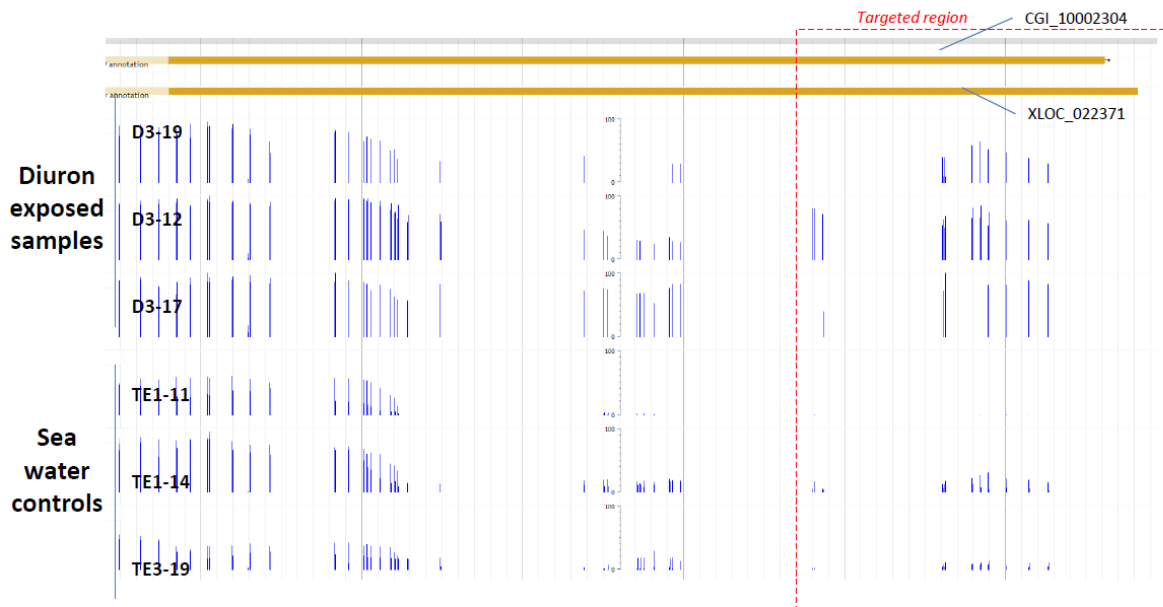
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold1154:309231..309691



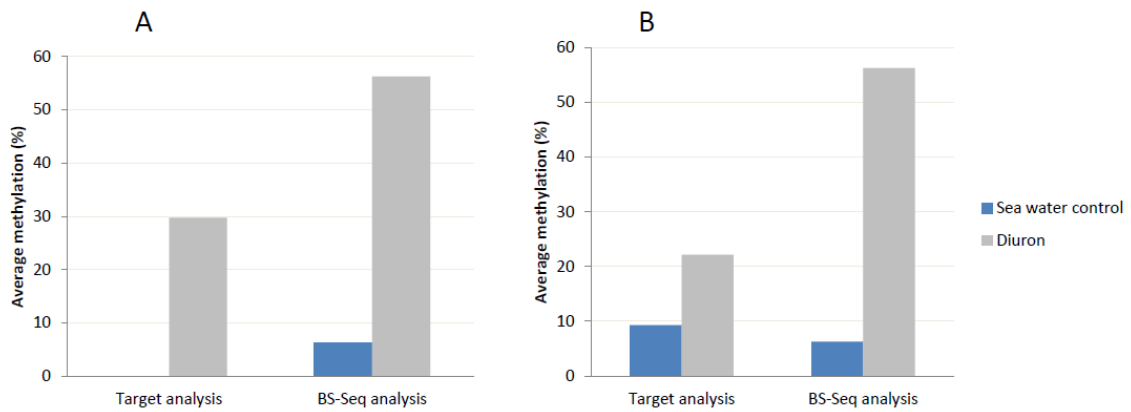
Scaffol37178: 4921..5527 Screen shot of BS-Seq data

Genome extract from scaffold37178:3782..5512 (1.73 Kb)



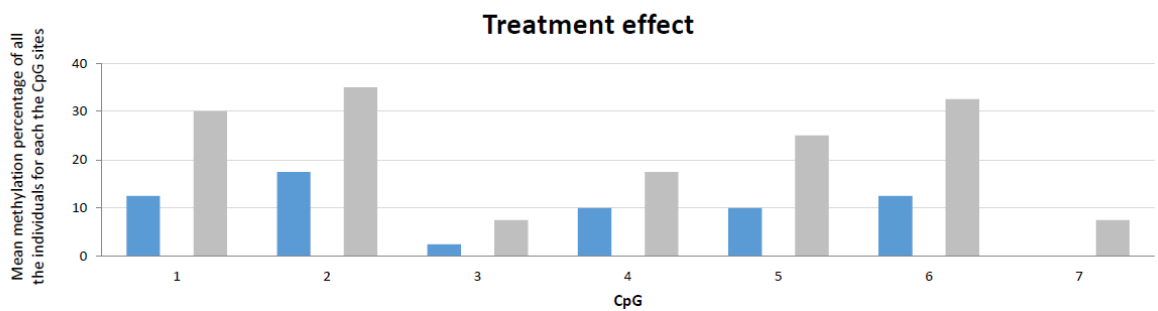
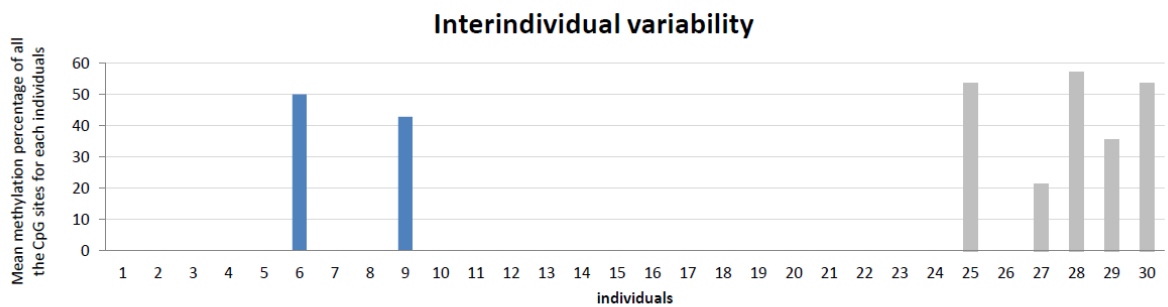
Blue bars represent the percentage of methylation at CpG position

Scaffol37178: 4921..5527 Comparison of Sanger/BS-Seq



A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

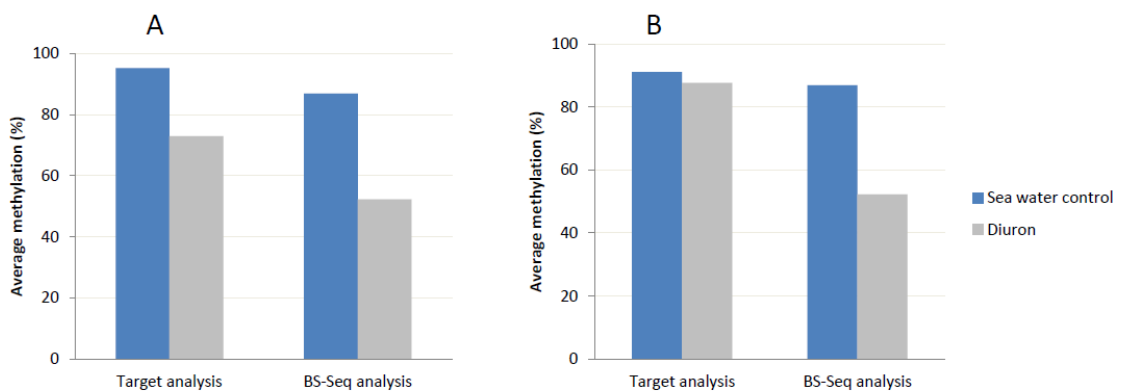
Scaffol37178: 4921..5527



Scaffold41174: 81270..81829 Screen shot of BS-Seq data

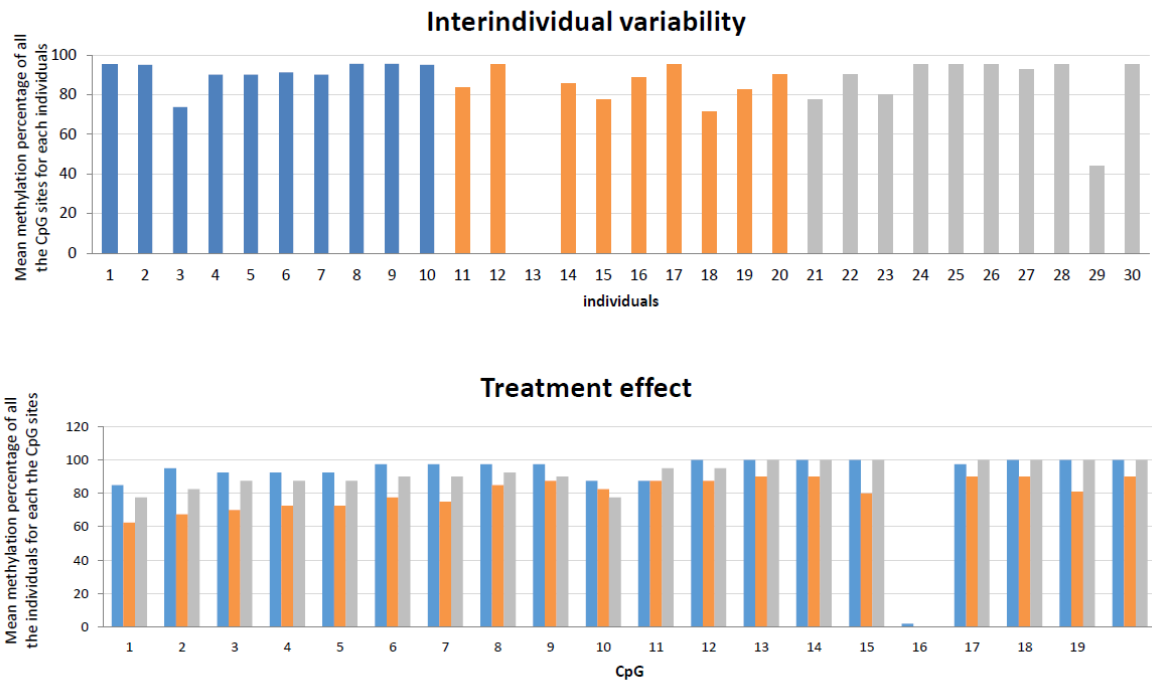


Scaffold41174: 81270..81829 Comparison of Sanger/BS-Seq



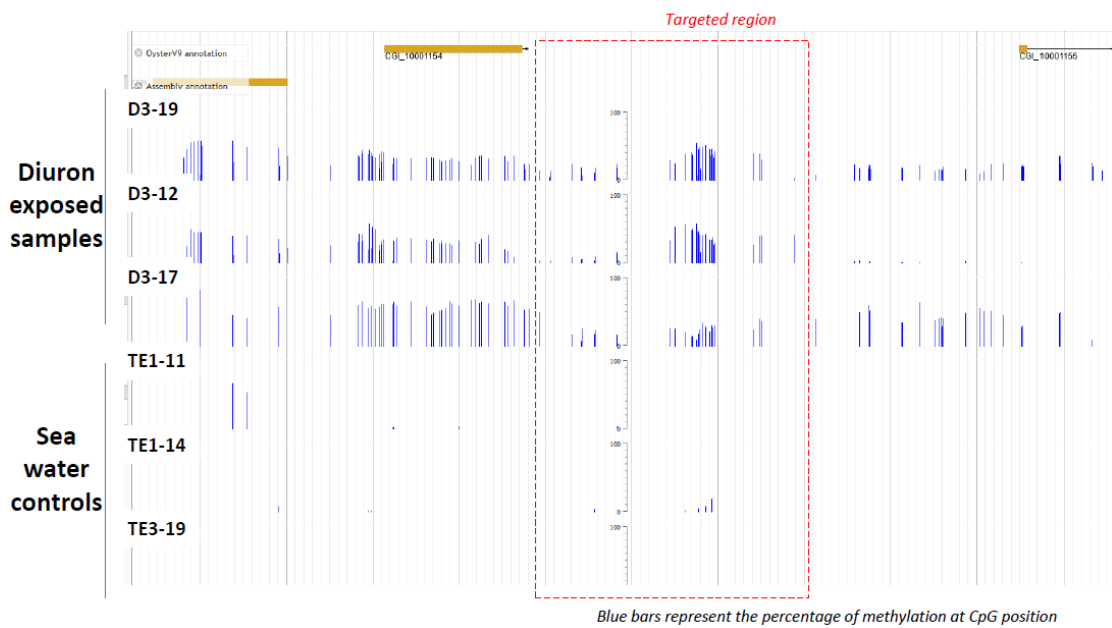
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold41174: 81270..81829

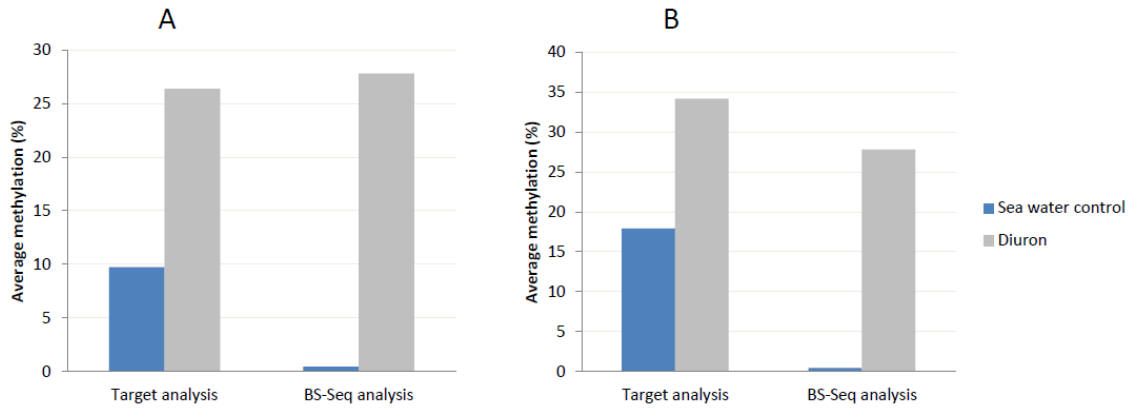


Scaffold33832: 13205..13768 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract of scaffold33832:12053..14898 (2.85 Kb)

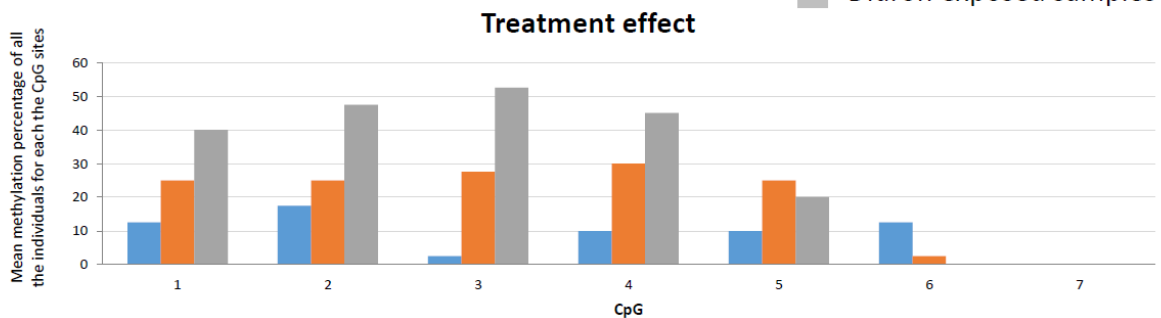
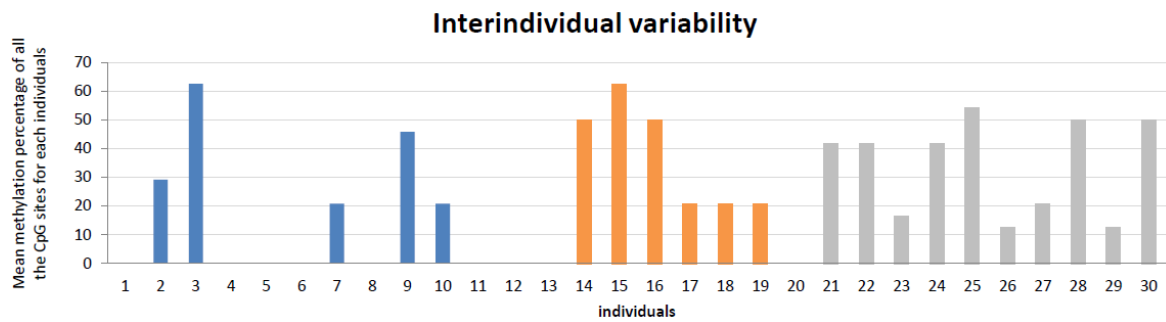


Scaffold33832: 13205..13768 Comparison of Sanger/BS-Seq



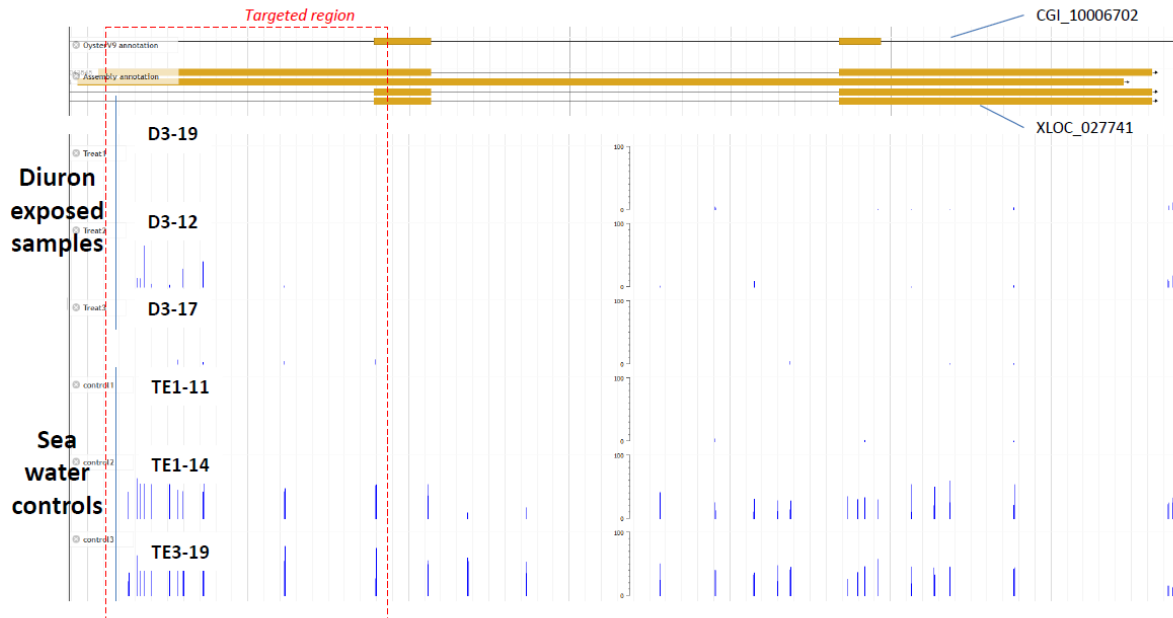
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold33832: 13205..13768



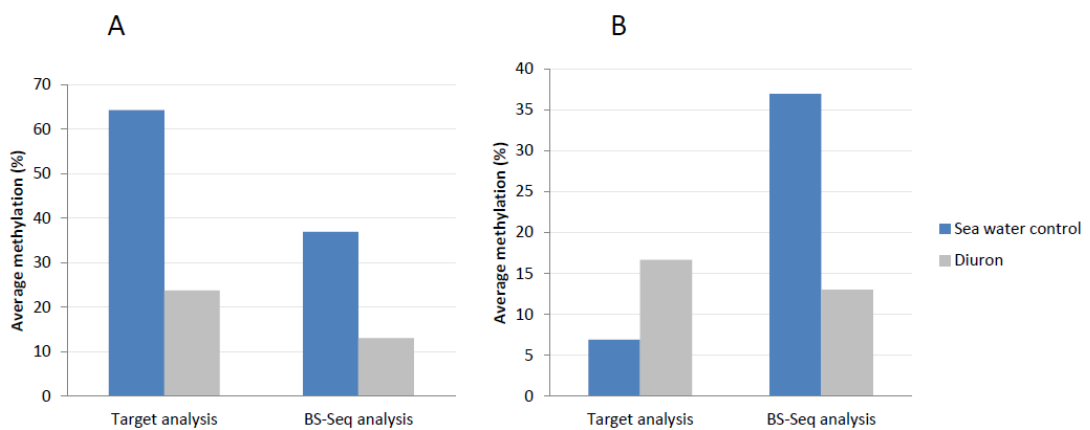
Scaffold42366: 107142..107725 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract from scaffold42366:107224..108954 (1.73 Kb)



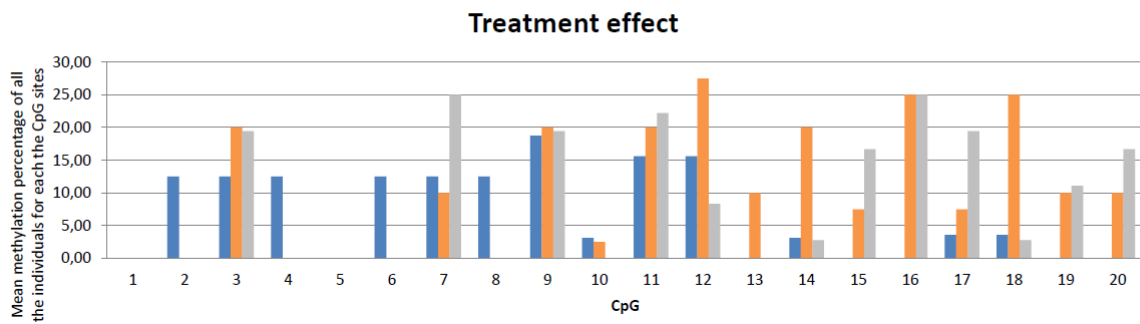
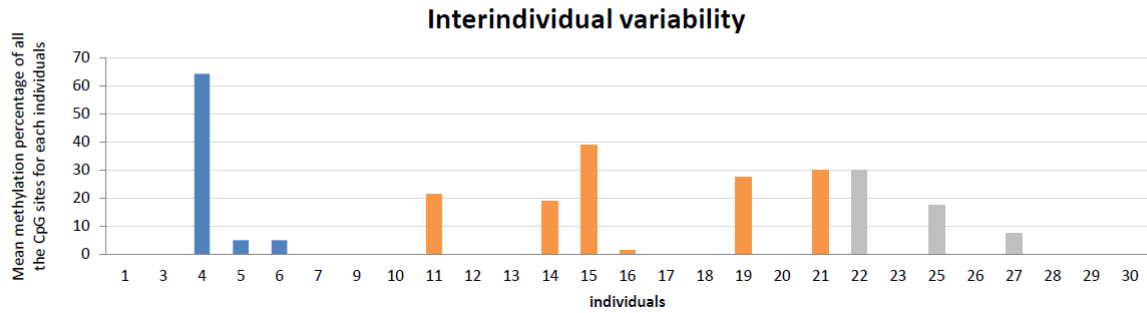
Blue bars represent the percentage of methylation at CpG position

Scaffold42366: 107142..107725 Comparison of Sanger/BS-Seq



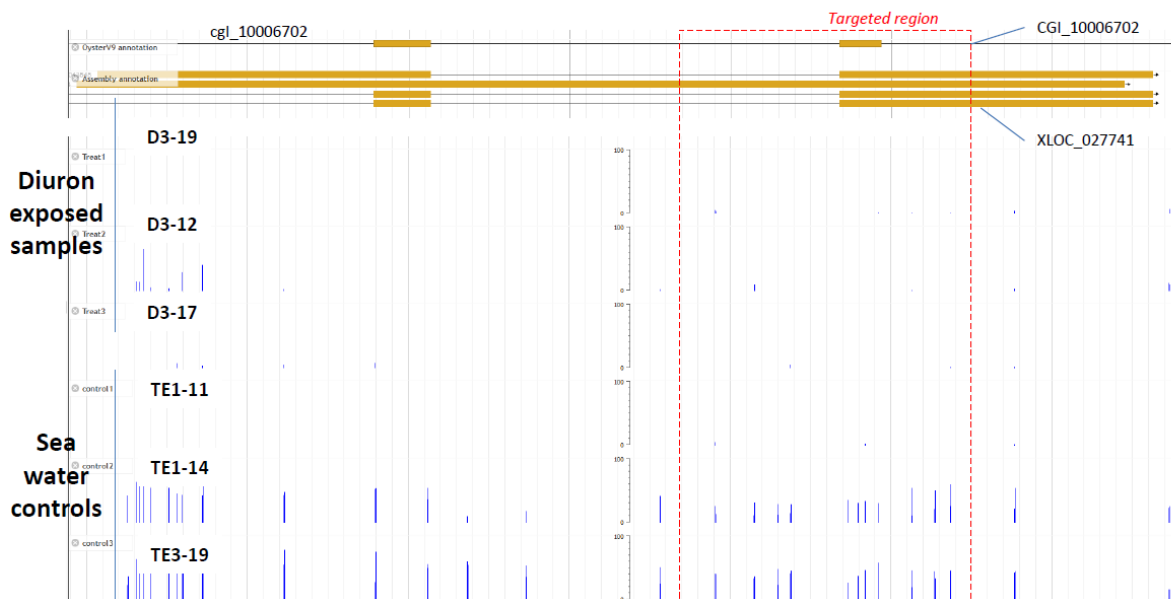
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold42366: 107142..107725



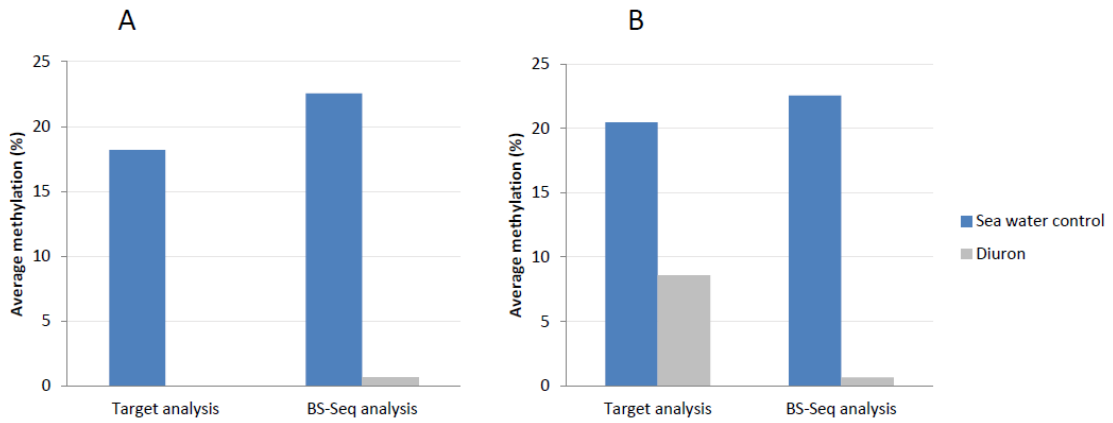
Scaffold42366: 108172..108673 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract from scaffold42366:107224..108954 (1.73 Kb)



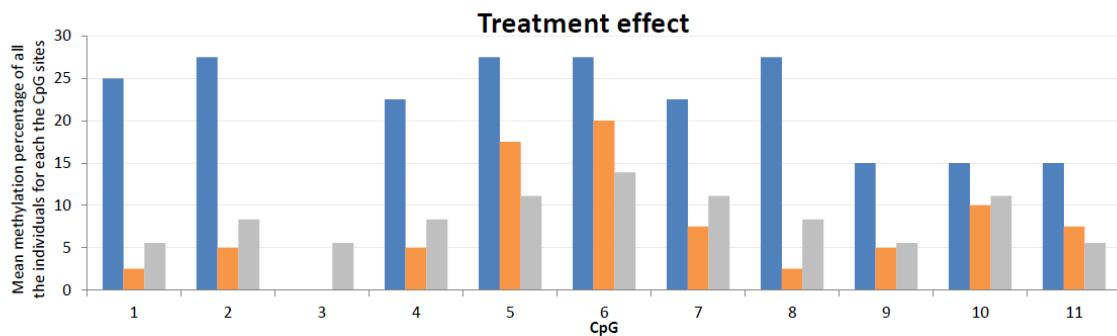
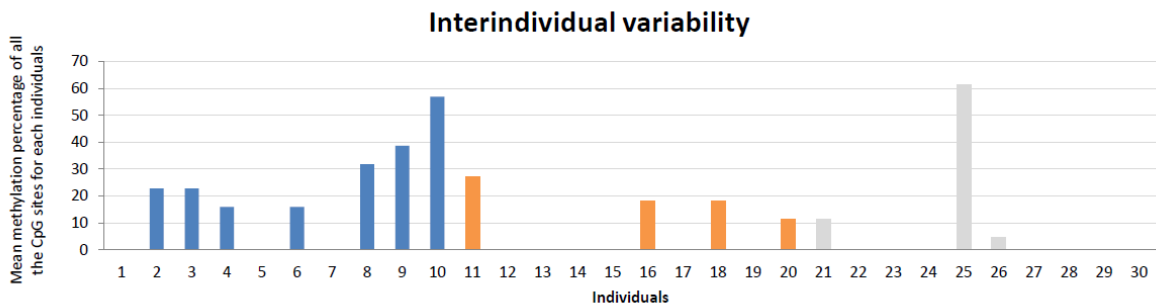
Blue bars represent the percentage of methylation at CpG position

Scaffold42366: 108172..108673 Comparison of Sanger/BS-Seq



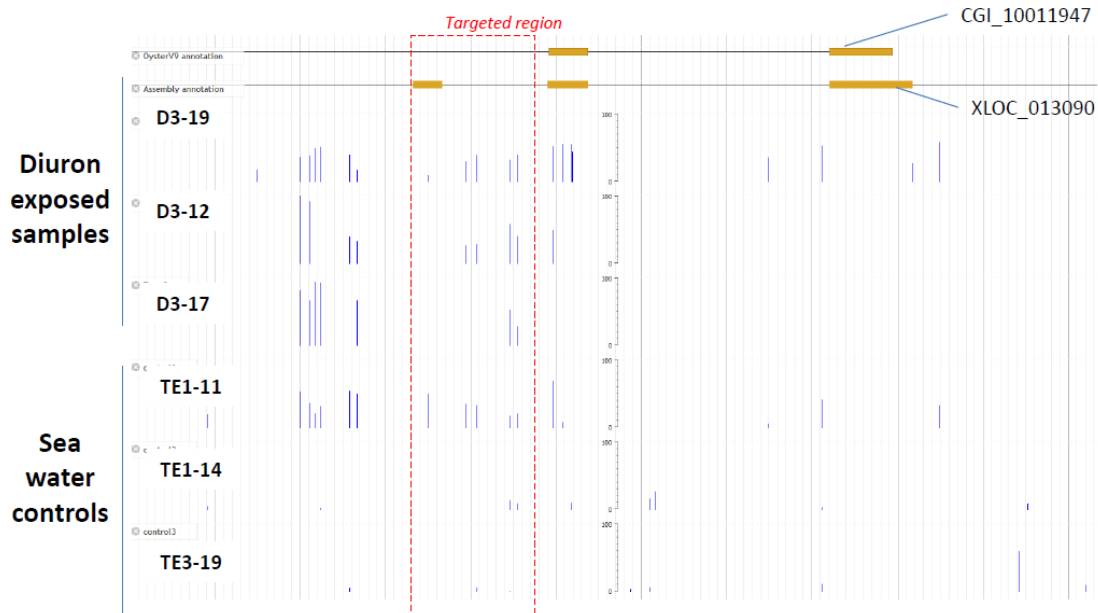
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold42366: 107142..107725

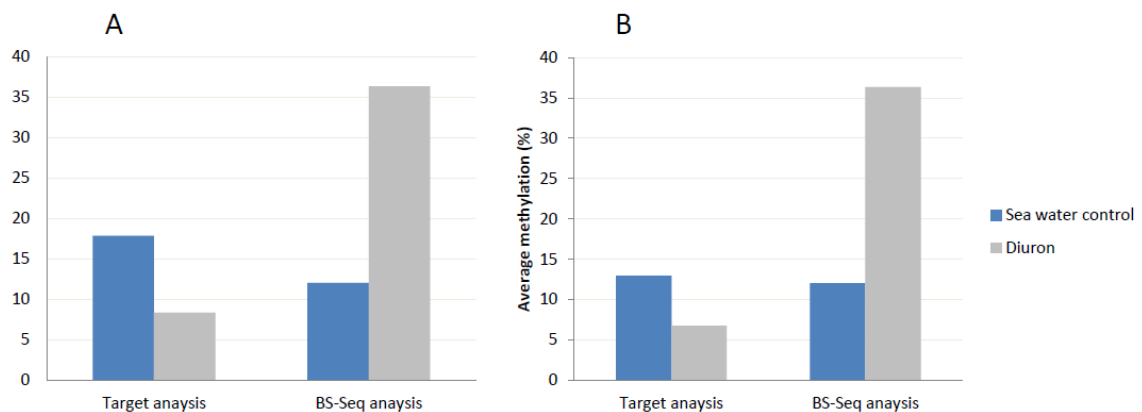


Scaffold1720: 210182..210722 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract from scaffold1720:209499..212366 (2.87 Kb)



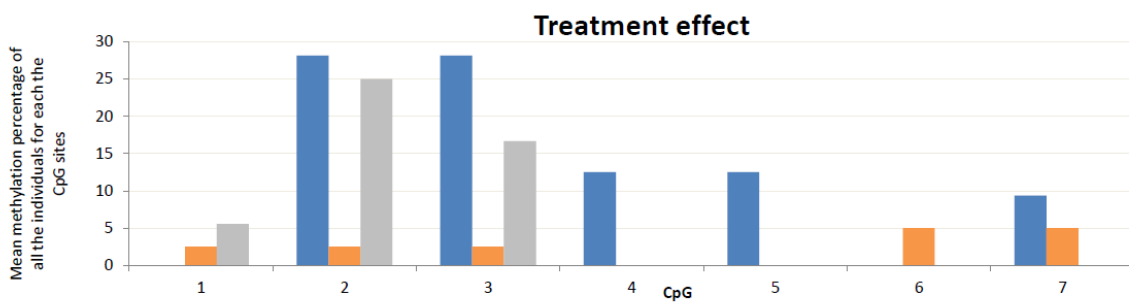
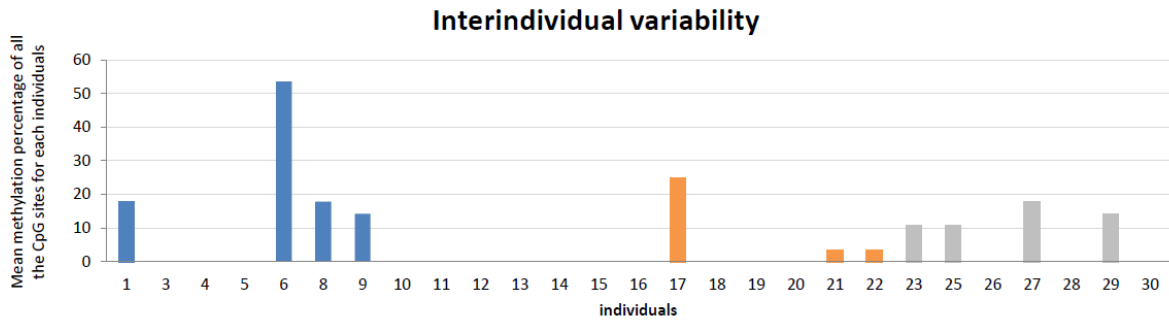
Scaffold1720: 210182..210722 Comparison of Sanger/BS-Seq



A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.

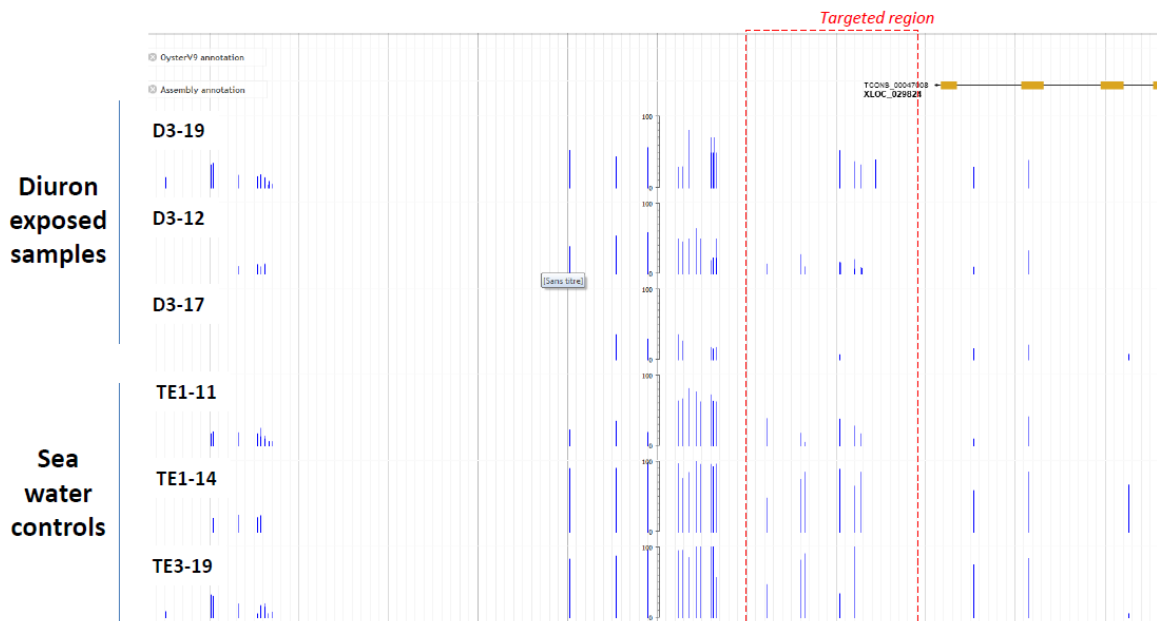
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold1720: 210182..210722

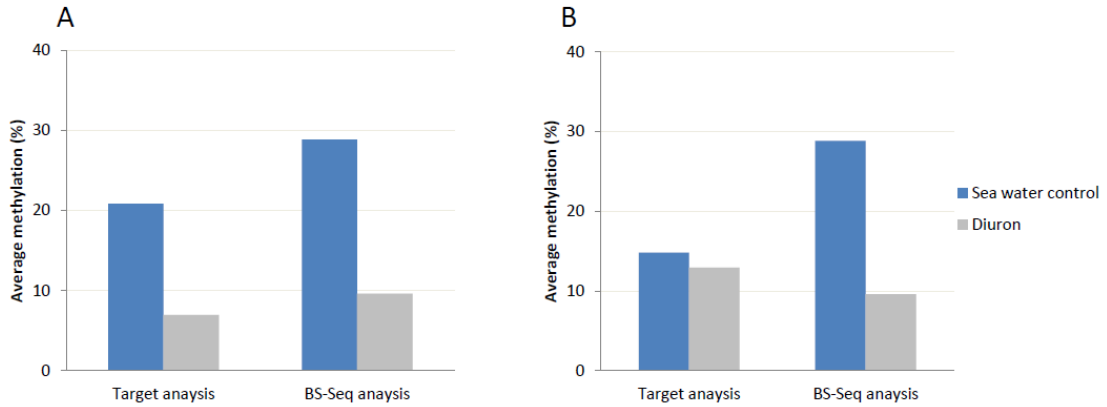


Scaffold433: 896527..897085 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract from scaffold433:894823..897668 (2.85 Kb)

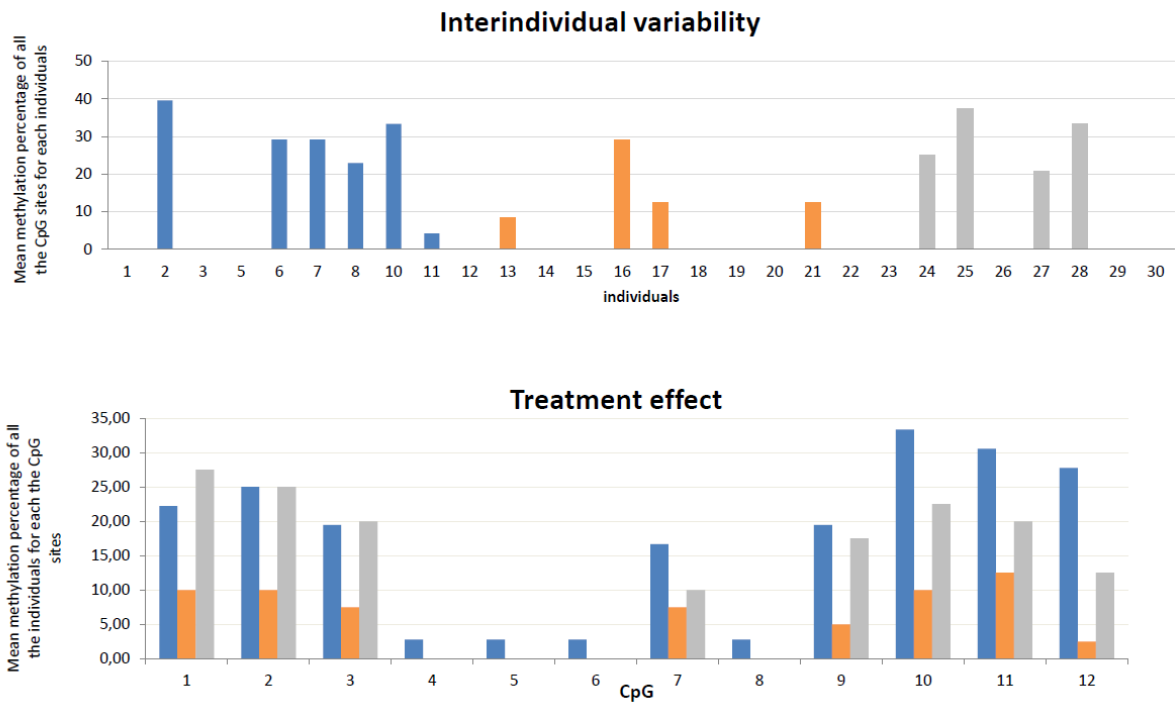


Scaffold433: 896527..897085 Comparison of Sanger/BS-Seq



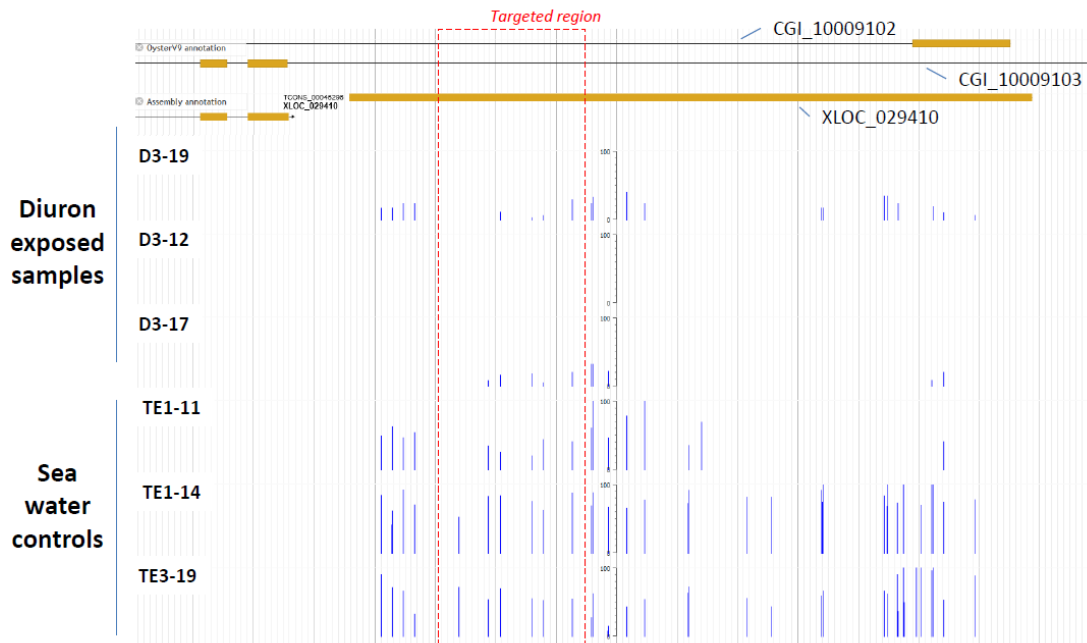
A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold433: 896527..897085

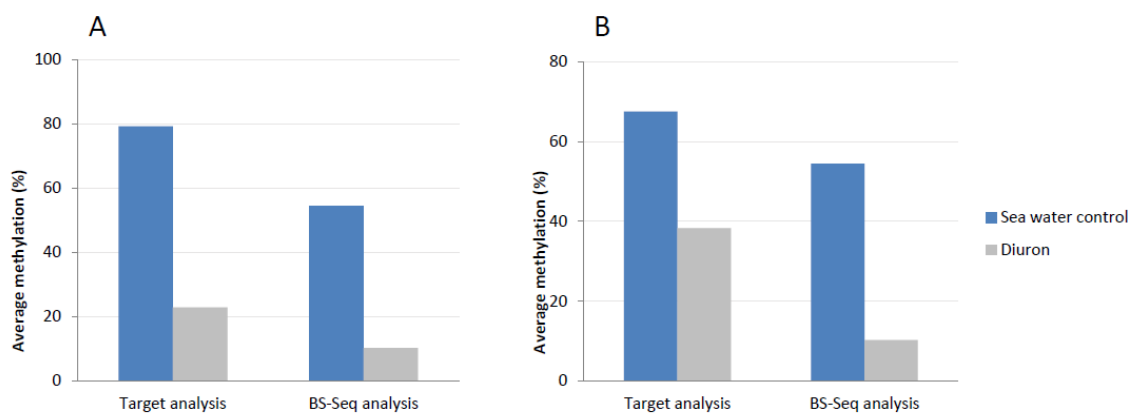


Scaffold43170: 116309..116863 Screen shot of BS-Seq data

Jbrowser extract from scaffold43170:115000..118969 (3.97 Kb)



Scaffold43170: 116309..116863 Comparison of Sanger/BS-Seq



A- Comparison using the average methylation of the same 3 individuals for target analysis and BS-Seq.
B- Comparison using the average methylation of 10 individuals for target analysis and 3 individuals for BS-Seq analysis

Scaffold43170: 116309..116863

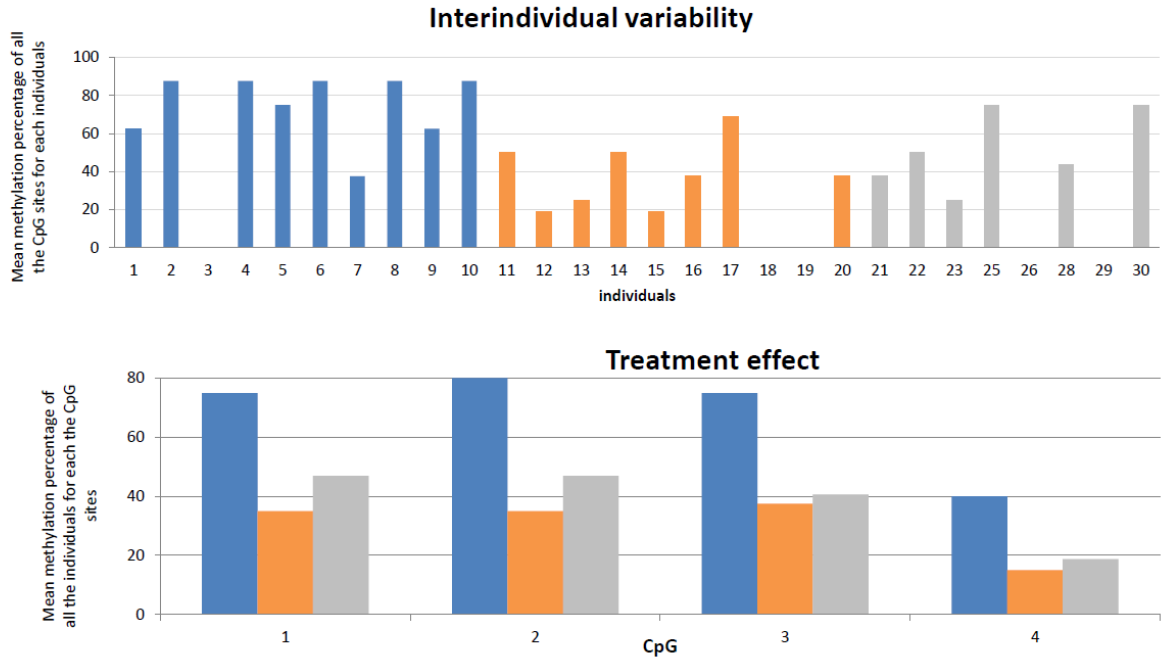


Figure S3: Positive Predictive Value calculation

The PPV value was calculated using a MedCalc based interface (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)

Diagnoses were based on the DNA methylation profile of the two markers:

- Marker 1: scaffold33832:13205..13768, considered as D for diagnosis when the threshold is above 25% (otherwise SWC)
- Marker 2: scaffold1255:365901..366597, considered as D for diagnosis when the threshold is equal to 0% (otherwise SWC)

True positive took into account a positive occurrence of D diagnosis in the two markers in the D group otherwise they were considered as false negative.

False negative took into account a positive occurrence of D diagnosis in the two markers in the control group otherwise they were considered as true negative.

Results from the SWC group:

Individuals from SWC group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% methylation in marker 1 (threshold = 25%)	0,00	29,17	62,50	0,00	0,00	0,00	20,83	0,00	45,83	20,83
Diagnosis in marker 1	SWC	D	D	SWC	SWC	SWC	SWC	SWC	D	SWC
% methylation in marker 2 (threshold = 0%)	29,76	29,83	0,00	0,00	0,00	14,43	28,58	30,72	28,43	0,00
Diagnosis in marker 2	SWC	SWC	D	D	D	SWC	SWC	SWC	SWC	D
Final diagnosis (marker 1 + marker 2)	SWC	SWC	D	SWC	SWC	SWC	SWC	SWC	SWC	SWC

Results from the D group:

Individuals from D group	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
% methylation in marker 1 (threshold = 25%)	41,67	41,67	16,67	41,67	54,17	12,50	20,83	50,00	12,50	50,00
Diagnosis in marker 1	D	D	SWC	D	D	SWC	SWC	D	SWC	D
% methylation in marker 2 (threshold = 0%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diagnosis in marker 2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Final diagnosis (marker 1 + marker 2)	D	D	SWC	D	D	SWC	SWC	D	SWC	D

	Present	n	Absent	n	Total
Positive	True positive	a	False positive	c	a+c
Negative	False Negative	b	True negative	d	b+d
Total		a+b		c+d	
PPV		a/(a+c)			
NPV		d/(b+d)			

	Present	n	Absent	n	Total
Positive	True positive	6	False positive	1	a+c
Negative	False Negative	4	True negative	9	b+d
Total		a+b		c+d	
PPV		85.71			
NPV		69.23			

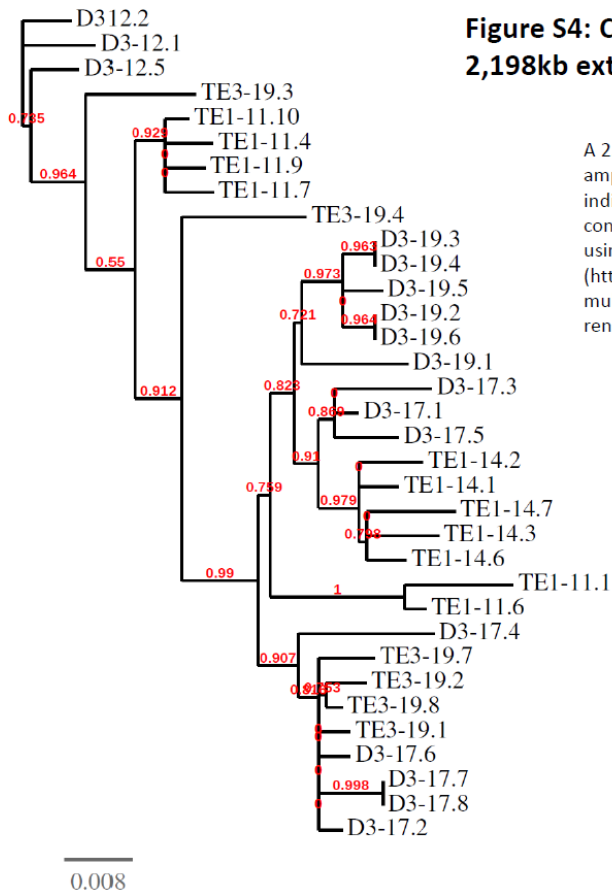


Figure S4: Clustering analysis performed on a 2,198kb extract of XLOC_005912

A 2.198 fragment from XLOC_005912 (CGI_10018082) was amplified from D individuals (D3-17, D3-12, D3-19) and SWC individuals (TE1-11, TE1-14, TE1-19), cloned and 17 inserts per condition were sequenced. Phylogeny analysis was performed using the on line phylogeny analysis tools (<http://www.phylogeny.fr/>) [105] which uses MUSCLE for multiple alignment, PhyML for tree building, and TreeDyn for tree rendering.

Tables S1 : a) Target BS primers

<i>Scaffold</i>	<i>CGI number</i>	<i>XLOC number</i>		<i>Forward Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Position on the scaffold</i>	<i>Amplicon size</i>
<i>Scaffold_1255</i>	cGI_10018082	XLOC_005912	External primers	TAtAtAAAGAGGAGGtAGAAGTgtAt	TTaCCATCAAAaCaTaTTTTCTTTTT	365839 - 366705	867
			Internal primers	tTGGAAAtAAAtTgTAGAAGAGAAGG	aTTCCaAaCTCATCCAaATaaTaaCTTA	365901 - 366597	697
<i>Scaffold_1154</i>	cGI_10026162	XLOC_004001	External primers	tAAAGGtTgTAAATGGGAATTTtAGAT	aaAaACTTTaaTaCTaTTCAaaaAAATCTT	308944-309853	910
			Internal primers	TtTGGtTGAAAttttAAttTgTtT	aTCACCATaAaCAaCACCTACAAaC	309231-309691	461
<i>Scaffold_37178</i>	cGI_10002304	XLOC_022371	External primers	tTGATGGtTATGAAGAAtATTGTgAtAT	aATATaaCATCATAaaACCAACTTTCC	4802-5721	920
			Internal primers	AAGTTAtTTAAGTtTGGTtAtAGAAGAt	AaCTaCaACaAaTCAAAaACATaCTaC	4921-5527	607
<i>Scaffold_41174</i>	cGI_10004794	XLOC_025872	External primers	tATTTGATTTTTATTtTtAAATATTTAAAG	aTACTAAAaTTaCTaTACCCCTTTTTaTaa	57054-57909	856
			Internal primers	AAAtTTAAATAtAtAGTTATGGAaaaaAtAT	TCTCACTTaaTCAAAaCTTaaAAATaTaTa	57289-57855	567
<i>Scaffold_41174</i>	cGI_10004794	XLOC_025872	External primers	AttAGtATtAAAGAAAATAAtTTTTGTtTT	aTaACCTATTaCAATTaaTCTTTaTCC	81064-81907	844
			Internal primers	AAGAAAAtTATATTtAAAAGATTTTTtTT	aaaCCAATTaTTACCATTTTTATaCCC	81270-81829	560
<i>Scaffold_33832</i>			External primers	GtTTAGtAGTATGGAAGAGGAtATTGTGtT	TCAATaAAACAAATTaAAACATTAaaaa	13084-13958	875
			Internal primers	GTGTTAtTTATAATTtATGtTTTGG	AaATTaATATTaTTTTaTTTAAATTCC	13205-13768	564
<i>Scaffold_42366</i>	cGI_10006702	XLOC_027741	External primers	tTTTGTGAAGTGTtAGGGGTtAAtAT	AACTATACTTaaCAaTaCCTTTCATTTc	107082-107660	879
			Internal primers	TGAAATTGAtAttTGAGAAAAttATTGT	CTCTTTCAaaCTaCCTaCAaaTTAAC	107142-107725	584
<i>Scaffold_42366</i>	cGI_10006702	XLOC_027741	External primers	tTTAAAGTTGTATAAAGAGAGtAATTtTTG	CTTaTTAAaAATaCCAAATCTAaTTTAAA	108094-108898	805
			Internal primers	GGGTtAtTGAAtAtTTAAATAATTGGGtA	aTCCCTTATTaaCACAAaAAaTCAA	108172-108673	502
<i>Scaffold_1720</i>	cGI_10011947	XLOC_013090	External primers	tTTTTAAATTGATGATGtATTTTTtAAAG	aaTTCTATTTTTCCCAaaAaTTTTaCTaC	209929-210860	864
			Internal primers	GATtAtTtTGAAAGAttTAtTTTGGG	ATCCTTCTTATTTCaAAaCAaaCAA	210182-210722	541
<i>Scaffold_433</i>			External primers	AATTGTTAtATGtAtTTAAAATATG	aAAAaAaATaAaAAAAATaACCAAAC	896372-897311	940
			Internal primers	tTtAAGAAAAttATTGTtAAtTGAAG	AAaaaATCAATaACAAAACaAAaAAA	896527-897085	559
<i>Scaffold_43170</i>	cGI_10009103	XLOC_029410	External primers	tttTTtATTTtTTtAtATGTTTTGtATA	AaTTaAaCCAaTTaCATCAaTaCTCC	116039-116928	890
			Internal primers	TTTgtTtTtTGTtAGTTTGTGATGAt	TAAaaaCCCTAaATCCAaTTAaTaACC	116309-116863	555

Bold lowercase letters indicate deoxycytosine position in the initial Genomic sequence which have been converted into uracyl after the bisulfite treatment and which result into a deoxythymine after treatment.

b) qPCR primers

<i>XLOC number</i>	<i>Forward Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Position on the scaffold</i>	<i>Amplicon size (bp)</i>	<i>Efficiency</i>
	EKC33063.1F: GAGCGTGAACGTGGTATCAC	EKC33063.1R: ACAGCACAGTCAGCCTGTGA	position 230492 to 230265	227	1.8
	EKC19428.1F: AATCTTGCACCGTCATGCAG	EKC19428.1R: AATCAATCTCTGCTGATCTGG	position 27166 to 26931	235	1.89
	AFJ91756.1F: CAGAAGTGCCAGCTGACAGTC	AFJ91756.1R: AGAAGCAATCTCACACGGAC	position 23726 to 23950	224	2.12
<i>XLOC_005912</i>	<i>XLOC_005912.3F: TGATCATTGCCACCAGAGA</i>	<i>XLOC_005912.3R: GAAAACAGGCTCGACATGGC</i>	position 364428 to 364557	129	1.92
<i>XLOC_004001</i>	<i>XLOC_004001.1F: TGGCCGCTCTGCCAGGATGACA</i>	<i>XLOC_004001.1R: GCCACCGCATACCATGTTTCCCA</i>	position 309501 to 309385	116	1.87
<i>XLOC_020586</i>	<i>XLOC_020586.1F: GCCGCGCTGAGTTTACGGGA</i>	<i>XLOC_020586.1R: TGCCCGTCGAGTGCAGAAA</i>	position 12121 to 12256	135	1.89
<i>XLOC_029410</i>	<i>XLOC_029410.1 F: GGGCGCTGGATAAATGGCACCC</i>	<i>XLOC_029410.1 R: TGGAAGCGGCTTAGGCCAAGTA</i>	position 116020 to 116169	149	2.12
<i>XLOC_030549</i>	<i>XLOC_030549.1F: TAGGCAACGCTTCACAAGGT</i>	<i>XLOC_030549.1R: GCCGTAAGTGTCTCCTCCTC</i>	position 216305 to 216158	147	1.98
<i>XLOC_017268</i>	<i>XLOC_017268.1F: GAGGAGCACATCTTGGCCTT</i>	<i>XLOC_017268.1R: TTGTTTCTTGGCATGCTGGC</i>	position 81436 to 81563	127	1.92
<i>XLOC_032353</i>	<i>XLOC_032353.2F: GGCCTGGTCAGTAATTCCCA</i>	<i>XLOC_032353.2 R: GCTCTCCGGCATGAATACGA</i>	position 118041 to 118176	135	2.04
<i>XLOC_032365</i>	<i>XLOC_032365.1F: CCGGTCATGCTGTTTTGCA</i>	<i>XLOC_032365.1R: AGCATGAACTTGTCATACGA</i>	position 137121 to 136976	145	1.95
<i>XLOC_037874</i>	<i>XLOC_037874.1 F: GGGGCGAAGTGACCGATTAA</i>	<i>XLOC_037874.1 R: GTCGAGTCTTCATGGCGGAA</i>	position 444170 to 444021	149	1.83
<i>XLOC_019655</i>	<i>XLOC_019655.1F: ACCAGTCCATACGCTTACC</i>	<i>XLOC_019655.1R: TGTCTCAATGCGCGTAGT</i>	position 133596 to 133725	129	1.94
<i>XLOC_019464</i>	<i>XLOC_019464.1 F: TGGCGCGCTTACTTGTATGA</i>	<i>XLOC_019464.1R: ACGACCAGACCAGAACAAA</i>	position 515592 to 515740	148	1.99
<i>XLOC_034086</i>	<i>XLOC_034086.1 F: TGTCGTCTGGTATACGAGGTGCT</i>	<i>XLOC_034086.1R: CCCTCCACAAGAAGTAAGAGGGGCA</i>	position 86465 to 86573	108	2.05

c) PCR primers

<i>Scaffold</i>	<i>CGI number</i>	<i>Forward Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer Sequence (5'-3')</i>	<i>Position on the scaffold</i>
<i>Scaffold_1255</i>	<i>CGI_10018082</i>	<i>XLOC_005912.3for: TGATCATTGCCACCAGAGA</i>	<i>XLOC_005912.5rev: GCACCGCGCCATTTTCTCC</i>	position 364428 to 368519
<i>Scaffold_473</i>	<i>CGI_10010582</i>	<i>XLOC_032353.2for: GGCCTGGTCAGTAATTCCCA</i>	<i>XLOC_032353.1rev: ACACGTACCATGGTACTGACA</i>	position 118041 to 121200
<i>Scaffold_473</i>	<i>CGI_10010585</i>	<i>XLOC_032365.1for: CCGGTCATGCTGTTTTGCA</i>	<i>XLOC_032365.3rev: CAGTGCCTTCTGTGTAGGT</i>	position 128853 to 137121

d) Primers for sequencing

<i>Primer name</i>	<i>Sequence</i>
<i>XLOC_005912.1rev</i>	<i>GGCTTTGTTGCACGCTTCTT</i>
<i>M13-20</i>	<i>GTAAAACGACGGCCAGT</i>
<i>M13rev</i>	<i>CAGGAAACAGCTATGACC</i>

The tables S2 with the identified DMRs is available on <https://academic.oup.com/eep/article/3/1/dvx004/3740026#supplementary-data>.

III. Article 2 : Plasticité phénotypique adaptative transgénérationnelle de la résistance à l'infection de *Crassostrea gigas* lors d'une exposition microbienne précoce

***Publication* : “Transgenerational adaptative phenotypic plasticity in infection resistance of *Crassostrea gigas* upon early microbial exposure”**

FALLET Manon, PETTON Bruno, DE LORGERIL Julien, COMARMOND Sébastien, CHAPARRO Cristian, TOULZA Eve, BOITARD Simon, ESCOUBAS Jean-Michel, VERGNES Agnès, BULLA Ingo, GUEGUEN Yannick, MITTA Guillaume, VIDAL-DUPIOL Jérémie, GRUNAU Christoph, MONTAGNANI Caroline et COSSEAU Céline.

Le manuscrit présenté ici est une première version du futur article qui sera prochainement soumis pour publication.

Transgenerational adaptative phenotypic plasticity in infection resistance of *Crassostrea gigas* upon early microbial exposure

Manon Fallet¹, Bruno Petton², Julien de Lorgeril³, Sébastien Comarmond¹, Cristian Chaparro¹, Eve Toulza¹, Simon Boitard⁴, Jean-Michel Escoubas³, Agnès Vergnes³, Ingo Bulla¹, Yannick Gueguen², Guillaume Mitta¹, Jérémie Vidal-Dupiol³, Christoph Grunau¹, Caroline Montagnani³, Céline Cosseau¹

¹ IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Perpignan France

² IFREMER, UBO CNRS IRD, LEMAR UMR 6539, Argenton, France

³ IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Montpellier France

⁴ GenPhySe, Université de Toulouse, INRA, INPT, INP-ENVT, Castanet Tolosan, France

Abstract

The Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS) induces high mortality rates in *C. gigas* oysters' juveniles since 2008. OsHV-1 virus and opportunists' bacteria are involved in this multifactorial syndrome raising the question of the influence of oysters' microbiota in their survival. The life history of individuals influences their phenotype but potentially also the phenotype of their offspring. The environmental microbiota has an influence on the innate immune response in oysters. An exposure to environmental microorganisms, especially during the early development of oyster's larvae, may therefore shape the immune system of oyster durably, even in the next generations. In this study we exposed oysters' larvae to a microorganisms enriched water and evaluated the impact of this exposure on the juveniles' response to POMS. We found an improved survival in the exposed generation but also in the two subsequent generations and demonstrated here the key role of microbiota in transgenerational immune system priming in *C. gigas*. Transcriptomic response following the exposure and during the POMS induction indicates constitutive or inducible overexpression of genes linked to immune functions. We also characterised the genetic and epigenetic changes associated with this improved phenotype and investigated the mechanisms involved in the transgenerational transmission of this phenotype addressing for the first time the implication of epigenetic mechanisms in the transgenerational immune memory in invertebrates.

Our systemic approach allows for the first time to demonstrate transgenerational immune shaping in an invertebrate species and to shed light on its molecular bases.

32 Introduction

33 The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the main farmed oyster specie worldwide with an estimated
34 total production of 573 616 tons in 2016 (FAO, 2019). In Europe, France is the main producing country
35 with 97 000 tons of oysters produced in 2012. France oysters farming represents a vast sector of
36 activity with 2 800 farms and 16 300 people employed. Oysters, as marine and sessile organisms, are
37 very sensitive to environmental pressures (Rodrigues et al., 2015) and the production history of *C.*
38 *gigas* in France and worldwide has faced a number of diseases (Jeffries, 1982; Hada et al., 1984; Hine
39 et al., 1992). Since 2008, juveniles *C. gigas* oysters experience drastic episodes of mortalities due to
40 the "Pacific Oyster Mortality Syndrome" (POMS), a complex disease threatening oyster farming and
41 eliminating up to 100% of the spats (Segarra et al., 2010; Martenot et al., 2011; Barbosa Solomieu et
42 al., 2015). This syndrome is panzootic and impacts oyster farms worldwide (Roque et al., 2012;
43 Shimahara et al., 2012; Jenkins et al., 2013; Keeling et al., 2014; Bai et al., 2015; Prado-Alvarez et al.,
44 2016) and all the French coasts are concerned (Martenot et al., 2011; Renault et al., 2012). POMS is a
45 multifactorial disease, with biotic and abiotic factors influencing the disease outbreak at different
46 levels (King, Jenkins, et al., 2019) among which the microbial community is a key feature for
47 determining the issue of the oyster fitness (King, Siboni, et al., 2019). The central role of the herpes-
48 virus OsHV1- μ var in oysters' colonisation has been demonstrated, it induces an immune-compromised
49 state of the oyster which leads to dysbiosis and to subsequent bacteraemia caused by opportunistic
50 bacteria (de Lorgeril et al., 2018). Other studies have addressed the role of the oyster microbiome in
51 oyster health (Lokmer & Wegner, 2015; Clerissi et al., 2018). Destabilisation of the bacterial community
52 has been shown to facilitate the infection by *Vibrio* pathogens (Lokmer et al., 2016). This raises the
53 question of the role of this microbial community for the host homeostasis including protection from
54 potential pathogens and the regulation and development of the host immune system. The complex
55 interactions between microbes and host was extensively studied in model organisms. For instance the
56 gut microbiota in mice and humans is implied in various processes like metabolism, energy balance,
57 angiogenesis, modification of the nervous system and immunity via immune system development and
58 resistance to pathogens (Bäckhed et al., 2005; Laukens et al., 2015b). In the zebrafish, the acquisition
59 of commensal microbiota after hatching leads to the induction of genes of the inflammatory immune
60 response, such as interleukines and chemokines and leads also to the activation of antiviral
61 mediators (Galindo-villegas et al., 2012). The commensal microbiota is also involved in the priming of
62 phagocytes and allows a faster neutrophils recruitment to an injury site. The induction of inflammatory
63 genes and antiviral mediators expression has been linked to acetylation and methylation of histone
64 H3 at the promoters sites. All together, these results show an impact of the commensal microbiota
65 in various processes notably an influence on host immunity. Furthermore, some studies have started

66 to investigate the impact of the microbiota on epigenetic functions of its host in order to decipher the
 67 long term influence that the microorganisms might mediate on its host. These studies have
 68 highlighted that epigenetic mechanisms might influence the interplay between the microbiota and the
 69 host immune system and might be involved in long term memory effect that the initial microbiota
 70 mediates for host lifelong homeostasis (Pan et al., 2018; Miro-Blanch & Yanes, 2019). Indeed, there is
 71 growing evidence that life history of organisms can influence their phenotypes beyond the initial
 72 environmental clues (i.e. indirect indicators of selective environment (Chevin & Lande, 2015)), and that
 73 some of the mechanisms that are responsible for lasting environmental effects are of epigenetic
 74 nature. The trained immunity described for vertebrates is an example of long lasting environmental
 75 effect applied to immunity. It has been defined as an innate immune memory program induced by
 76 certain infections which results in a more active functional state of innate immune cells (Netea & Meer,
 77 2017). This training of the innate immunity requires epigenetic based events. The trained immunity
 78 has been described in invertebrates but is mentioned under the term “immune priming” or “innate
 79 immune memory”: it is defined as the capacity of an organism to induce an adequate immune response
 80 during a second encounter with a pathogen. Epigenetic based events have been barely reported to
 81 explain the immune memory in invertebrates, and to our knowledge only one paper has addressed
 82 this question in the *Artemia* shrimp (Norouzitallab et al., 2016a). Immune memory were observed in
 83 mollusc species (Portela et al., 2013; Pinaud et al., 2016), including the oyster *C. gigas* (Lafont, 2017).
 84 Despite the lack of memory lymphocytes, invertebrates seem to possess an immune memory and *C.*
 85 *gigas* is able to memorise a past experience and to adapt its immune response accordingly. Moreover,
 86 an action of immune priming on the next generation was also identified in *C. gigas*: when parents were
 87 treated with poly I:C their offspring had a better survival rate to OsHV-1 infection (Timothy J. Green et
 88 al., 2016; Lafont et al., 2017), suggesting the possibility to improve the immune response of oyster’s
 89 lineages through the germline.

90 We hypothesized that an exposure of oysters to environmental microflora during early environment
 91 would prime the oysters’ immune system and improve oysters’ survival to POMS. In the present study,
 92 we exposed the progeny of full-sib oysters to a naturally occurring microflora during the early
 93 developmental stages. We then studied the impact of this early exposure on the oysters’ immune
 94 response to POMS at juvenile stage with an experimentally realistic infection system that reproduced
 95 the natural route of infection. We succeed to improve oysters’ survival in three consecutive
 96 generations and concomitantly characterized the transcriptomic response and the genetic, epigenetic
 97 and microbiota influence on this phenotype.

98 **Material and methods**

99 **A- Oyster reproduction, zootechnics and production of the four oyster generations**

100 Oyster reproduction was conducted at the Ifremer facility (Argenton and Bouin) at bio-secured
 101 conditions by filtration and irradiation of sea water (Petton et al., 2019). For all oyster generations,
 102 before gametogenesis induction, animals were held for 8 weeks in 500 l flow-through tanks with
 103 seawater enriched with a phytoplankton mixture at a constant temperature of 17 °C (Petton et al.,
 104 2013; Bruto et al., 2017, Petton et al. 2019). The daily mixed diet consisted of *Tisochrysis lutea* (CCAP
 105 927/14; 40 µm³, 12 pg cell⁻¹) and *Chaetoceros muelleri* (CCAP 1010/3; 80 µm³, 25 pg cell⁻¹). Once
 106 the oysters were reproductively mature, gametes were obtained by stripping and mixed in a 5-l
 107 cylinder at a ratio of 10 spermatozooids per oocyte (day 0). The fertilized oocytes completed their
 108 embryonic development in 5-l tubes filled with 1-µm-filtered, UV-treated seawater at 21 °C for 48 h.
 109 The D-larvae (day 2) were then collected and reared in flow-through rearing systems at 25 °C. At the
 110 end of the pelagic phase (day 15), all the larvae were collected on a 100-µm sieve and allowed to settle
 111 on cultch. Post-larvae were maintained in downwelling systems until day 40, where they were
 112 continuously supplied with phytoplankton enriched seawater. Between day 25 and day 35, the sea
 113 water temperature was progressively reduced from 25 to 21°C. In the larval and post-larval stages, the
 114 oysters were fed with the same diet as the brood-stock at the same concentration. Juveniles were then
 115 transferred to Bouin Ifremer facility at day 40 (size of spats > 1.4 mm), where they remained until day
 116 100.

117 The F0 generation has been realised in March 2015, after a biparental reproduction with one male and
 118 one female of the same geographical origin for each family (Sup file 1, figure 1). Two families were
 119 chosen for this experiment: Family 11 (Fa. 11) and Family 32 (Fa. 32), whose genitors have been
 120 collected in “Dellec” (bay of Brest, Atlantic Ocean) and “Vidourle” (Mediterranean Sea) (Sup file 1,
 121 figure 1) respectively. For both families, genitors had been collected in non-farming area meaning that
 122 they have not passed a selection filter due to the infectious environment met in farming area. The
 123 families of this F0 generation were chosen according to their survival capacities during a POMS disease
 124 outbreak as previously reported in De Lorgeril et al., 2018. Fa.11 was chosen for its sensitivity to the
 125 disease (99.3% of cumulative mortality during Atlantic experimental infection). Fa. 32 was chosen for
 126 its intermediate sensitivity to the disease (56% of cumulative mortality during Atlantic experimental
 127 infection) (See De Lorgeril et al., 2018). On March 2016, adults from these two families were used to
 128 generate the F1 generation by multiparental reproductions. The number of genitors (approximately
 129 100) used for each reproduction and fertilisation success is shown in Sup file 1, table 1. Two hours after
 130 fertilisation, oyster embryos were separated into two conditions: a control condition in which oyster
 131 larvae were raised in filtered and UV-treated seawater, and an exposed condition in which oysters
 132 were exposed to environmental microorganisms right after fecundation and during ten days. After the
 133 exposure, both control and exposed oysters were raised in the same conditions (Sup. file 1, figure 1).

134 After 4 months of farming, a subset of the F1 oysters of each Fa. 11 and 32, control and exposed
 135 conditions were used for the experimental and field infections. Another subset of these F1 oysters was
 136 preserved from the disease process and was kept in standard raising condition until March 2017 to
 137 generate the next F2 generation. For this purpose, adults from the two families Fa.11 and F.32, from
 138 control and exposed conditions were used for multiparental reproductions (Sup. file 1, figure 1). The
 139 number of genitors (approximately 80) used for each reproduction and fertilisation success is in Sup.
 140 file 1, table 1. After fertilisation, the oysters were all raised in the same standard conditions during 4
 141 months until the disease was provoked. A subset of these F2 oysters of each Fa.11 and 32, control and
 142 exposed conditions were used for the experimental and field infection. Another subset of these F2
 143 oysters was preserved from the disease and kept to generate the F3 by multiparental reproductions
 144 (Sup. file 1, figure 1). For this purpose, adults from the two families Fa.11 and Fa.32, from control and
 145 exposed conditions were used for multiparental reproductions (Sup. file 1, figure 1). The number of
 146 genitors (approximately 80) used for each reproduction and fertilisation success is in Sup. file 1, table
 147 1. After fertilisation, the oysters were all raised in the same standard conditions during 4 months until
 148 the disease was again experimentally triggered.

149 **B- Exposure of the F1 oysters' larvae**

150 a- Experimental set-up

151 Only F1 generation larvae were exposed to microorganisms during their early development. 2 hours
 152 after fertilisation, the fertilised eggs of Fa.11 and Fa.32 of F1 oysters were exposed to seawater
 153 enriched in environmental microorganisms during 10 days (Sup. file 1, figure 1). To this end, pathogen-
 154 free donor oysters (NSI for "Naissains Standardisés IFREMER" or "standardized spats from Ifremer")
 155 were used. Donors were NSI produced in August 25th 2015 from three generations of oysters (2011,
 156 2012 and 2013) collected in Aix island (France, "Marennes-Oléron") (Petton et al., 2013, 2015, 2019).
 157 These donor oysters were placed on March 2nd 2016 in a farming area ("Logonna Daoulas", Atlantic
 158 Ocean (lat. 48.335263-long-4.317922) during a non-infectious period (water temperature < 16°C,
 159 absence of OsHV-1) (Le Roux et al., 2016) allowing them to catch the microbial environmental cue. The
 160 donors were then transferred back to the lab and placed in tanks upstream of the breeding pipes of
 161 the "exposed" F1 larvae. Seawater was flowing from the tank of the donor oysters to the recipient F1
 162 larvae to expose them to environmental seawater and transmit donor microbiota to recipient larvae
 163 via water flux (Sup. file 1, figure 2). This exposure lasted for 10 days, and donor oysters were replaced
 164 3 times during that period (batch 1 placed at day 0, batch 2 at day 3 and batch 3 at day 7). Each NSI-
 165 donor batch had a total biomass of 1000g containing individual oysters with a mean single weight of
 166 0.17g. In the control condition, larvae were raised in parallel in filtered and UV-treated seawater (Sup.

167 file 1, figure 2) (Petton et al., 2019). Following exposure, both groups (exposed and control) were raised
 168 in control conditions from day 10 to juvenile stage (day 120).

169 b- Seawater quality control

170 Seawater was collected upstream of the recipient's oysters' breeding pipes for both conditions (control
 171 and microorganisms enriched water) (See sup. file 1, fig. 3 and sup. file 1, table 2). 3L, 2L, 0.25L of
 172 seawater samples were filtered on 10 µm, 0.8 µm and 0.2 µm pore size filters (Whatman™,
 173 Nucleopore™ Track-Etch Polycarbonate Membrane, 47mm filters; ref. 111115- 10µm; ref. 111109-
 174 0.8µm; ref-111106-0.2µm). Filtrates were analysed by subsequent qPCR analysis targetting the Vibrio
 175 and total bacteria 16S genes. 100 µL of subsamples of seawater, were spread on thiosulfate-citrate-
 176 bile salts sucrose (TCBS) agar Petri dishes for Vibrio detection (no dilution) or on marine broth petri
 177 dishes for total bacteria detection (one in 10th dilution). Petri dishes were incubated at 21°C for 2 days
 178 and 6 days before counting the number of Vibrio and total bacteria colony forming units (CFUs)
 179 respectively.

180 c- Sampling of oysters

181 Three pools of F0 oocytes and spermatozoids from the F0 generation genitors were sampled for each
 182 family (Sup. file 1, table 2). For the sampling at day 2 and 10 after exposure, 10000 to 20000 larvae
 183 were sampled in triplicates per condition for each family, each condition and all generations (Sup file
 184 1, table 2). For other samples, 3 pools of 10 juveniles' oysters were sampled per condition (day 35 and
 185 day 58) (Sup. file 1, table 2). Right after collection, samples were frozen in liquid nitrogen and stored
 186 in -80°C until used for molecular analysis.

187 During the development of oysters, mortalities have been recorded and survival rates were calculated
 188 at day 2 (D larvae), day 27 (end of metamorphosis) and day 107 (juveniles) (Sup. file 1, table 3).

189 **A- Field and Ecologically realistic experimental infections**

190 For all the generations, at day 100, juveniles were brought back from Bouin Ifremer facility to Argenton
 191 in controlled environment to be acclimatised three weeks before disease induction. After
 192 approximately 4 months (See sup. file 1 table 4 for accurate date), the juvenile oysters from Fa.11 and
 193 Fa.32 each, exposed and control conditions, were subjected to an experimental infection (Sup file 1,
 194 fig. 3) as described in de Lorgeril et al. 2018 and Petton et al. 2019. For this purpose, each of the 4
 195 condition oysters were placed into independent tanks containing 340L of filtered and UV-treated sea
 196 water and donor oysters were placed in the same tanks. Previously, these donor oysters (the same NSI
 197 as previously used as donors of environmental microorganisms for the microbial exposure) were
 198 placed in the field in a farming area ("Logonna Daoulas", (lat 48.335263—long-4.317922) at mid-June

199 when the seawater temperature started to increase which coincides with the appearance of disease.
 200 They were transferred in the tanks as soon as the first mortality was registered in order for them to
 201 transmit the disease to the recipient oysters. The number of recipient and donor individuals used per
 202 condition is indicated in the sup file 1 table 4.

203 During each experimental infection, recipient oysters were sampled at 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after
 204 donor oysters were added to the tanks (Sup file 1, table 2 and 4) and cumulative mortality was
 205 monitored every 12 hours for up to 15 days for both donors and recipients, respectively. During the
 206 experimental infection, 10 oysters were arbitrarily sampled in triplicate without blinding protocols
 207 from each tank and at each time (0, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h) of the kinetics.

208 The shell was removed, and pools of 10 oysters were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.
 209 Oyster pools were ground in liquid nitrogen in 50-ml stainless steel bowls with 20-mm-diameter
 210 grinding balls (Retsch MM400 mill). The obtained powders (stored at -80 °C) were then used for
 211 extraction of RNA and DNA.

212 In parallel to experimental infection in the laboratory, oysters for both Fa.11 and Fa.32 and for each
 213 condition were placed in the field, in the natural environment (farming area in “Logonna Daoulas”, lat
 214 48.335263—long-4.317922) during the disease outbreak. As soon as the first mortality appeared in
 215 this area, the dynamic of mortality was daily monitored during three weeks and then every two weeks
 216 until the end of September when sea water temperature is below 16°C. The number of individuals used
 217 per condition is indicated in the sup file 1 table 4.

218 Survival curves were generated with R software (R Core Team, 2013) and mortality kinetics have been
 219 analysed with the non-parametric Kaplan-Meier test estimating log-rank values for comparing
 220 conditions using the R package “survival” (Therneau, 2015)).

221 **B- DNA and RNA extraction:**

222 Genomic DNA from powdered oyster tissues was extracted with the NucleoSpin Tissue kit from
 223 Macherey-Nagel kit (reference 740952.250) according to the manufacturer’s protocol with an
 224 additional step of RNaseA treatment (Macherey-Nagel, cat. #740505. Prior to 90 min of enzymatic lysis
 225 in the presence of proteinase K, an additional 12 min mechanical lysis (Retsch MM400 mill) was
 226 performed with zirconia/silica beads (BioSpec). DNA concentration and purity were checked with a
 227 Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific) and QuBit 2.0 Fluorometer Invitrogen (Life
 228 technologies Corporation, Carlsbad, California).

229 Total RNA was extracted from oyster pool powders (10 mg) or pools of frozen larvae. Samples were
 230 homogenized in 1500 µL of Tri-Reagent (Invitrogen). Prior to extraction, insoluble materials were
 231 removed by centrifugation at 12000xg for 10min at 4°C and supernatant was incubated with 0.2

232 volumes of chloroform at room temperature for 3min. After centrifugation at 12000xg for 15min at
233 4°C, total RNA recovered from the aqueous phase was extracted using the Direct-Zol™ RNA Miniprep
234 kit (Zymo Research; ref: R2052) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration and
235 purity were checked with Nanodrop ND-1000 spectrometer (Thermo Scientific) and their integrity was
236 analyzed by capillary electrophoresis with a BioAnalyzer 2100 (Agilent).

237 C- RT-qPCR analysis

238 Detection and quantification of OsHV-1, total 16S bacteria and total 16S *Vibrio* were performed using
239 quantitative PCR (qPCR). All amplification reactions were analyzed using a Roche LightCycler 480 Real-
240 Time thermocycler (qPHD-Montpellier GenomiX platform, Montpellier University, France). The total
241 qPCR reaction volume was 1.5 µl and consisted of 0.5 µl DNA (40 ng/µl) and 1 µl LightCycler 480 SYBR
242 Green I Master mix (Roche) containing 0.5 µM PCR primer (Eurogenetec SA). Virus-specific primer pairs
243 targeted a region of the OsHV-1 genome predicted to encode a DNA polymerase catalytic subunit
244 (ORF100, AY509253): Fw-ATTGATGATGTGGATAATCTGTG / Rev-GGTAAATACCATTGGTCTTGTCC)
245 (Davison et al. 2005). Total bacteria specific primer pairs were the 341F-CCTACGGGNGGCWGCAG and
246 805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC (Klindworth et al, 2013) and total *Vibrio* specific primer pairs were
247 Fw-GGCGTAAAGCGCATGCAGGT and Rev-GAAATTCTACCCCTCTACAG (Mansergh and Zehr 2014). A
248 Labcyte Acoustic Automated Liquid Handling Platform (ECHO) was used for pipetting into the 384 well-
249 plate (Roche). A LightCycler® 480 Instrument (Roche) was used for qPCR with the following program:
250 enzyme activation of 95°C for 1 min followed by 40 cycles of denaturation (95°C, 10 s), hybridization
251 (60°C, 20 s) and elongation (72°C, 25 s). A subsequent melting temperature curve analysis of the PCR
252 product was performed to verify the specificity of the amplification. Each reaction was performed in
253 triplicates. For quantification of OsHV-1 in oysters we used relative quantification calculated by the 2-
254 $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl 2001) using the mean of two reference genes (*Cg-bpi*, GenBank: AY165040 and
255 *Cg-actin*, GenBank: AF026063). For quantification of total bacteria and total *Vibrio* in sea water we
256 used relative quantification normalised by the volume of filtered sea water (3L, 2L or 0.25L), then
257 relative expressions in each fraction (10 µm, 0.8 µm and 0.2 µm pore size filters) were added together
258 to obtain the quantification in all water column.

259 D- Microbiota analysis

260 Samples used for microbiota analysis are indicated in the sup. file 1 table 2. For each time point, 3
261 biological replicates were performed. For each sample, 16S rDNA amplicon libraries were generated
262 using the 5' NGGNCCTATTGCTCATGGTGG and 3' TCTTTACCTGTATTAGCNGGNGC primers targeting the
263 variable V3V4 loops for bacterial communities (Klindworth et al., 2013). Paired-end sequencing with a

264 250-bp length was performed at Perpignan University (platform “bio-environnement”, Perpignan,
265 France) on a MiSeq system (Illumina) for the F2 generation.

266 The all bioinformatics pipeline for data treatment is represented in sup. file 1, figure 4. The FROGS
267 pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudié et al., 2017) implemented on a galaxy
268 instance [<https://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>] was used for data processing. Paired
269 reads were merged with an authorized mismatch of 0.1 using VSEARCH (Rognes et al., 2016), then
270 primers were removed with cutadapt (Martin, 2011) allowing a 10% differences in the primer search.
271 Merged sequences were then filtered and replicates were removed using FROGS Pre-process.
272 Sequences clustering was done using SWARM (Mahé et al., 2014) with denoising and aggregation
273 distance $d = 3$. Chimeras were removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016). After singletons filtering,
274 affiliation was performed using Blast+ against the Silva 132 16S database.

275 Community analysis was performed on R software (R Core Team, 2013) using the phyloseq package
276 (McMurdie & Holmes, 2013). Rarefaction curves of species richness were produced using the rarefy-
277 even-depth and ggrare functions (McMurdie & Holmes, 2013). One-way ANOVA or non-parametric
278 Kruskal-Wallis test (when the normality of residuals was rejected (Shapiro test)) were used to compare
279 alpha diversity indices between conditions. When the ANOVA or Kruskal-Wallis tests were significant,
280 we performed pairwise comparisons between group levels with the pairwise t-test or the Dunn test
281 (post-hoc analyses) using Bonferroni corrections for multiple testing. The significance threshold was
282 set at 0.05 for all analyses. Principal coordinate analyses (PCoA) were computed to represent
283 dissimilarities between samples using the Bray-Curtis distance matrix (beta diversity). Multivariate
284 homogeneity of group dispersions was tested using 999 permutations (adonis and betadisper from
285 vegan package (Oksanen et al., 2019)). When dispersions were significant, to identify the explanatory
286 factors, we made pairwise comparison (pairwise.adonis, Martinez Arbizu, 2019).

287 To compare amount of sequences for each genus between enriched and control water at day 2, we
288 used table of sum of sequences. For each water sample, we calculated sum of sequences mean of the
289 three filters size per genera. We then compared mean of sum of sequences between conditions for
290 each genera using DESeq2 (Love et al., 2014) (Galaxy Version 2.11.39) to identify significantly enriched
291 or depleted genera in enriched water compared to control water.

292 We also used table of some of sequences and DESeq2 to identify the genera that were significantly
293 enriched in exposed oysters compared to control ones at day 2. We finally used DESeq2 to identify the
294 genera that presented significantly differential amounts between conditions starting from the counts
295 per sample of OTUs representing at least 3% of the total sequence number. The Log2 Fold Changes
296 were then used to compute heatmaps with MeV. For that, 3% OTUs more frequent were kept by
297 samples and time of development. Unknown genus and multi-affiliations were discarded and relative
298 frequencies were computed for each sample. When an OTUs were among the 3% more present of a

299 sample but not in all, the value for other samples were added even if this OTU is not present at more
300 than 3% for these samples.

301 **E- Transcriptome analysis (RNA-seq):**

302 Samples used for RNA-Seq analysis are indicated in the sup file 1 table 2. For each time point, 3
303 biological replicates were performed. RNA-Seq library construction and sequencing were performed in
304 McGill University (Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada) NEB mRNA stranded
305 libraries were constructed and sequenced on a HiSeq4000 (illumina), in paired-end reads of 2 x100 bp.
306 Complete bioinformatics pipeline is schematically represented in sup. file 1, Figure 5. All data
307 treatments were carried out under a local galaxy instance (<http://bioinfo.univ-perp.fr>) (Goecks J, et al.
308 2010). Quality of the metrics are indicated in the sup. file 1 table 5. Quality of reads were controlled
309 using FastQ Read Quality reports (Galaxy Version 0.70). Phred scores were higher than 26 for more
310 than 90% of the reads length for all the sequences. All the reads were thus kept for subsequent
311 analyses. Reads were mapped on *C. gigas* genome (assembly version V9, Zhang et al, 2012) using
312 RNAstar (Dobin et al., 2013, Galaxy Version 2.4.0d-2) with the following parameters: paired-end reads,
313 minimum intron size of 21, maximum intron size of 40 000, a maximum gap between two mates of 0,
314 a minimum overhang for spliced alignments of 5, a minimum overhang for annotated spliced
315 alignments of 5, Minimum overhang for annotated spliced alignments = 3, Minimum mapped length
316 for a read mate that is spliced = 0, Minimum mapped length for a read mate that is spliced, normalized
317 to mate length = 0.66, Maximum number of windows per read = 10 000, Maximum number of
318 transcripts per window = 100 and Maximum number of different alignments per read to consider =
319 10 000. HTSeq-count was used to count the number of reads overlapping annotated genes (mode
320 Union) (Galaxy Version v0.6.1) (Anders et al., 2014). Differential genes expression levels were obtained
321 using DESeq2 (Love et al., 2014) (Galaxy Version 2.11.39). Functional annotation and enrichment
322 analysis was performed with RGOA using an adaptive clustering and a rank-based statistical test
323 (Mann-Whitney U-test combined to the adaptive clustering (Nielsen et al. 2005, Kosiol et al. 2008 and
324 Voolstra et al. 2011). $\log(pval)$ and $-\log(pval)$ (obtained from the deseq2 analysis) were used as input
325 for each repressed or induced genes respectively in exposed compared to control condition. The R and
326 Perl scripts used were published in Wright et al. (2015) and can be downloaded at
327 https://github.com/z0on/GO_MWU. The following parameters were used for the adaptive clustering:
328 largest=0.5; smallest=10; clusterCutHeight=0.25. Statistically significant enriched biological processes
329 were reported among larger biological functions. Biological processes were clustered inside each
330 biological function using Multiple Experiment Viewer (MeV) according to the Pearson correlation
331 (Saeed et al. 2003). For each biological process we calculated the ratio of the number of genes
332 differentially expressed and the total number of genes contained in the concerned biological process.

333 The genes of interest behind the biological process related to immunity were extracted (Immune
334 effector process, response to bacterium, response to virus, defense response, defense response to
335 othe organisms, opsonization, cellular response to interleukin-4, Regulation of defense response,
336 Immune system process, Viral transcription, Inflammatory response, STAT cascade, Innate immune
337 response, positive regulation of response to stimulus, Somatic diversification of immune receptor,
338 positive regulation of immune system process) and compiled in a table with their log2 fold change
339 when it was statistically significant.

340 **F- Genetic analysis**

341 gDNA shotgun library construction and Hi-seq sequencing (Illumina, paired-end reads of 150 bp) were
342 done by Genome Quebec (<http://www.genomequebec.com>). Bioinformatics pipeline for genetic
343 analysis is represented on sup. file 1, figure 6. A pool of 30 oysters were used to generate the genetic
344 data. Quality of the metrics are indicated in the sup. file 1 table 6. Data treatments were carried out
345 under a local galaxy instance (Goecks et al., 2010). Reads quality was checked with FastQC with
346 standard parameters (Galaxy Version 0.72, Andrews, 2014). Adapters were removed using TrimGalore,
347 paired-end library, automatic detection of adapter sequences, false Trims 1 bp off every read from its
348 3' end, other parameters using as default (Galaxy Version 0.4.3.1,
349 <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). Mapping to the *C. gigas* reference genome (assembly
350 version V9, Zhang et al., 2012) was performed using Bowtie 2 with the following parameters : paired-
351 end library, no tweak input options, no tweak alignment options, no tweak scoring options, no use of
352 -a or -k options, no tweak effort options, no tweak SAM/BAM options, no tweak other options, filter
353 unique reads = True (Galaxy Version 0.4, Langmead et al., 2009; Langmead & Salzberg, 2012). BAM
354 files were coordinate sorted with SAMTools. RmDup of SAMtools (paired-end data, treat as single-end
355 = false) was used in order to remove PCR duplicates (Galaxy Version 2.0.1, Li et al., 2009). MPileup was
356 used to generate VCF files necessary for the following analysis and containing key information for each
357 genomic position. The following parameters were used: do not perform genotype likelihood
358 computation, output base positions on reads = false, output mapping quality = false, filter by flags to
359 exclude or require, exclude = the read is a PCR or optical duplicate, do not limit select regions to call,
360 do not exclude select read groups, do not disable read-pairs overlap detection, skip anomalous read
361 pairs in variant calling, disable probabilistic realignment for the computation of base alignment quality,
362 coefficient for downgrading mapping quality for reads containing excessive mismatches = 0, max reads
363 per BAM = 250, do not redo BAQ computation, minimum mapping quality for an alignment to be used
364 = 20, minimum base quality for a base to be considered = 13, only generate pileup in region = empty
365 (Galaxy Version 2.1.4, Li, 2011). Within each sample, allelic frequencies were estimated using Pool-
366 HMM (Boitard et al., 2013) for all genomic positions that were covered by at least five reads (option-

367 c). One prerequisite for this estimation step is to compute the genome-wide allele frequency spectrum;
368 for this task the proportion of genomic positions used was set to 0.001 (option `-R`) according to the
369 author's recommendations, and the starting value for the population mutation rate (option `-t`) was
370 the default value 0.005. Allele frequency files obtained for each sample were then merged using the
371 python script `estim2freq.py`, available from the pool-hmm webpage ([https://forge-](https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/pool-hmm)
372 [dga.jouy.inra.fr/projects/pool-hmm](https://forge-dga.jouy.inra.fr/projects/pool-hmm)). Only polymorphic positions with a minor allele frequency
373 (computed over all samples) greater than 5% were kept at this step. Principal Component Analyses
374 (PCA) were generated with R software (R Core Team, 2013) from the allele frequency matrix using R
375 packages “`dplyr`” (Hadley Wickham et al., 2017), “`tidyr`” (Wickham & Henry, 2017), “`ggplot2`”
376 (Wickham, 2016), “`RcolorBrewer`” (Neuwirth & Brewer, 2014) and “`mixOmics`” (Rohart et al., 2017; Le
377 Cao et al., 2018). Evidence for adaptive selection at each SNP was tested using the FLK statistic
378 (Bonhomme et al., 2010), using a modification of the hapFLK software (Fariello et al., 2013) developed
379 by Vignal et al (2019) allowing to input allele frequencies instead of individual genotypes. The FLK
380 statistic was computed within each family, based on the comparison of allele frequencies in two
381 different subsets of samples: FO, F1 exposed line and F1 control line, in order to test adaptation from
382 FO to F1 and F0, F1-3 (F1, F2 and F3) exposed line and F1-3 control line in order to test adaptation also
383 in the two next generations. Distributions of FLK p-values were plotted with R. Significant SNPs were
384 called at a False Discovery Rate (FDR) of 5% following the approach of Storey & Tibshirani (2003)
385 implemented in the `qvalue` R package.

386 G- DNA methylation analysis

387 The Genome Quebec sequencing platform performed bisulfite conversion and BS-seq paired-end
388 library construction and. Sequencing was performed on a HiSeqX using 150 nucleotide paired-end
389 reads. (<http://www.genomequebec.com>). The bioinformatics pipeline for BS-seq analysis is
390 represented on sup. file 1, figure 7. and was performed on the local Galaxy platform (Afgan et al., 2016)
391 (<http://bioinfo.univ-perp.fr>). Quality of the metrics are indicated in the sup. file 1 table 7. Reads quality
392 was checked using FastQC. Nucleotide positions with a quality score below 20 were trimmed using
393 Trimgalore (paired-end, both strands, phred quality score = 20). Reads were then aligned on the *C.*
394 *gigas* reference genome (assembly version V9, Zhang et al., 2012) with Bismark (Krueger & Andrews,
395 2011) using the following parameters: maximum insert size = 500, no mismatch allowed, sort Bam file
396 by chromosomal position, other parameters used as default). Clustering of the data was performed
397 with from BAM files using MethylKit (Akalin et al., 2012). Using MethylExtract and the BAM files from
398 Bismark, the methylation level of each cytosines was synthesised in different file formats (Bed, Wig
399 and VCF). The Wig files were loaded on Integrative Genomics Viewer (IGV) for visual inspection of the
400 data (Thorvaldsdóttir et al., 2013). Differential methylation analyses were performed with DMRseq

401 package (Korthauer et al., 2018). The DMRsim package was used to simulate differential methylation
402 analysis on 180 DMRs artificially generated out of a dataset containing 700000 methylated CpG using
403 a cut-off value of 0.01. Following parameters were adjusted to optimise the number of true positive
404 detection: blocksize, minNumRegion, deltamax, bpspan, minInSpan, maxGapSmooth, smooth.
405 Subsequent DMRseq analyses were performed using the following parameters: block = FALSE,
406 minNumRegion = 5, deltamax = 0.25, bpspan = 1000, minInSpan = 10, maxGapSmooth = 2500, smooth
407 = TRUE). Differentially methylated regions were intersecting with the annotation of *C. gigas* version 9
408 (Zhang et al., 2012) to identify each DMRs position (intragenic, intergenic, promoter, exon, intron). The
409 +2kb region upstream of the transcription start site was defined as the promoter position.
410 The mean level of methylation per gene was calculated taking into account all the methylated CpG
411 within the concerned gene. Then, all the 28 027 genes from the V9 reference annotation were ordered
412 by level of methylation, and classified in twenty level of 1 401 genes, the level 1 being the less
413 methylated to level 20 being the most methylated. This classification was performed for all the
414 conditions.

415 Results

416 A- The exposure of oyster larvae with microorganisms enriched seawater leads to 417 changes on oyster microbiota on two successive generations

418 Offspring (F1) of genitor oysters (F0) of Fa.11 and Fa.32 chosen for their sensitive and intermediate
419 survival phenotype regarding the POMS disease (Delorgeril et al. 2018) were chosen for the
420 subsequent experiments (Sup. file 1, fig. 1). A part of oysters was exposed to microorganisms' enriched
421 seawater during ten days, starting the exposure two hours after the fertilization (Sup. file 1, fig. 1 and
422 2). The exposure was performed during larval stages since early development is known to be a sensitive
423 window during which environmental cues (notably via epigenetic mechanisms (Nagy & Turecki, 2012))
424 have stronger effect on phenotype set-up (Fawcett & Frankenhuis, 2015). The bacterial composition
425 and load of the seawater in flux upstream of the control and exposed conditions were checked by 16S
426 barcoding analysis and qPCR, targeting 16S and *Vibrio* 16S as known oyster pathogens at day 2 post-
427 fertilization. As expected, the microorganism enriched seawater from the exposed condition was more
428 diverse based on Chao1 (ANOVA, $p < 0,05$) and Shannon (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) indices and contained
429 more vibrio and total bacteria than control seawater (unpaired t-test with Welch's correction, $p = 0.001$
430 for total bacteria and $p = 0.0008$ for vibrio 16S) (Figure 1). This was confirmed by bacterial plating
431 analysis performed on seawater sampled in each tank containing the recipient oysters. The seawater
432 sampled in the tanks from the exposed oysters show indeed a significant higher amount
433 (approximately 4 time higher in microorganisms enriched water, Wilcoxon test: $p < 0,05$) of cultivable

434 bacteria than the control seawater (Sup. file 1, fig. 8). The microflora composition of the oysters was
435 analyzed by barcoding analysis performed on the V3V4 loop of the 16S rRNA gene on the control and
436 exposed oysters (F1 generation) (Sup. file 1 table 2). Differences in the proportion of genera were
437 analyzed between exposed and control oysters on day 2 on both Fa.11 and Fa.32, as well as between
438 enriched and control seawater. A total of 56.14% for Fa. 11 and 49.12% for Fa.32 of the genera which
439 have a higher proportion in the exposed condition are also more prevalent in the microorganisms-
440 enriched seawater (Sup. file 1, table 8) clearly showing that the seawater bacterial community
441 colonizes the oyster larvae. Despite this bacterial colonization, no differences in the survival rates were
442 observed between control and exposed oysters at day 2, 27 and 107 of the F1 generation (Sup. file 1,
443 table 3). The fertilization rate from the subsequent generation (F2 and F3) and their survival were not
444 affected by parental and grand-parental exposure to environmental microorganisms respectively as
445 well (Sup file 1, table 3).

446 In general, for both families, both conditions and both generations, relative bacterial composition (Sup.
447 file 1, figures 9 and 10) was dominated by a few phylum during all the oysters' development with a
448 high proportion of *Proteobacteria* at each developmental times except at month 4 in the F2 generation
449 which is dominated by cyanobacteria (Sup. file 1, figure 10). Other dominant phyla were *Bacteroidetes*,
450 *Tenericutes* and *Cyanobacteria*. From day 2 to day 10 *Bacteroidetes* was the second most abundant
451 phylum, replaced by *Tenericutes* at day 58 in the F1 generation for both families (Sup. file 1, fig. 9).

452 Diversity analysis further revealed that the species richness was higher in the exposed oysters
453 compared to the control ones, during the exposure (day 2 and day 10 samples) for both families based
454 on Chao1 index (Fig. 2, and sup. file 1 fig. 11). After the exposure, control and exposed oysters
455 displayed the same richness. This richness analysis performed on the same time point samples but
456 from the F2 generation (offspring of exposed/control oysters) further show that the microbiota of the
457 Fa.11 larvae at this generation displayed a higher richness at day 10 and 58 for the Fa.11 and at day 2
458 for Fa.32. (Fig. 2). The other indexes (Shannon and Simpson) were consistent with these results (Sup.
459 file 1, fig. 11). Dissimilarity analysis, based on Bray Curtis index, further showed that F1 samples
460 clustered first by condition (control or exposed) then by family for each developmental time point,
461 clearly indicating that the microorganism exposure profoundly modified the oysters' microflora
462 bacterial composition during the development (Sup. file 1, Fig. 12a). Differential analysis in the
463 proportion of bacteria in exposed *versus* control oysters was performed all along the development of
464 F1 (Sup. file 1, figure 13) and further revealed that the bacteria responsible for the composition
465 difference differed according to the developmental stage. The bacterial composition of the F2
466 generation was different between progenies from control or exposed parents only at day 58 for the
467 Fa. 11 (Sup. file 1, fig. 12b). Moreover, these dissimilarity analyses revealed a strong developmental

468 effect since samples mainly clustered by developmental stages for both generations (Sup. file 1, fig.
469 14a and 14b).

470 Taken together, these bacterial community composition studies revealed that the exposure of oyster
471 larvae to microorganisms enriched seawater strongly modifies the oyster microbial community. The
472 oysters were initially colonized by microorganisms which are present in the seawater. The richness was
473 only higher during exposure whereas the composition of the microbiota in exposed oysters remained
474 different than control oysters all along the development until the juvenile stage. This modification in
475 the bacterial diversity and composition is also observed, to a lesser extent, on the F2 generation in
476 both families although this generation was not subjected to the treatment with the microorganism-
477 enriched seawater. For both generations, a stronger developmental effect on bacterial composition
478 was observed compared to the effect due to the microorganism exposure.

479 **B- Microorganisms' larval exposure affects oyster transcriptomic response in the F1** 480 **generation**

481 Transcriptomic analysis was performed on oysters' developmental stages for Fa. 11 and Fa.32 at day
482 2, 10, 35 and month 4 in F1 and during disease induction in F2 (hour 0 = month 4, hour 3, 6, 12 and 24
483 post-infection) (Sup. file 1, table 2). Comparisons were performed between exposed and control
484 oysters at each time point for both families and significantly differentially expressed genes between
485 microorganisms exposed oysters compared to control ones were identified (Sup. file 1, table 9).
486 Functional annotation and enrichment analysis was used to identify key functions which were over- or
487 under-represented in the exposed versus control oysters (Figure 3). Key biological processes involved
488 in general cellular process, metabolism, immune response, DNA replication and recombination,
489 transcription and gene expression, DNA repair, development, cell fate, RNA process, translation and
490 protein processing, signal transduction and transport were strongly modified during the development
491 in the exposed oysters. There were strong variations between developmental stages since each
492 developmental time displayed different patterns of enrichment. Fa.11 and Fa.32 strongly differed in
493 their response to the microorganisms' exposure, especially we noticed that biological process linked
494 to RNA process, transport, cell fate and transcription and gene expression display an opposite profile
495 (Fig. 3). Finally, we focused on functions implied in response to environmental stimulus and immune
496 response. Fa.32 showed an overexpression of genes implied in response to external stimulus, response
497 to stress and regulation of response together with an overexpression of response to bacterium,
498 response to other organism and regulation of defense response stress during exposure. We further
499 noticed that viral transcription was overexpressed at day 2 and STAT cascade underexpressed. Both

500 families showed an overexpression of response to virus and defense response (Fig. 3) whereas
501 response to bacterium is overrepresented in the Fa.32 and unrepresented in Fa.11.

502 C- Oyster response during POMS induction

503 a- The exposure induces a better survival dynamic in exposed oysters and their offspring

504 After the larval exposure (day 0 to 10), all the oysters (control and exposed) were raised in control
505 condition until they reached the juveniles stage (month 4). At this time, all oysters were exposed to
506 the POMS disease (Sup. file 1 fig. 1 and 3). The number of surviving oysters was recorded during an
507 ecologically realistic experimental infection to follow the evolution of the disease while monitoring the
508 OSHV-1 replication in the oyster tissues. The increase in virus quantity during the first 48 hours
509 confirmed that the experimental infection process had started but viral replication was clearly less
510 intense in the exposed oysters compared to the control ones (Pval of two way anova with Bonferroni's
511 multiple comparisons test: F1 Fa.11, $p < 0.05$ and Fa.32, $p < 0.01$), and consistently with these results,
512 we observed statistical differences in the dynamic of infection (Log-rank test, $p < 0.05$) and final survival
513 rates (400 hours after disease induction) which were higher in F1 exposed oysters compared to F1
514 control ones in both families (Fa.11 laboratory: 31.7% of survival in exposed *versus* 15.3% in control
515 oysters, $p < 0.05$; Fa.32 laboratory: 66.3% vs. 57.4%, $p < 0.05$) (Figure 4). These results were confirmed
516 by the monitoring of the survival oysters in the field during an infectious period which showed a better
517 survival rate in both families (Fa.11 field: 12.3% of survival in exposed *versus* 9.1% in control oysters,
518 $p < 0.05$; Fa.32 field: 16.4% vs. 14%, $p < 0.05$) (fig 4). In the F2 generation, offspring from exposed
519 oysters revealed a better survival dynamic (Log-rank test, $p < 0.05$) than offspring of control ones for
520 both families (Figure 4), during the experimental infection (Fa.11: 5.9% of survival in exposed versus
521 4.3% in control oysters, Fa.32: 24.6% vs. 5.6%). Consistently with these results, virus replication was
522 less intense in the offspring of exposed oysters (Pval of two way anova with Bonferroni's multiple
523 comparisons test: F2 Fa.11, $p < 0.05$ and Fa.32 $p < 0.05$). The experimental disease infection was
524 replicated on this F2 generation (Sup. file fig. 15) and confirmed the results. In the field, only offspring
525 of exposed Fa.32 displayed a better surviving capacity compared to control ones (Figure 4).

526 A third survival assay was realized on the F3 generation, on the offspring of exposed grand-parents. A
527 better survival rate was observed for Fa.11 (Log-rank test, $p < 0.05$, final survival rates: 13.6% in
528 exposed condition vs. 4.7% in control) during experimental infection but no differences to control were
529 observed in the field. However, an improved survival rate was observed in the field for Fa.32 (Log-rank
530 test, $p < 0.001$, final survival rates: 9.77% in exposed condition vs. 3.04% in control) but not during the
531 experimental infection. 32 (Sup. file, figure 16).

532

533 b- A transcriptomic shift occurs in offspring of exposed oysters during disease induction.
 534 Transcriptomic analysis was performed on oyster tissues sampled during the experimental disease
 535 induction for both Fa.11 and Fa.32 of the F2 generation to focus our analysis on multigenerational
 536 effect (Sup. File 1, table 2). Differentially expressed genes between the two conditions were identified
 537 (Sup. file 1, table 9) and classified into biological process. This functional annotation allowed us to
 538 identify key processes which were over or underrepresented in offspring of microorganisms exposed
 539 oysters *versus* offspring of control oysters during the disease process (Figure 5). The two families
 540 displayed contrasting phenotypes regarding the functions linked to metabolism which were
 541 underrepresented in Fa.32 while it was overrepresented in Fa.11 (Figure 5). The functions related to
 542 immunity are overrepresented in the exposed oysters for both families (Figure 5) which confirmed the
 543 better survival capacity observed during the disease process. This improved immune response was
 544 “frontloaded” (i.e. constitutively expressed without change in environment) in the Fa.11 since it
 545 occurred at the hours 0, just before the disease was induced while it seemed to be inducible in the
 546 Fa.32 since most functions are over-represented 3 hours after the disease was induced. Response to
 547 bacterium is a function which is repressed in stimulated oysters in the Fa.32 while it is not affected in
 548 the Fa.11.

549 Taken together, these results showed that microorganism’s early exposure on F1 generation has
 550 resulted in an improved survival capacity of oysters when they have faced POMS, on the exposed
 551 generation and on the offspring of the exposed generation. The F3 generation also displayed an
 552 improved capacity to face the disease although this improvement was observed to a lesser extent
 553 indicating that the improved phenotype is slowly vanishing. We have identified key biological functions
 554 which are affected in the F2 generation by the microorganisms’ exposure of the genitors. Of particular
 555 interest, key process related to immunity are enhanced during the disease process in the offspring of
 556 oysters which have been stimulated by microorganism exposure, clearly explaining their enhanced
 557 capacity to face the disease.

558 **D- Deciphering molecular mechanisms behind improved survival**

559 After having had firmly established that ecological and molecular phenotypes converge towards an
 560 appropriately trained immune response to POMS through up to three generations we wondered what
 561 would be the molecular bases of this memory effect. Heritable phenotypic changes can be based on
 562 modifications in the genome and/or epigenome. To investigate changes in allele frequency, indicative
 563 for a genetic basis, genome-wide SNP allele frequencies were evaluated in each family for all
 564 generations (F0-F3) of the two conditions (exposed vs control) using pooled sequencing (Sup file 1,
 565 table 2). PCA of these data revealed contrasted patterns of genetic diversity in the two families. In

566 Fa.11 the exposed and control lines showed little genetic differentiation at generation 1 (F1) but
567 significant differentiation from generation 2 (Figure 6). In Fa.32 there was little genetic differentiation
568 between the two lines whatever the generation, so that samples did not cluster by condition on the
569 PCA (Figure 6). This contrast between families arose despite the fact that they have similar
570 heterozygosity at generation F0 (0.470 in Fa.11 vs 0.474 in Fa.32).

571 In order to test whether the better survival observed in the exposed line had a genetic component, we
572 tested evidence for positive selection at each SNP using the FLK statistic. This statistic considers
573 genome wide allele frequency data in a set of populations and aims at detecting positions where
574 genetic differentiation between these populations is higher than expected under neutral evolution. It
575 returns for each SNP a p-value allowing to reject or accept neutrality. Despite their difference of
576 genetic structure, the two families showed consistent results with this test. When focusing on
577 generation F0 and the generation F1 of the two conditions there was no evidence of positive selection
578 (Sup file 1, figure 17), even if a few SNP are detected (Table 10). This is consistent with the fact that
579 exposure to the infection did not affect the survival of larvae (Sup file 1, table 3), from which we can
580 assume that it did not lead to select oysters' phenotypes based on their genetic background. However,
581 we observed an excess of intermediate to high p-values (Sup file 1, figure 17), that is an excess of SNPs
582 with lower than expected differentiation between conditions. This excess likely resulted from the fact
583 that oysters at F0 were full sibs, an experimental design that exacerbates the incidence of deleterious
584 recessive alleles. Indeed, negative selection acting on deleterious alleles tends to decrease genetic
585 differentiation between populations. This effect was much reduced when applying FLK based on all
586 generations (F0 to F3) of the two lines (Figure 18), consistent with the fact that deleterious alleles are
587 continuously purged along generations. On the other hand, a clear excess of low p-values was found
588 in this second analysis (Figure 18 et table 10), implying that genetic adaptation occurred from
589 generation 2, although it was not the case at generation 1. One possible explanation for this
590 phenomena would be an adaptation to the epigenetic changes induced by the exposure at generation
591 1, i.e. environmental cues would first modify the epigenome (or select advantageous epigenetic based
592 phenotypes) and in the next generation proximal epigenotype/genotype interactions purge those
593 genotypes that cannot cope with the new epigenotype.

594

595 BS-Seq analysis was performed on oyster tissues sampled at day 10 and month 4 of the F1 exposed
596 generation and the F2 subsequent one for both Fa.11 and Fa.32 (Sup. File 1, table 2). *C. gigas* was
597 found mainly methylated in the CpG context and a mosaic type cytosine methylation pattern was
598 found as previously described (Sup file 1, fig. 19). 1.76% and 1.58% of cytosine were found methylated
599 compared to all cytosine in larval and juvenile stages respectively (Sup. file 1, fig. 20). This difference
600 in the methylation rate is statistically different for both generation and both family and show that a

601 global decrease in the cytosine methylation level occurs from larval to juvenile stages. The
602 microorganism exposure of the F1 generation does not affect the level of cytosine methylation at the
603 genome wide scale, since exposed and control oysters always display the same % of methylated
604 cytosine within a developmental stage (Sup file 1, fig. 20). The clustering of the cytosine methylation
605 data occurs according to family first and then according to developmental stages but not according to
606 the treatment (exposed or control) (Sup. file 1, fig. 21). indicating no global methylation differences
607 between conditions. Differentially methylated regions were detected using the DMR-Seq software
608 (Korthauer et al., 2018). The parameters of this software were optimized using the DMRsim package
609 in order to optimize the detection of true positive on our dataset (Sup file 1, table 11). The best
610 parameters (blocksize= TRUE, minnumregion=5, deltamax=0.25, bpspan=1000, mininspan=10,
611 maxgapssmooth=2500, smooth=TRUE) allows for detection of 50% of true positives with 0% of false
612 positives for a $pval < 0.05$ in our dataset. Based on these parameters, the differential methylation
613 analysis applied to all our samples led to the detection of 4325, 4985, 5531 and 5207 DMRs for Day 10,
614 Month 4 of the F1 and F2 generation respectively of Fa.11 and of 3407, 4131, 4049 and 6781 DMRs for
615 Day 10, Month 4 of the F1 and F2 generation respectively of Fa.32 (Sup file 1, fig. 22 and sup. file 1
616 table 12). A slight hypermethylation is observed at Day 10 of the F1 generation for both families
617 whereas an hypomethylation is observed at month 4 of F1 generation and Day 10 of the F2 generation
618 for both families (Sup. file 1, fig. 22 and sup. file 1 table 12). Roughly 40 to 50% of DMRs are intragenic,
619 20 to 30% are found within exons, 40% are found in introns and 10 to 15% are found in promoter
620 sequences (Supplementary file 1, figure 22). For all these genome features, the hyper and
621 hypomethylated DMRs follow the same patterns found at the genome wide level (Supplementary file
622 1, figure 22). All the 28 027 genes from the V9 reference annotation were sorted by level of gene body
623 methylation (mean methylation per gene), and classified into twenty levels of methylation, each level
624 containing 1 402 genes, except for the last level which contains 1 389 genes since 28 027 is not a
625 multiple of 20. The twenty package of 1 402 genes (ventils) were ordered by level of methylation and
626 clearly show two classes of genes, the LMG “Low Methylated Genes” which include half of the genes
627 with a median methylation level comprised between 0 and 18, and the HMG (High methylated genes)
628 comprising roughly the other half of the genes whose median methylation level is comprised between
629 30 and 812 for the dataset obtained for Fa.11 Month 4 of the F2 generation, control condition (Sup.
630 file 1, fig. 19). This pattern was reproduced for all the conditions (data not shown). Boxplot of mean
631 expression level for all the genes within each of the twenty categories was plotted according to
632 increasing methylation level (Sup. file 1, fig 23) and clearly shows that LMG were associated with low
633 expression and HMG were associated with high expression. The bell shape curve further highlighted a
634 maximum of median expression of 78.84 for control and 44.51 for exposed for the LMG and an
635 optimum of expression of 401.14 for control and 415.14 for exposed for the HMG for the dataset

636 obtained at month 4 of generation F2 of Fa.11. This pattern was reproduced for all the conditions (data
637 not shown). The DMRs were intersected with differentially expressed genes on the dataset of the Fa.32
638 day 10 of generation F2. Among 6 029 differentially expressed (DE) genes (Exposed vs. control), 540
639 and 200 display intragenic hypomethylation and hypermethylation respectively (Exposed vs. control).
640 Among the 540 DE hypomethylated genes, 46% and 54% are induced and repressed genes respectively.
641 Among the 200 DE hypermethylated genes, 44% and 56% are induced and repressed genes
642 respectively. These percentages represent roughly the same % obtained on all the dataset, since
643 among the 6 029 DE genes, 47% are induced and 53% are repressed (Fig. 7). These results clearly show
644 that there is no bias toward an effect of intragenic methylation to induce or repress gene expression.
645 This absence of clear effect of differential methylation to induce or repress gene expression was
646 further obtained on other genome feature: exonic, intronic and promoter differential methylation
647 (data not shown).

648 Discussion

649 **A- Influence of the microorganisms enriched seawater exposure on the oysters'** 650 **phenotype**

651 A growing body of evidence shows that environmental pressure can be responsible for heritable
652 phenotypic outcomes and changes in life history trait of living species (Yin et al., 2019). Several studies
653 have revealed that the experience of an environment by ancestors will confer an advantage to
654 offspring in this environment (Galloway, 2004; Galloway & Etterson, 2007; Boyko et al., 2010; Holeski
655 et al., 2012; Plautz et al., 2013; Shama et al., 2014; Munday, 2014; Parker et al., 2015; Beaty et al.,
656 2016; Ross et al., 2016a; Calosi et al., 2016; Norouzitallab et al., 2016; Roth et al., 2018; Donelson et
657 al., 2018; Tariel et al., 2019; Yin et al., 2019) and growing evidences suggest that intergenerational
658 effects play a major role in natural ecosystems (Head, 2014; Vandegehuchte & Janssen, 2014).
659 Substantial efforts have been devoted to the context of marine biology and have investigated
660 intergenerational impacts of the climate change (ocean acidification and temperature increase) (Calosi
661 et al., 2016; Foo & Byrne, 2016) and chemical pollution on several marine species (Schwindt, 2015;
662 Rondon et al., 2017b), including mollusks (Fallet et al. In press). Diverse examples illustrate how
663 parental exposure could benefit to the offspring which exhibit traits with increased fitness in the
664 environmental conditions experienced by their parents (Ross et al., 2016; Yin et al., 2019; Fallet et al.
665 In press).

666

667 **B- The interplay between the microbiota and the immune system is responsible for the**
668 **oysters' survival improvement**

669 In the present study, we investigated the effect of an exposure of microorganisms' rich environment
670 during *C. gigas* larval stages on a microbial disease phenotype encountered later during *C. gigas* life,
671 at juveniles stages. The phenotypic outcomes of the microbial exposure have been studied on the
672 exposed oysters and also on the two subsequent generations in order to address the question of intra
673 and intergenerational plasticity. The developmental stage during which parents experience the
674 environmental treatment is a key factor which influences the expression of transgenerational effects
675 (Burton & Metcalfe, 2014; Donelson et al., 2018). We exposed the oysters during ten days straight
676 after fertilisation since the early steps of development have been shown to be the most sensitive to
677 the environmental information (Burton & Metcalfe, 2014). Moreover, the immune system in oysters
678 is set up early during the development since the existence of a primitive immune system has been
679 detected in the trochophore larva (Tirapé et al., 2007; Liu et al., 2015). We showed that the microbiota
680 of the oysters (exposed and control) was dominated by a few phyla, (*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*
681 and *Firmicutes* in larvae and *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Tenericutes* in adults) which is
682 consistent with the oyster core microbiota described in the literature (Trabal Fernández et al., 2014;
683 Clerissi et al., 2018; de Lorgeril et al., 2018; King, Siboni, et al., 2019). We further observed that the
684 main factor influencing the microbiota composition in the oysters was linked to the developmental
685 stages. Despite this strong developmental effect, we observed that the microbiota of exposed oysters
686 was more diverse and significantly different from the microbiota of control oysters. The difference in
687 diversity between exposed and control oysters was transient since it was only observed during
688 exposure and the difference in bacterial composition was observed until juvenile stages of the exposed
689 generation, a difference in microbiota diversity was also observed in the larvae of the F2 generation
690 however to a lesser extent than for the F1 generation. Altogether, these results suggest that it is
691 possible to manipulate the oyster microbiota by environmental microorganism exposure and this
692 manipulation may have long time and intergenerational effect. The transmission of microbiota across
693 generations has been reported from mother to embryo in mammals via the amniotic liquid and the
694 blood circulation but also during childbirth and milk feeding (Bearfield et al., 2002; Han et al., 2004;
695 Perez et al., 2007; Jiménez et al., 2008; Buddington et al., 2010; Nagata et al., 2012). In oviparous
696 species different transgenerational ways of transmission exist: parental mucus ingestion (Hosokawa et
697 al., 2012; Sylvain & Derome, 2017), faeces ingestion (Schwab et al., 2016), food regurgitation (Wang &
698 Rozen, 2017) or microbiota deposit on the eggs (Salem et al., 2015) or in early larval environment
699 (Kaltenpoth et al., 2005). Finally, *Wolbachia* bacteria are directly transmitted by female drosophila to
700 offspring in oocytes (Ferree et al., 2005; Newton et al., 2015). Such a way of transmission can be

701 feasible in oysters. The transcriptomic response during the microorganism exposure was investigated
 702 and clearly shows that exposing the larvae to a microorganisms enriched seawater alters the overall
 703 oyster transcriptome not only during the exposure but also later as the effect remains 4 months after
 704 the exposure, at juvenile stages. Interestingly, we observed that functions related to response to
 705 environmental stimulus and immune response are enriched in the exposed condition compare to the
 706 control one. The response to virus is enhanced in exposed compared to control oysters for both Fa.11
 707 and Fa.32, 4 months after the microbial exposure. This is of particular interest for oyster survival since
 708 this 4 months stage is when the oysters are confronted to the POMS disease in the field, in July when
 709 the temperature of the sea water increases. We therefore tested the impact of the environmental
 710 microorganisms' exposure on the response of the 4 months juvenile oysters to POMS. After POMS
 711 induction at the juvenile stage, we observed a change in the mortality dynamic and a survival
 712 improvement in the exposed oysters compared to control ones which correlates with less viral
 713 proliferation in the exposed oysters. This is in agreement with the key role for the virus for triggering
 714 the disease as previously described by de Lorgeril et al. (de Lorgeril et al., 2018). We also observed
 715 this increased survival capacity in the offspring of exposed oysters (F2 generation) and also in the great
 716 offspring of exposed oysters (F3 generation). However, this last F3 generation showed contrasting
 717 results since Fa.32 displayed increased resistance to POMS only in the field and not in experimental
 718 infection and Fa.11 displayed increased resistance to POMS only in the experimental infection but not
 719 in the field. We hypothesized that the intergenerational plasticity induced by the environmental
 720 microorganism exposure is slowly disappearing, which suggests a reversible phenotype of epigenetic
 721 nature (i.e. reversible and heritable changes in genes expression without modification in DNA
 722 sequence (Holliday R, 1975)). Indeed, epigenetic mechanisms are implied in various reversible
 723 phenotypic changes. For instance, in honey bees, foragers can become nurses via the reestablishment
 724 of DNA methylation pattern (Herb et al., 2012) and in humans cognitive behavioral therapy leads to an
 725 increase in DNA methylation, up to the level of healthy patients, of a gene implied in panic disorders
 726 (Ziegler et al., 2016). We further investigated the transcriptomic response observed during a POMS
 727 disease outbreak for the F2 generation and compared the response of the offspring of exposed versus
 728 offspring of control oysters. This analysis highlighted an overexpression of genes implied in the innate
 729 immune response in this F2 generation. We noted differences in the way the families respond to the
 730 disease although they have been subjected to the same microbial exposure. Fa.11 displayed a better
 731 basal immune response suggesting that the immune gene expression is frontloaded in this family
 732 whereas Fa.32 displayed a better inducible response. This F2 generation displaying a better
 733 transcriptomic innate immune response is in agreement with the enhanced surviving capacities that
 734 we observed and clearly showed that the stimulated genitors have transmitted their capacity of better
 735 respond to disease outbreaks to their offspring although this offspring has not been stimulated itself.

736 Intergenerational effects occurred when exposed generation (F1) already possess developed germ
 737 cells and in that way exposure impacts the second generation (F2) acting on germ cells. If the exposed
 738 generation carry embryo or eggs with developed germ cells, the exposure can impact the three
 739 generations (F1, F2 and F3) we then speak of multigenerational effects. Finally, if the exposure took
 740 place before the germ cell formation but the phenotype is nevertheless observed in offspring thus we
 741 speak about transgenerational effects. In oysters germ cells appeared early during the development
 742 as a gene germ cell specific is already expressed in embryos (Fabioux, 2004; Fabioux et al., 2004), that's
 743 why to studied the transgenerational effect of the exposure, we performed 3 generation. Such
 744 transgenerational effects can allow to prepare the offspring for the environment experienced by the
 745 ancestors (Yin et al., 2019). This further opened the question of the mechanisms which has allowed
 746 the transmission of the observed plasticity. Two mutually non-exclusive hypotheses are plausible: (i)
 747 the microbiota which has a direct effect on the immune system has been directly transmitted from the
 748 parents to the offspring. In that case, we expect that the transfer of the microbiota occurred during
 749 the female gametes formation, this type of vertical transmission has already been observed in another
 750 molluscs species: the bivalve *Solemya velum* (Krueger et al., 1996); (ii) the microbiota has not been
 751 directly transmitted but its action on the immune system has been transmitted and has led to a
 752 microbiota restructuration in the F2 generation. This microbiota restructuration observed on the F2
 753 generation during the early steps of development (day 10 and 58 for Fa.11 and on day 2 and 10 for
 754 Fa.32) has an effect on the innate immune system since these early steps are key steps for the set-up
 755 of immune system (Liu et al., 2015) (Tirapé et al., 2007) and this mecanism of transmission is repeated
 756 again on the subsequent generation. This also opened the question on how a change in innate immune
 757 response is transmitted from the F1 to the F2 generation and to what extend are genetic and
 758 epigenetic based events involved in this transmission?

759 **C- The implication of genetic and epigenetic for the transmission of the acquired**
 760 **immunity**

761 Investigation of genetic selection marks by comparison of SNPs between exposed and control
 762 oysters didn't lead to any proof of genetic selection which could have been induced by the exposure
 763 during larval development of the F1 generation. The exposure had not acted as a selective filter which
 764 is consistent with the absence of differences in survival rates between exposed and control larvae.
 765 Despite these results, we observed a contrasted genetic architecture on the three generations
 766 between the two families which may be related to the higher consanguinity between the two parents
 767 of the F0 generation in Fa.11 (Figure 6) and the lower number of effective progenitors leading to F1
 768 generation in Fa.32. While we didn't observe an excess of low pvalue in our analysis (which would have

769 revealed a genetic selection), we observed an excess of intermediate and high-p-values (showing a less
770 differentiation between condition compared to the expectation) (Sup. file 1, fig.17). This excess likely
771 resulted from the fact that oysters at F0 were full sibs, an experimental design that exacerbates the
772 incidence of deleterious recessive alleles. Indeed, negative selection acting on deleterious alleles tends
773 to decrease genetic differentiation between populations. This effect was much reduced when applying
774 FLK based on all generations (F0 to F3) of the two lines (Sup file 1, fig. 18), consistent with the fact that
775 deleterious alleles are continuously purged along generations. On the other hand, a clear excess of low
776 p-values was found in this second analysis (Figure et Table S6), implying that genetic adaptation
777 occurred from F2 generation, although it was not the case at F1 generation. One possible explanation
778 for this phenomena would be an adaptation to the epigenetic changes induced by the exposure at F1
779 generation. A link between genotype and epigenotype had also been revealed as DNA methylation is
780 highly clustered by families. Moreover, the interplay between genotype and epigenotype is well
781 documented in literature. Epigenetic changes are in part guided by the DNA sequence information
782 (Tanay et al., 2007; Ku et al., 2008; Lienert et al., 2011; Cedar & Bergman, 2012) and methylated
783 cytosines are highly mutable and can modify the genome in that way (Bird, 1986; Cooper &
784 Youssoufian, 1988; Cherry, 2018).

785 We also investigated the impact of epigenetic in the phenotype set-up as epigenetic mechanisms have
786 been shown as involved in environmental response and establishment of long term memory in
787 mollusks (Fallet et al. In press). Moreover, epigenetic modifications have been linked to trained
788 immunity in vertebrates (Netea & Meer, 2017). To address the implication of epigenetics in oysters
789 improved response to POMS and in the transmission of this phenotype, we performed DNA
790 methylation analysis. First we confirmed the general characteristic of oysters' methylome with
791 cytosine methylated in the CpG context, and with an organisation of methylation as a mosaic pattern
792 with large high methylated regions separated by large low methylated regions (Sarda et al., 2012). We
793 found 1.76% and 1.58% of cytosine being methylated compared to all genome cytosine in larval and
794 juveniles stages respectively which is consistent with previous observation (Wang et al., 2014; Olson
795 & Steven B Roberts, 2014b; Riviere et al., 2017) and close to the average methylation percentage
796 interval found in CpG in molluscs' species (Fallet et al. in press). We also observed that during
797 development, a global methylation change occurred with a higher level in larvae than in juveniles in
798 both families and both conditions. This result is different from those reported by Riviere et al (2017)
799 who had discovered an increase in methylation level after metamorphosis. This discrepancy could be
800 explained by the fact that Rivière et al. (Riviere et al., 2017) investigated the cytosine methylation level
801 in the exons whereas we investigated the level of methylation at the whole genome scale. We further
802 correlated the level of methylation to the level of expression by showing that high methylated genes

803 are more expressed than low methylated ones which confirmed previous literature (Wang et al., 2014;
804 Olson & Steven B Roberts, 2014b; Li et al., 2015). We further report here that the genes which do not
805 display methylated cytosines at all are not expressed at all. We also reported a particular feature since
806 we discovered that the correlation curve displayed a bell shape phenotype for both LMG and HMG
807 further showing that there is a maximum of genes expression for both categories. We further identified
808 regions which were differentially methylated in exposed compared to control conditions for the F1
809 generation showing that the exposure has an impact on cytosine methylation. We further observed
810 DMRs in the F2 generation also showing that the effect can be transmitted to the next generation. To
811 what extend these DMRs are inherited between the two generations remains to be investigated.
812 Despite the occurrence of DMRs in both generation, the link for differential gene expression is not
813 clear and further investigation are expected to better decipher the implication of cytosine methylation
814 for the observed multigenerational phenotype. Only few studies have reported a correlation between
815 change in intragenic or promoter DNA methylation and change in expression of the concerned gene
816 (Rajasethupathy et al., 2012; Saint-Carlier & Riviere, 2015; Tran et al., 2016; Rondon et al., 2017b; Wei
817 et al., 2018). Moreover, some results reported in mollusc species are in contradiction with results
818 found on vertebrate species where an hypermethylation of gene promoter induces an repression of
819 the gene (Li et al., 2015). To accurately decipher the role of epigenetic mechanisms in environmental
820 response, innate immune memory and inheritance, it's therefore of particular interest to address the
821 implication of histones variants and histones modifications. Indeed, histones modifications are implied
822 in trained immunity in the *Artemia* schrimp (Norouzitalab et al., 2016a) and histones changes are
823 involved in monocytes reprogramming after infection in *Candida albicans* (Quintin et al., 2012).
824 Another interesting bearing of epigenetic information is the non-coding RNAs. Studying non-coding
825 RNAs can be a very good track in order to understand epigenetic transgenerational transmission
826 because piARNs have been shown to be able to induce paramutation in a high number of generation
827 ($n>30$) in drosophila (De Vanssay et al., 2012) and particular tsRNAs are founded in diabetic mice
828 spermatozoids, tsRNA which once injected in embryos lead to metabolic disorder (Chen et al., 2015).

829 Conclusion

830 In the present study we revealed for the first time a transgenerational immune memory effect in *C.*
831 *gigas* induced after stimulation of the larvae with environmental microorganisms. Our results
832 suggested that a sophisticated interplay between the microflora and the innate immune response
833 were responsible for the inheritance of the phenotype, since both microbiota and innate immunity
834 could influence each other's. Our results suggested further that epigenetic based event might drive
835 the transmission of the phenotype but the accurate carrier of epigenetic information remains to be

836 determined. The capacity to manipulate the innate immune response via microbial stimulation in a
 837 transgenerational manner further open perspective for new aquaculture practices.

838

839 References

840 AFGAN, E., BAKER, D., MARIUS, VAN DEN BEEK DANIEL, B., DAVE, B., MARTIN, Č., JOHN, C., ET AL. (2016)
 841 The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic
 842 Acids Research*.

843 AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F.E., FIGUEROA, M.E., MELNICK, A. & MASON,
 844 C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles.
 845 *Genome Biol*, 13, R87.

846 ANDREWS, S. (2014) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. In
 847 <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

848 BÄCKHED, F., LEY, R.E., SONNENBURG, J.L., PETERSON, D.A. & GORDON, J.I. (2005) Host-bacterial
 849 mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915–1920.

850 BAI, C., WANG, C., XIA, J., SUN, H., ZHANG, S. & HUANG, J. (2015) Emerging and endemic types of Ostreid
 851 herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of invertebrate pathology*, 124, 98–106. Elsevier.

852 BARBOSA SOLOMIEU, V., RENAULT, T. & TRAVERS, M.A. (2015) Mass mortality in bivalves and the intricate
 853 case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 2–10. Elsevier Inc.

854 BEARFIELD, C., DAVENPORT, E.S., SIVAPATHASUNDARAM, V. & ALLAKER, R.P. (2002) Possible association
 855 between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of
 856 Obstetrics and Gynaecology*, 109, 527–533.

857 BIRD, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209–211.

858 BOITARD, S., KOFLER, R., FRANÇOISE, P., ROBELIN, D., SCHLÖTTERER, C. & FUTSCHIK, A. (2013) Pool-hmm:
 859 A Python program for estimating the allele frequency spectrum and detecting selective sweeps from next
 860 generation sequencing of pooled samples. *Molecular Ecology Resources*, 13, 337–340.

861 BONHOMME, M., CHEVALET, C., SERVIN, B., BOITARD, S., ABDALLAH, J., BLOTT, S. & SANCRISTOBAL, M.
 862 (2010) Detecting selection in population trees: The Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics*, 186, 241–
 863 262.

864 BRUTO, M., JAMES, A., PETTON, B., LABREUCHE, Y., CHENIVESSE, S., ALUNNO-BRUSCIA, M., ET AL. (2017)
 865 *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME Journal*, 11,
 866 1043–1052.

867 BUDDINGTON, R.K., WILLIAMS, C.H., KOSTEK, B.M., BUDDINGTON, K.K. & KULLEN, M.J. (2010) Maternal-
 868 to-infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97, 250–256.

869 BURTON, T. & METCALFE, N.B. (2014) Can environmental conditions experienced in early life influence
 870 future generations? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.

- 871 CALOSI, P., DE WIT, P., THOR, P. & DUPONT, S. (2016) Will life find a way? Evolution of marine species
 872 under global change. *Evolutionary Applications*, 9, 1035–1042.
- 873 LE CAO, K.-A., ROHART, F., GONZALEZ, I. & LE CAO, M.K.-A. (2018) Package ‘mixOmics’.
- 874 CEDAR, H. & BERGMAN, Y. (2012) Programming of DNA Methylation Patterns. *Annual Review of*
 875 *Biochemistry*, 81, 97–117.
- 876 CHEN, Q.Q., YAN, M., CAO, Z., LI, X., ZHANG, Y.Y., SHI, J., ET AL. (2015) Sperm tsRNAs contribute to
 877 intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 7977.
- 878 CHERRY, J.L. (2018) Methylation-induced hypermutation in natural populations of bacteria. *Journal of*
 879 *Bacteriology*, 200.
- 880 CHEVIN, L.M. & LANDE, R. (2015) Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity. *Evolution*, 69,
 881 2767–2775.
- 882 CLERISSI, C., LORGERIL, J. DE, PETTON, B., LUCASSON, A., ESCOUBAS, J.-M., GUEGUEN, Y., ET AL. (2018)
 883 Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters.
 884 bioRxiv, 378125.
- 885 COOPER, D.N. & YOUSOUFIAN, H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human*
 886 *Genetics*, 78, 151–155.
- 887 DAVISON, A.J., TRUS, B.L., CHENG, N., STEVEN, A., WATSON, M.S., CUNNINGHAM, C., ET AL. (2005) A novel
 888 class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86, 41–53.
- 889 DOBIN, A., DAVIS, C.A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., ET AL. (2013) STAR: Ultrafast
 890 universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15–21.
- 891 DONELSON, J.M., SALINAS, S., MUNDAY, P.L. & SHAMA, L.N.S. (2018) Transgenerational plasticity and
 892 climate change experiments: Where do we go from here? *Global Change Biology*, 24, 13–34.
- 893 ESCUDIE, F., AUER, L., BERNARD, M., MARIADASSOU, M., CAUQUIL, L., VIDAL, K., ET AL. (2017) FROGS:
 894 find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34, 1287–1294. Oxford University Press.
- 895 FABILOUX, C. (2004) Origine et développement des cellules germinales chez l’huître *Crassostrea gigas* :
 896 intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosion. Université de Bretagne occidentale - Brest.
- 897 FABILOUX, C., HUVET, A., LELONG, C., ROBERT, R., POUVREAU, S., DANIEL, J., ET AL. (2004) Oyster vasa -
 898 like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical*
 899 *Research Communications*, 320, 592–598.
- 900 FARELLO, M.I., BOITARD, S., NAYA, H., SANCRISTOBAL, M. & SERVIN, B. (2013) Detecting signatures of
 901 selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*, 193, 929–
 902 941.
- 903 FAWCETT, T.W. & FRANKENHUIS, W.E. (2015) Adaptive explanations for sensitive windows in
 904 development. *Frontiers in Zoology*, 12, 1–14.
- 905 FERREE, P.M., FRYDMAN, H.M., LI, J.M., CAO, J., WIESCHAUS, E. & SULLIVAN, W. (2005) Wolbachia utilizes
 906 host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* Oocyte. *PLoS Pathogens*, 1, 0111–0124.
- 907 FOO, S.A. & BYRNE, M. (2016) Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing
 908 Ocean. In *Advances in Marine Biology*. 1st edition. Elsevier Ltd.

- 909 GALINDO-VILLEGAS, J., GARCIA-MORENO, D., OLIVEIRA, D., MESEGUER, J. & MULERO, V. (2012)
 910 Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during
 911 zebra fish development, 109.
- 912 GOECKS, J., NEKRUTENKO, A., TAYLOR, J., AFGAN, E., ANANDA, G., BAKER, D., ET AL. (2010) Galaxy: a
 913 comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the
 914 life sciences. *Genome Biology*, 11.
- 915 GREEN, T.J., HELBIG, K., SPECK, P. & RAFTOS, D.A. (2016) Primed for success: Oyster parents treated with
 916 poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular*
 917 *Immunology*, 78, 113–120. Elsevier Ltd.
- 918 GREEN, T.J. & MONTAGNANI, C. (2013) Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the
 919 Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 μ var). *Fish &*
 920 *Shellfish Immunology*, 35, 382–388.
- 921 HADA, H.S., WEST, P.A. & LEE, J. V. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks.
 922 *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 1–4.
- 923 HADLEY WICKHAM, R.F., HENRY, L. & MÜLLER, K. (2017) dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R
 924 package version 0.7. 4.
- 925 HAN, Y.W., REDLINE, R.W., LI, M., YIN, L., HILL, G.B. & MCCORMICK, T.S. (2004) *Fusobacterium nucleatum*
 926 induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection*
 927 and immunity, 72, 2272–2279. Am Soc Microbiol.
- 928 HEAD, J.A. (2014) Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective. *Integrative*
 929 and *Comparative Biology*, 54, 77–86.
- 930 HERB, B.R., WOLSCHIN, F., HANSEN, K.D., ARYEE, M.J., LANGMEAD, B., IRIZARRY, R., ET AL. (2012)
 931 Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nature neuroscience*, 15,
 932 1371. Nature Publishing Group.
- 933 HINE, P., WESNEY, B. & HAY, B. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared
 934 larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 135–142.
- 935 HOLLIDAY R, P.J. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*,
 936 187, 226–232.
- 937 HOSOKAWA, T., HIRONAKA, M., MUKAI, H., INADOMI, K., SUZUKI, N. & FUKATSU, T. (2012) Mothers never
 938 miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal*
 939 *Behaviour*, 83, 293–300.
- 940 JEFFRIES, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*.
 941 *Aquaculture*, 29, 201–226.
- 942 JENKINS, C., HICK, P., GABOR, M., SPIERS, Z., FELL, S.A., GU, X., ET AL. (2013) Identification and
 943 characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in
 944 Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 109–126.
- 945 JIMENEZ, E., MARIN, M.L., MARTIN, R., ODRIOZOLA, J.M., OLIVARES, M., XAUS, J., ET AL. (2008) Is
 946 meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159, 187–193.

- 947 KALTENPOTH, M., GÖTTLER, W., HERZNER, G. & STROHM, E. (2005) Symbiotic bacteria protect wasp larvae
 948 from fungal infestation. *Current Biology*, 15, 475–479. Elsevier.
- 949 KEELING, S.E., BROSNAHAN, C.L., WILLIAMS, R., GIAS, E., HANNAH, M., BUENO, R., ET AL. (2014) New
 950 Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1 an opportunistic longitudinal study.
 951 *Diseases of aquatic organisms*, 109, 231–239.
- 952 KING, W.L., JENKINS, C., SEYMOUR, J.R. & LABBATE, M. (2019) Oyster disease in a changing environment:
 953 Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment. *Marine Environmental Research*, 143,
 954 124–140. Elsevier Ltd.
- 955 KING, W.L., SIBONI, N., WILLIAMS, N.L.R., KAHLKE, T., NGUYEN, K.V., JENKINS, C., ET AL. (2019) Variability
 956 in the composition of pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility
 957 to OsHV-1 μ var disease. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12.
- 958 KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M. & GLÖCKNER, F.O. (2013)
 959 Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based
 960 diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, 1–11.
- 961 KORTHAUER, K., CHAKRABORTY, S., BENJAMINI, Y. & IRIZARRY, R.A. (2018) Detection and accurate false
 962 discovery rate control of differentially methylated regions from whole genome bisulfite sequencing. *Biostatistics*,
 963 20, 367–383.
- 964 KRUEGER, D.M., GUSTAFSON, R.G. & CAVANAUGH, C.M. (1996) Vertical transmission of
 965 chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biological Bulletin*, 190,
 966 195–202.
- 967 KRUEGER, F. & ANDREWS, S.R. (2011) Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq
 968 applications. *Bioinformatics*, 27, 1571–1572.
- 969 KU, M., KOCHER, R.P., RHEINBAY, E., MENDENHALL, E.M., ENDOH, M., MIKKELSEN, T.S., ET AL. (2008)
 970 Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genetics*, 4.
- 971 LAFONT, M., PETTON, B., VERGNES, A., PAULETTO, M., SEGARRA, A., GOURBAL, B. & MONTAGNANI, C.
 972 (2017) Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.
 973 *Scientific reports*, 7, 13143.
- 974 LANGMEAD, B. & SALZBERG, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9,
 975 357. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.
- 976 LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. & SALZBERG, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment
 977 of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10.
- 978 LAUKENS, D., BRINKMAN, B.M., RAES, J., DE VOS, M. & VANDENABEELE, P. (2015) Heterogeneity of the
 979 gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 117–
 980 132.
- 981 LI, H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and
 982 population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27, 2987–2993.
- 983 LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNELLS, T., RUAN, J., HOMER, N., ET AL. (2009) The Sequence
 984 Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.

- 985 LI, Y., HUANG, X., GUAN, Y., SHI, Y., ZHANG, H. & HE, M. (2015) DNA methylation is associated with
 986 expression level changes of galectin gene in mantle wound healing process of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Fish*
 987 *and Shellfish Immunology*, 45, 912–918. Elsevier Ltd.
- 988 LIENERT, F., WIRBELAUER, C., SOM, I., DEAN, A., MOHN, F. & SCHÜBELER, D. (2011) Identification of
 989 genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*, 43, 1091–1097.
 990 Nature Publishing Group.
- 991 LIU, Z., ZHOU, Z., WANG, L., SONG, X., CHEN, H., WANG, W., ET AL. (2015) The enkephalinergic nervous
 992 system and its immunomodulation on the developing immune system during the ontogenesis of oyster
 993 *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 250–259. Elsevier Ltd.
- 994 LOKMER, A., KUENZEL, S., BAINES, J.F. & WEGNER, K.M. (2016) The role of tissue-specific microbiota in
 995 initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18, 970–987.
- 996 LOKMER, A. & WEGNER, K.M. (2015) Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to
 997 temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9, 670–682. Nature Publishing Group.
- 998 DE LORGERIL, J., LUCASSON, A., PETTON, B., TOULZA, E., MONTAGNANI, C., CLERISSI, C., ET AL. (2018)
 999 Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters.
- 1000 LOVE, M.I., HUBER, W. & ANDERS, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-
 1001 seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 1–21.
- 1002 MAHE, F., ROGNES, T., QUINCE, C., DE VARGAS, C. & DUNTHORN, M. (2014) Swarm: robust and fast
 1003 clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593.
- 1004 MANSERGH, S. & ZEHR, J.P. (2014) *Vibrio* diversity and dynamics in the Monterey Bay upwelling region.
 1005 *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–9.
- 1006 MARTENOT, C., ODEN, E., TRAVAILLE, E., MALAS, J.P. & HOUSSIN, M. (2011) Detection of different variants
 1007 of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research*, 160,
 1008 25–31. Elsevier B.V.
- 1009 MARTIN, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.
 1010 *EMBnet.journal*, 17, 10–12.
- 1011 MARTINEZ ARBIZU, P. (2019) pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package
 1012 version 0.3.
- 1013 MCMURDIE, P.J. & HOLMES, S. (2013) Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and
 1014 Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8.
- 1015 NAGATA, R., NAGANO, H., OGISHIMA, D., NAKAMURA, Y., HIRUMA, M. & SUGITA, T. (2012) Transmission
 1016 of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. *Pediatrics International*, 54, 350–355.
- 1017 NAGY, C. & TURECKI, G. (2012) Sensitive periods in epigenetics: Bringing us closer to complex behavioral
 1018 phenotypes. *Epigenomics*, 4, 445–457.
- 1019 NETEA, M.G., LATZ, E., KINGSTON, H.G., MILLS, L.A. & NEILL, J.O.' (2015) Innate immune memory: a
 1020 paradigm shift in understanding host defense. *Nature Immunology*, 16, 675–679. Nature Publishing Group.
- 1021 NETEA, M.G. & MEER, J.W.M. VAN DER (2017) Commentary Trained Immunity: An Ancient Way of
 1022 Remembering. *Cell Host and Microbe*, 21, 297–300. Elsevier Inc.

- 1023 NEUWIRTH, E. & BREWER, R.C. (2014) ColorBrewer palettes. R package version, 1.
- 1024 NEWTON, I.L.G., SAVYTSKY, O. & SHEEHAN, K.B. (2015) Wolbachia Utilize Host Actin for Efficient
1025 Maternal Transmission in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 11, 1–19.
- 1026 NOROUZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016) Probing the
1027 phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia*
1028 as a model system. *Scientific Reports*, 6, 21166. Nature Publishing Group.
- 1029 OKSANEN, J.F., BLANCHET, G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., ET AL. (2019) vegan:
1030 Community Ecology Package.
- 1031 OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014) Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in
1032 *Crassostrea gigas* male gametes. *Frontiers in Physiology*, 5, 224. Frontiers Media S.A.
- 1033 PEREZ, P.F., DORE, J., LECLERC, M., LEVENEZ, F., BENYACOU, J., SERRANT, P., ET AL. (2007) Bacterial
1034 imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119.
- 1035 PETTON, B., BOUDRY, P., ALUNNO-BRUSCIA, M. & PERNET, F. (2015) Factors influencing disease-induced
1036 mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 6, 205–222.
- 1037 PETTON, B., DE LORGERIL, J., MITTA, G., DAIGLE, G., PERNET, F. & ALUNNO-BRUSCIA, M. (2019) Fine-scale
1038 temporal dynamics of herpes virus and vibrios in seawater during a polymicrobial infection in the Pacific oyster
1039 *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, 135, 97–106.
- 1040 PETTON, B., PERNET, F., ROBERT, R. & BOUDRY, P. (2013) Temperature influence on pathogen
1041 transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environment*
1042 *interactions*, 3, 257–273.
- 1043 PINAUD, S., PORTELA, J., DUVAL, D., NOWACKI, F.C., OLIVE, M.-A., ALLIENNE, J.-F., ET AL. (2016) A Shift
1044 from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria*
1045 *glabrata*. *PLOS Pathogens*, 12, e1005361.
- 1046 PORTELA, J., DUVAL, D., ROGNON, A., GALINIER, R., BOISSIER, J., COUSTAU, C., ET AL. (2013) Evidence for
1047 specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *biomphalaria glabrata* snail. *Journal of*
1048 *Innate Immunity*, 5, 261–276.
- 1049 PRADO-ALVAREZ, M., DARMODY, G., HUTTON, S., O'REILLY, A., LYNCH, S.A. & CULLOTY, S.C. (2016)
1050 Occurrence of OsHV-1 in *Crassostrea gigas* cultured in Ireland during an exceptionally warm summer. Selection
1051 of less susceptible oysters. *Frontiers in Physiology*, 7, 1–14.
- 1052 QUINTIN, J., SAEED, S., MARTENS, J.H.A., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J., IFRIM, D.C., LOGIE, C., ET AL.
1053 (2012) *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of
1054 monocytes. *Cell Host and Microbe*, 12, 223–232.
- 1055 R CORE TEAM (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical
1056 Computing, Vienna, Au.
- 1057 RAJASETHUPATHY, P., ANTONOV, I., SHERIDAN, R., FREY, S., SANDER, C., TUSCHL, T. & KANDEL, E.R. (2012)
1058 A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*, 149, 693–707.
1059 Elsevier Inc.

- 1060 RENAULT, T., MOREAU, P., FAURY, N., PEPIN, J.-F., SEGARRA, A. & WEBB, S. (2012) Analysis of Clinical
 1061 Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus
 1062 Genome Areas. *Journal of Virology*, 86, 5942–5947.
- 1063 RIVIERE, G., HE, Y., TECCHIO, S., CROWELL, E., GRAS, M., SOURDAINE, P., ET AL. (2017) Dynamics of DNA
 1064 methylomes underlie oyster development. *PLoS Genetics*, 13, 1–16.
- 1065 RODRIGUES, L.C., BERGH, J.C.J.M. VAN DEN, MASSA, F., THEODOROU, J.A., ZIVERI, P. & GAZEAU, F. (2015)
 1066 Sensitivity of Mediterranean Bivalve Mollusc Aquaculture to Climate Change, Ocean Acidification, and Other
 1067 Environmental Pressures: Findings from a Producer Survey. *Journal of Shellfish Research*, 34, 1161–1176.
- 1068 ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C. & MAHE, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool
 1069 for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- 1070 ROHART, F., GAUTIER, B., SINGH, A. & LE CAO, K.-A. (2017) mixOmics: An R package for ‘omics feature
 1071 selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13, e1005752. Public Library of Science.
- 1072 RONDON, R., GRUNAU, C., FALLET, M., CHARLEMAGNE, N., SUSSARELLU, R., CHAPARRO, C., ET AL. (2017)
 1073 Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environmental Epigenetics*, 3.
- 1074 ROQUE, A., CARRASCO, N., ANDREE, K.B., LACUESTA, B., ELANDALOUSSI, L., GAIRIN, I., ET AL. (2012) First
 1075 report of OshV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*, 324–325, 303–
 1076 306. Elsevier B.V.
- 1077 ROSS, P.M., PARKER, L. & BYRNE, M. (2016) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to
 1078 changing ocean conditions Pauline. *ICES J. Mar. Sci.*, 73, 537–549.
- 1079 LE ROUX, F., WEGNER, K.M. & POLZ, M.F. (2016) Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in
 1080 Wild Animals. *Trends in Microbiology*, 24, 568–580. Elsevier Ltd.
- 1081 SAINT-CARLIER, E. & RIVIERE, G. (2015) Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas*
 1082 evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Letters*, 589, 1459–1466.
 1083 Federation of European Biochemical Societies.
- 1084 SALEM, H., FLOREZ, L., GERARDO, N. & KALTENPOTH, M. (2015) An out-of-body experience: The
 1085 extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society*
 1086 *B: Biological Sciences*, 282.
- 1087 SARDA, S., ZENG, J., HUNT, B.G. & YI, S. V. (2012) The evolution of invertebrate gene body methylation.
 1088 *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1907–1916.
- 1089 SCHWAB, D.B., RIGGS, H.E., NEWTON, I.L.G. & MOCZEK, A.P. (2016) Developmental and ecological
 1090 benefits of the maternally transmitted microbiota in a dung beetle. *American Naturalist*, 188, 679–692.
- 1091 SCHWINDT, A.R. (2015) Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there
 1092 evidence of transgenerational inheritance? *General and Comparative Endocrinology*, 219, 152–164. Elsevier Inc.
- 1093 SEGARRA, A., PEPIN, J.F., ARZUL, I., MORGA, B., FAURY, N. & RENAULT, T. (2010) Detection and description
 1094 of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters,
 1095 *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research*, 153, 92–99.

- 1096 SHIMAHARA, Y., KURITA, J., KIRYU, I., NISHIOKA, T., YUASA, K., KAWANA, M., ET AL. (2012) Surveillance of
 1097 type 1 ostreid herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathology*, 47, 129–136. The Japanese Society of Fish
 1098 Pathology.
- 1099 STOREY, J.D. & TIBSHIRANI, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the*
 1100 *National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9440–9445.
- 1101 SYLVAIN, F.É. & DEROME, N. (2017) Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the
 1102 gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports*, 7, 1–14.
- 1103 TANAY, A., O'DONNELL, A.H., DAMELIN, M. & BESTOR, T.H. (2007) Hyperconserved CpG domains underlie
 1104 Polycomb-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104,
 1105 5521–5526.
- 1106 THERNEAU, T. (2015) A Package for Survival Analysis in S. version 2.38.
- 1107 THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J.T. & MESIROV, J.P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): High-
 1108 performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14, 178–192.
- 1109 TIRAPE, A., BACQUE, C., BRIZARD, R., VANDENBULCKE, F. & BOULO, V. (2007) Expression of immune-
 1110 related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*,
 1111 31, 859–873.
- 1112 TRABAL FERNANDEZ, N., MAZON-SUASTEGUI, J.M., VAZQUEZ-JUAREZ, R., ASCENCIO-VALLE, F. &
 1113 ROMERO, J. (2014) Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters
 1114 (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. *FEMS*
 1115 *Microbiology Ecology*, 88, 69–83.
- 1116 TRAN, T.K.A., MACFARLANE, G.R., KONG, R.Y.C., O'CONNOR, W.A. & YU, R.M.K. (2016) Potential
 1117 mechanisms underlying estrogen-induced expression of the molluscan estrogen receptor (ER) gene. *Aquatic*
 1118 *Toxicology*, 179, 82–94. Elsevier B.V.
- 1119 VANDEGEHUCHTE, M.B. & JANSSEN, C.R. (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation*
 1120 *Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 36–45. Elsevier B.V.
- 1121 DE VANSSAY, A., BOUGE, A.L., BOIVIN, A., HERMANT, C., TEYSSET, L., DELMARRE, V., ET AL. (2012)
 1122 Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus. *Nature*, 490, 112–115.
- 1123 VIGNAL, A., BOITARD, S., THEBAULT, N., DAYO, G.K., YAPI-GNAORE, V., YOUSAO ABDOU KARIM, I., ET AL.
 1124 (2019) A guinea fowl genome assembly provides new evidence on evolution following domestication and
 1125 selection in galliformes. *Molecular Ecology Resources*, 19, 997–1014.
- 1126 WANG, X., LI, Q., LIAN, J., LI, L., JIN, L., CAI, H., ET AL. (2014) Genome-wide and single-base resolution DNA
 1127 methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG
 1128 methylation. *BMC Genomics*, 15.
- 1129 WANG, Y. & ROZEN, D.E. (2017) Gut Microbiota Colonization and *Nicrophorus vespilloides* throughout
 1130 Development, 83, 1–13.
- 1131 WEI, L., XU, F., WANG, Y., CAI, Z., YU, W., HE, C., ET AL. (2018) The Molecular Differentiation of
 1132 Anatomically Paired Left and Right Mantles of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 20,
 1133 425–435. *Marine Biotechnology*.

1134 WICKHAM, H. (2016) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.

1135 WICKHAM, H. & HENRY, L. (2017) *Tidyr: Easily tidy data with 'spread ()' and 'gather ()' functions*. R package
1136 version 0.6, 1.

1137 YIN, J., ZHOU, M., LIN, Z., LI, Q.Q. & ZHANG, Y. (2019) Transgenerational effects benefit offspring across
1138 diverse environments: a meta-analysis in plants and animals. *Ecology Letters*, 1976–1986.

1139 ZHANG, G., FANG, X., GUO, X., LI, L., LUO, R., XU, F., ET AL. (2012) The oyster genome reveals stress
1140 adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49–54.

1141 ZHANG, T., QIU, L., SUN, Z., WANG, L., ZHOU, Z., LIU, R., ET AL. (2014) The specifically enhanced cellular
1142 immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*.
1143 *Developmental & Comparative Immunology*, 45, 141–150.

1144 ZIEGLER, C., RICHTER, J., MAHR, M., GAJEWSKA, A., SCHIELE, M.A., GEHRMANN, A., ET AL. (2016) MAOA
1145 gene hypomethylation in panic disorder - Reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy.
1146 *Translational Psychiatry*, 6, 1–8. Nature Publishing Group.

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

Figures

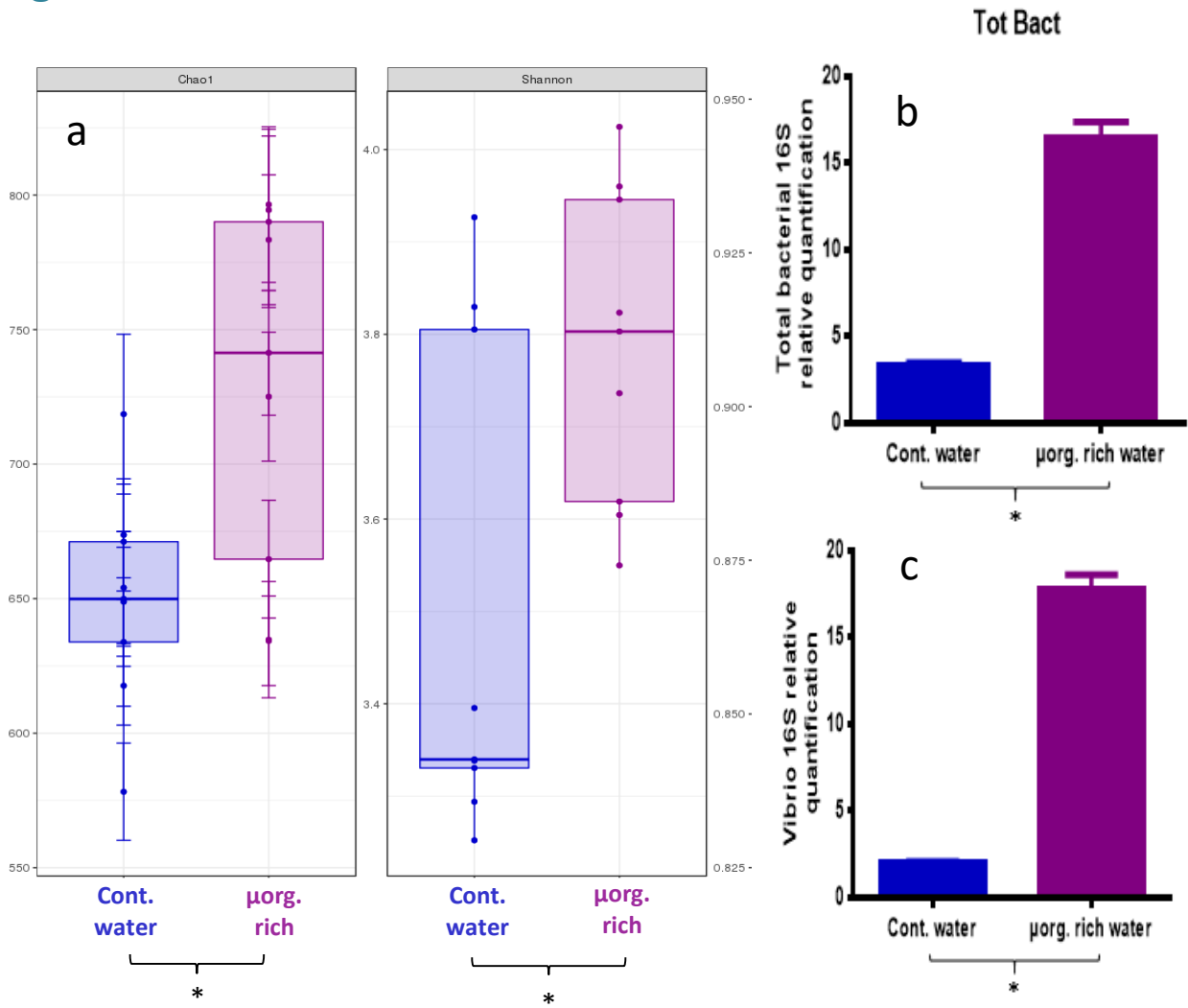
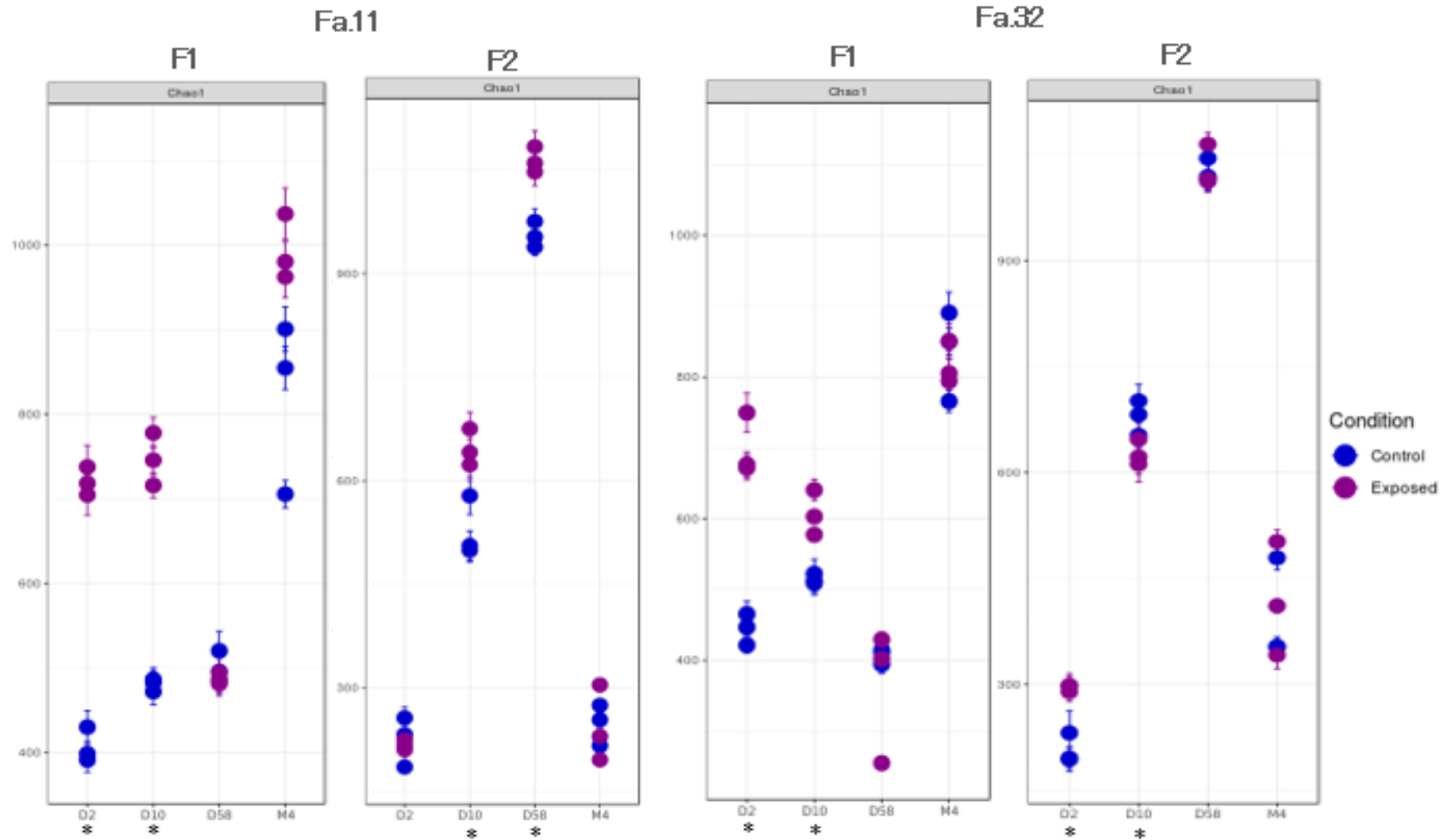


Figure 1: Alpha diversity and quantification of bacteria present in water used for the experiment

Chao1 and Shannon index (y-axis) has been determined in the control water (blue) and microorganisms enriched water (purple) at day 2 of the exposure (a). * represents a statistically different index in the microorganisms enriched water compared to the control water, *i.e.*, for Chao1: ANOVA, $p < 0,05$; for Shannon: Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. Bacterial 16S quantification (b) and Vibrio 16S quantification (c) of the control water (blue) and microorganisms' enriched water (purple) at day 2 of the exposure. * represents statistical significant differences between conditions: unpaired t-test with Welch's correction, $p = 0,001$ for total bacteria (b) and $p = 0,0008$ for vibrio 16S (c).



1194

1195

1196

Figure 2: Alpha diversity based on 16S barcoding analysis performed on microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters of the F1 and F2 generations

Chao1 index (y-axis) have been determined for the microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters during their development to juveniles' stages, at day 2, 10, 58 and 4 months after fertilisation (D2, D10, D58, 4 months on x-axis) for both generations (F1 and F2). Oysters were exposed to a microorganisms enriched water at the F1 generation (Purple bars), or oysters were raised in control condition at the F1 (Blue bars). * represent a statistically different index in the exposed compared to the control condition *i.e* : ANOVA, $p < 0,05$

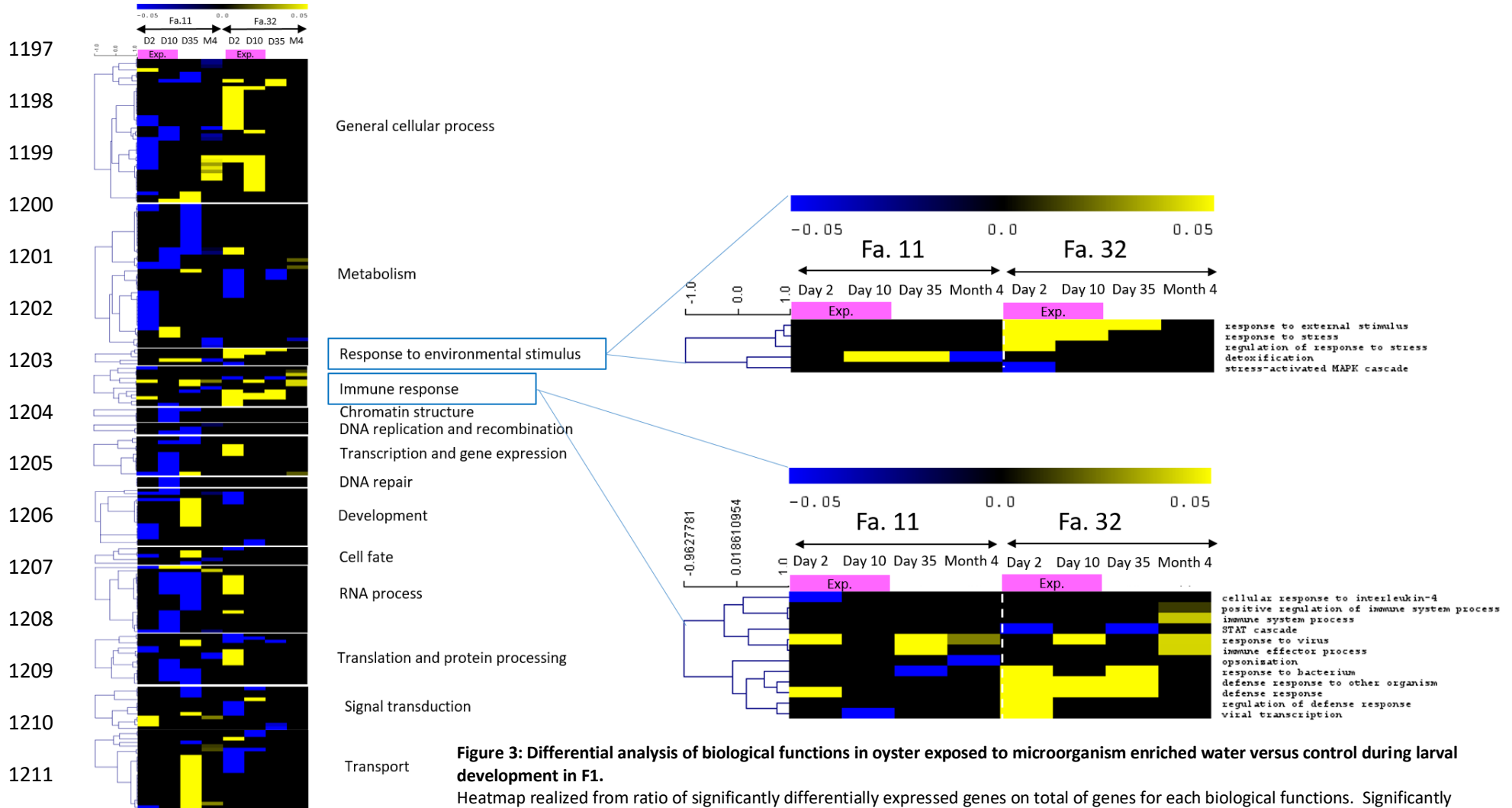


Figure 3: Differential analysis of biological functions in oyster exposed to microorganism enriched water versus control during larval development in F1.

Heatmap realized from ratio of significantly differentially expressed genes on total of genes for each biological functions. Significantly differentially expressed genes in exposed oysters compared to control ones were obtained after DE-Seq comparison. Genes functional annotation with RGOA gave significantly differentially expressed biological functions. Biological functions were then sorted by larger biological processes. Overexpressed function in exposed oysters compared to control ones are represented in yellow, underexpressed functions are in blue. From left to right are represent the different sampling time: Fa.11 , day 2, day 10, day 35, month 4 and Fa.32 day 2, day 10, day 35, month 4. We focused on functions implied in response to environmental stimulus and immune response which are zoomed on the right.

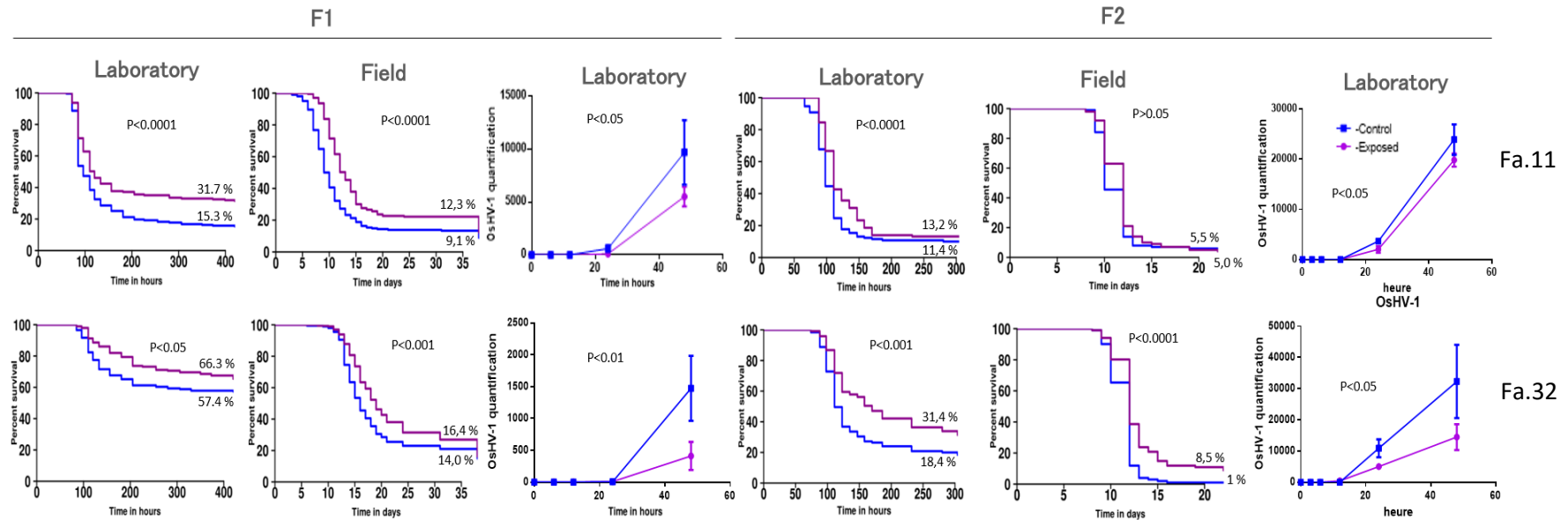


Figure 4: Survival curves and OsHV-1 quantification during disease induction.

Survival curves realised according to mortality record of oysters during experimental infection (in hours) or mortality record of oysters in the field during POMS disease outbreak (in days) and quantification of OsHV-1 in oysters (3 groups of 10 oysters per condition) during experimental infection (in hours) for Fa.11 and Fa.32, exposed (purple line) and control (blue line) for generation F1 (a) and generation F2 (b). P-value of log-rank test and final survival percentage for each condition are indicated on each survival curve. For the OsHV-1 quantification, p-value of two way anova with Bonferroni's multiple comparisons test are indicated.

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

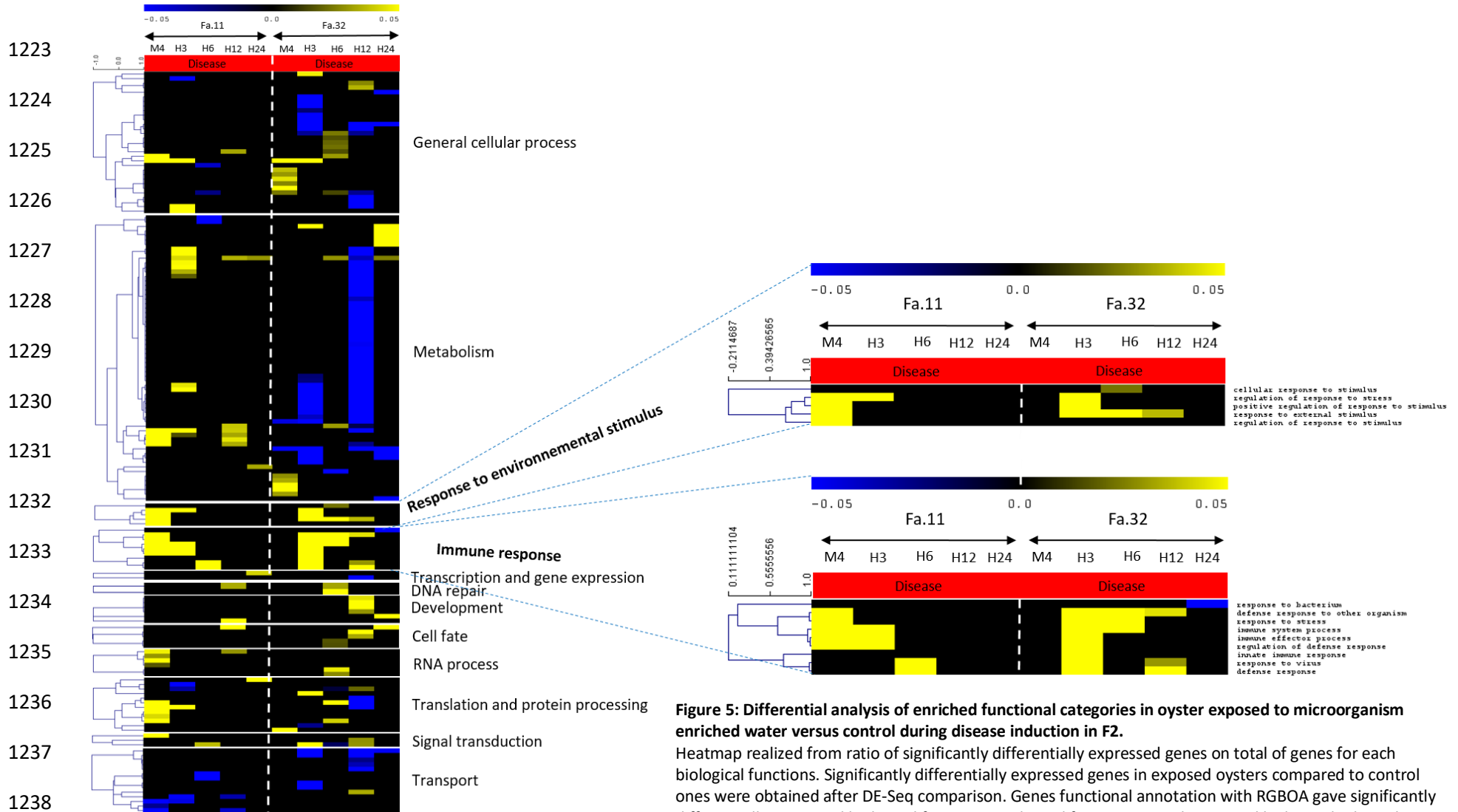


Figure 5: Differential analysis of enriched functional categories in oyster exposed to microorganism enriched water versus control during disease induction in F2. Heatmap realized from ratio of significantly differentially expressed genes on total of genes for each biological functions. Significantly differentially expressed genes in exposed oysters compared to control ones were obtained after DE-Seq comparison. Genes functional annotation with RGOA gave significantly differentially expressed biological functions. Biological function were then sorted by larger biological processes. Overexpressed function in exposed oysters compared to control ones are represented in yellow, underexpressed functions are in blue. From left to right are represent the different sampling time: Fa.11 , month 4, hour 3, hour 6, hour 12 and hour 24 and Fa.32 month 4, hour 3, hour 6, hour 12 and hour 24. We focused on functions implied in response to environmental stimulus and immune response which are zoomed on the right.

1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257

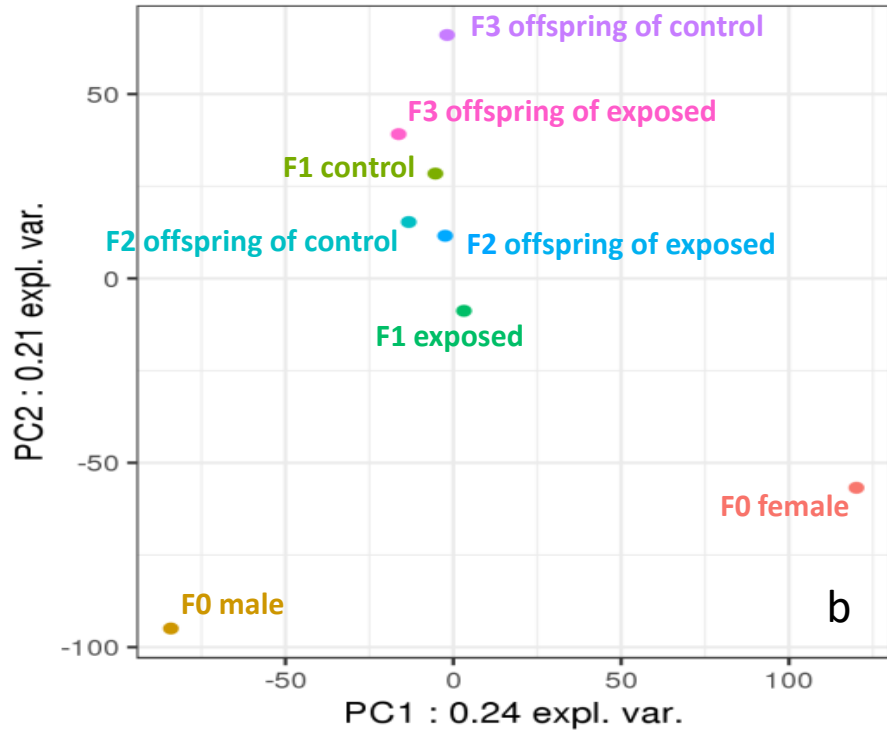
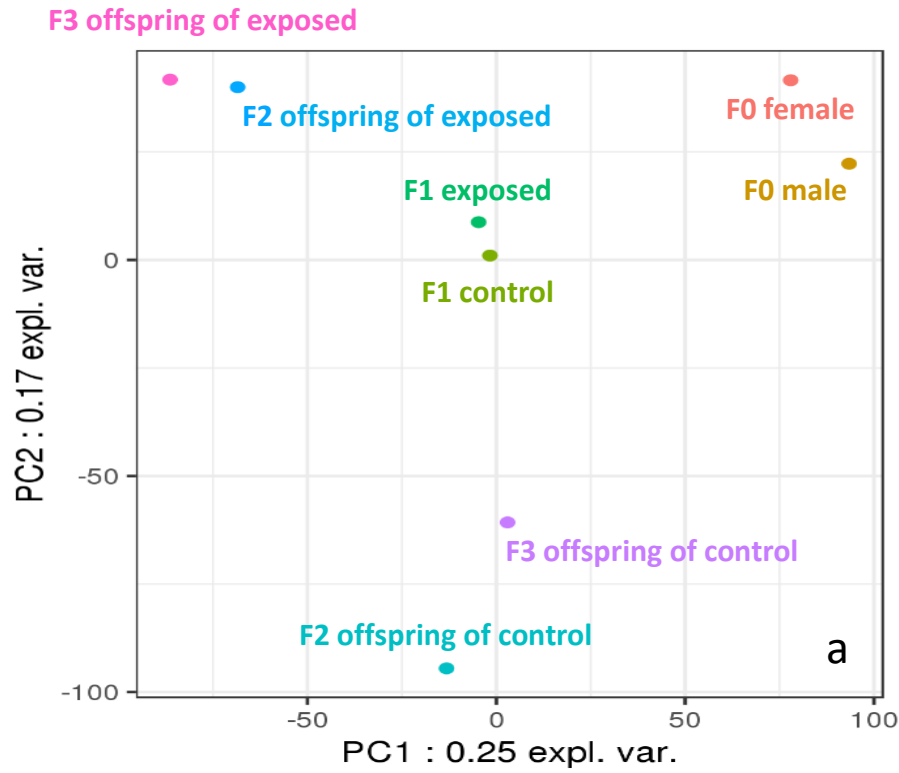
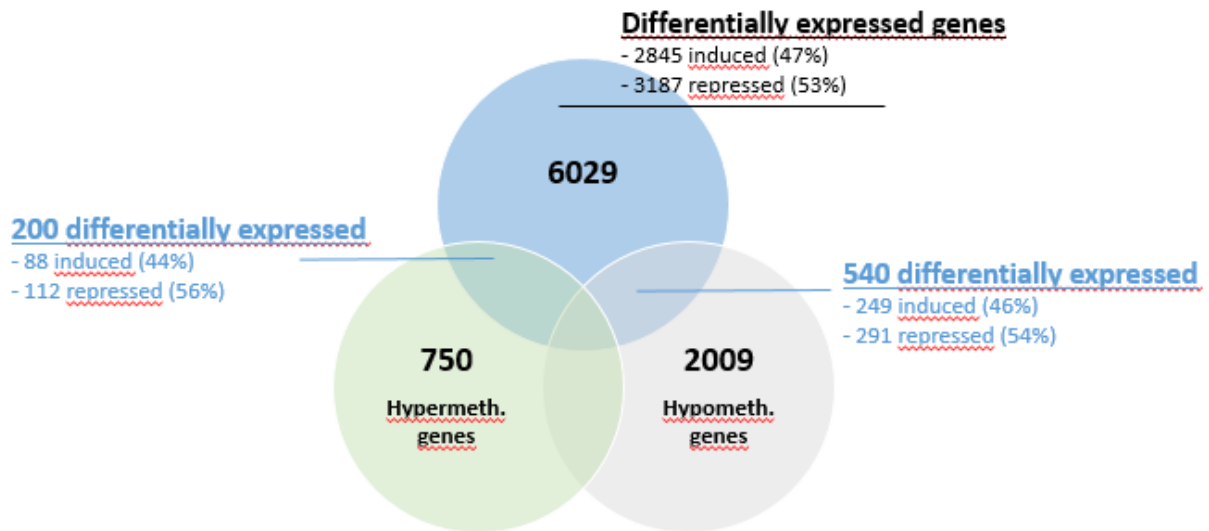


Figure 6: PCA based on Fij matrix from SNPs identification in both families and for the three generations.
Each point corresponds to a sample of 30 individuals.
a. PCA for Fa.11
b. PCA for Fa.32



1258

1259

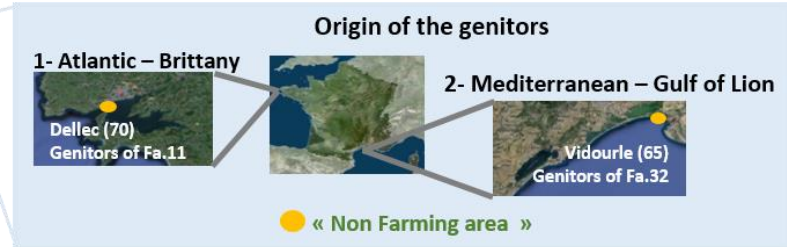
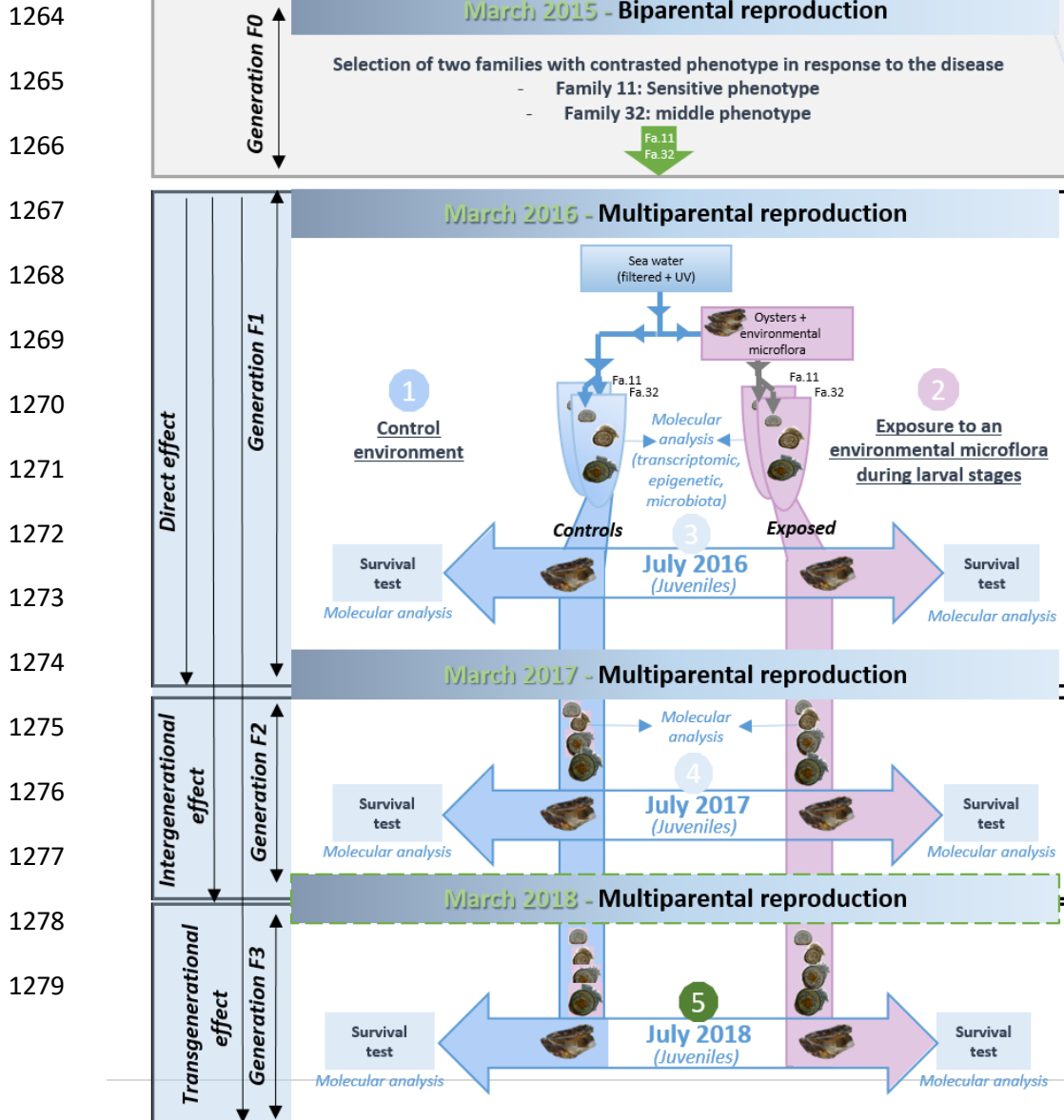
1260

1261

1262

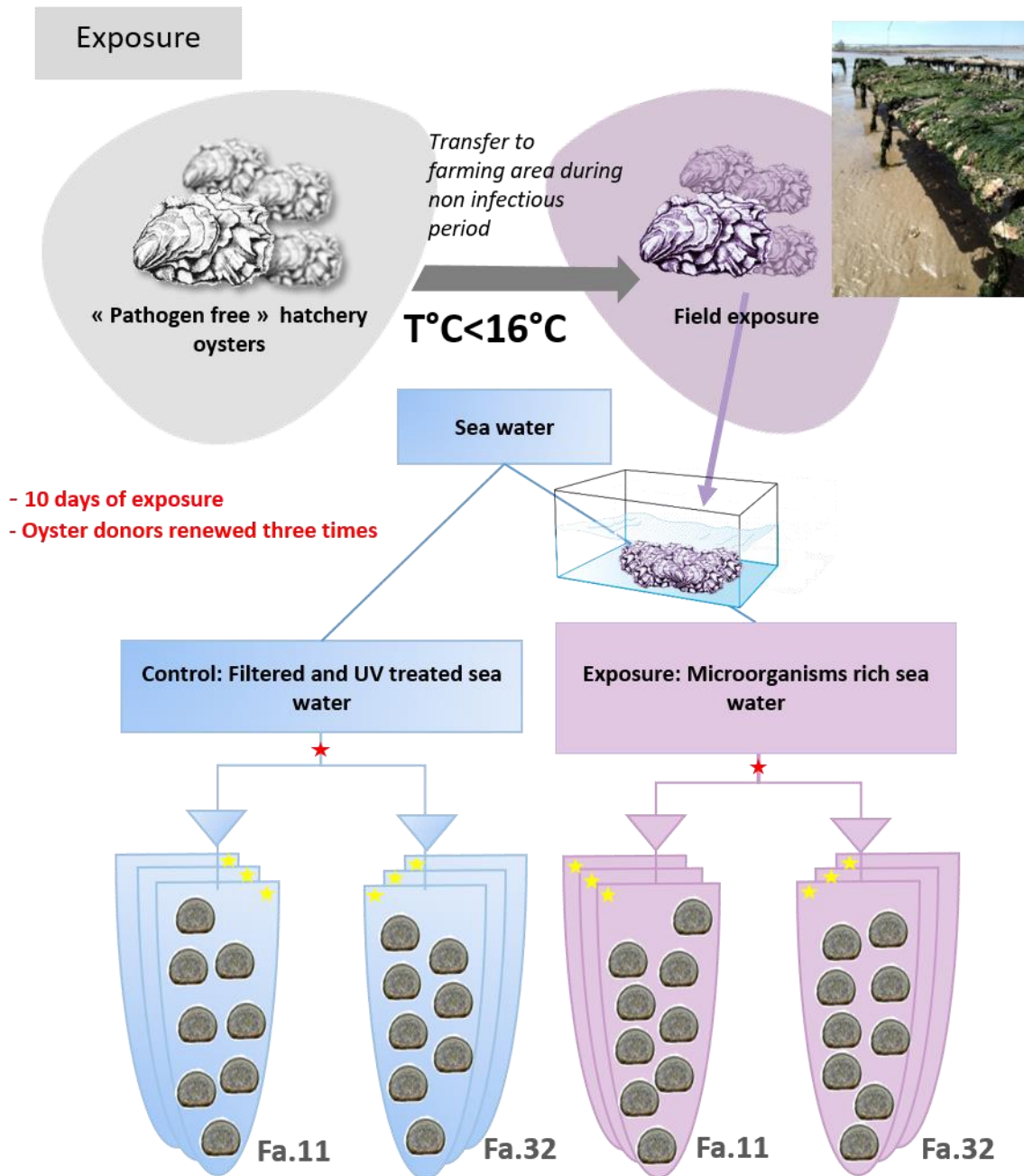
Figure 7: The link between differential methylation and differential expression for intragenic methylation
The 6029 differentially expressed genes were intersected with the genes displaying intragenic DMRs. Among the 750 and 2009 intragenic DMRs displaying hyper and hypomethylation respectively, 200 and 540 correspond to DE genes. These results were obtained on the dataset of Fa.32 of day 10 and the F2 generation. Comparison are performed between exposed versus control for both differential expression and differential methylation analysis.

1263 **Supplementary files**



Supplementary file 1, figure 1: Description of the experimental design.

Biparental reproduction was performed to generate two oyster families (Fa.11 and Fa.32) (selected during the ANR decipher project, See De Lorgeril et al. 2019) in March 2015. This families Fa.11 and Fa.32) were chosen for their sensitive and intermediate phenotype to the POMS disease respectively. The F1 generation was generated in March 2016 by multiparental reproduction between brothers and sisters of each family. Just after the fertilization, the oyster larvae were exposed to a control environment (1) (filtered 1 micron and UV treated water) or to an environmental microflora (2). This environmental microflora comes from oyster donors which have been taken from the field and placed upstream of the tank containing the larvae (See sup file 1, figure 2). This exposure has lasted from 2 hours to 10 days post-fertilization, during the early development in order to shape the oyster immune system toward a more resistant phenotype. The introduced microflora is not pathogenic as oyster donors have been taken from the field during a non infectious OsHv1 period (temperature < 16°C). Samples for molecular biology were taken during the exposure (See sup file 1, table 2). After 10 days, both exposed and control oysters were raised in normal conditions (filtered and UV treated water) until juvenile stages (3 months). At this stage, oysters were tested for the resistance to an experimental infection (3). Samples were taken during the infection period for molecular biology experiments (See sup file 1, table 2). In order to test for an intergenerational effect of the immune shaping experiment, a part of the oysters controls (which have not been subjected to the disease) were used to perform multiparental reproduction and to generate the F2 generation. The F2 progeny was raised in standard conditions (Petton et al, 2013, 2015) and tested for their survival capacities at juvenile stages during an experimental infection (4). Samples were taken during the larval development and the experimental infection period for molecular biology experiments (See sup file 1, table 2). In order to test for a transgenerational effect of the immune shaping experiment, a part of the F2 oysters were used to perform multiparental reproduction and to generate the F3 generation. The F3 progeny was raised in standard conditions and tested for their survival capacities at juvenile stages during an experimental infection (5).



1280

1281 **Supplementary file 1, figure 2: Exposure with an environmental microbiota of the F1 larvae.**

1282 Exposure (purple condition) has been realized via pathogen free oysters (Le Roux et al, 2016) which were the donors of
 1283 microorganisms: they were initially placed in natural environment during a non-infectious period ($T.^{\circ} < 16^{\circ}\text{C}$, no OshV1),
 1284 then transferred upstream of the breeding pipes in order that they can transmit their microbiota to recipient larvae via
 1285 water flux. This exposure has started 2 hours after F0 gametes fecundation and during 10 days. During exposure, donors'
 1286 oysters have been renewed three times. Control water (blue condition) is filtered and UV treated water. Red stars
 1287 indicate water sampling position for barcoding analysis and yellow stars indicates water sampling for cultivable analysis.

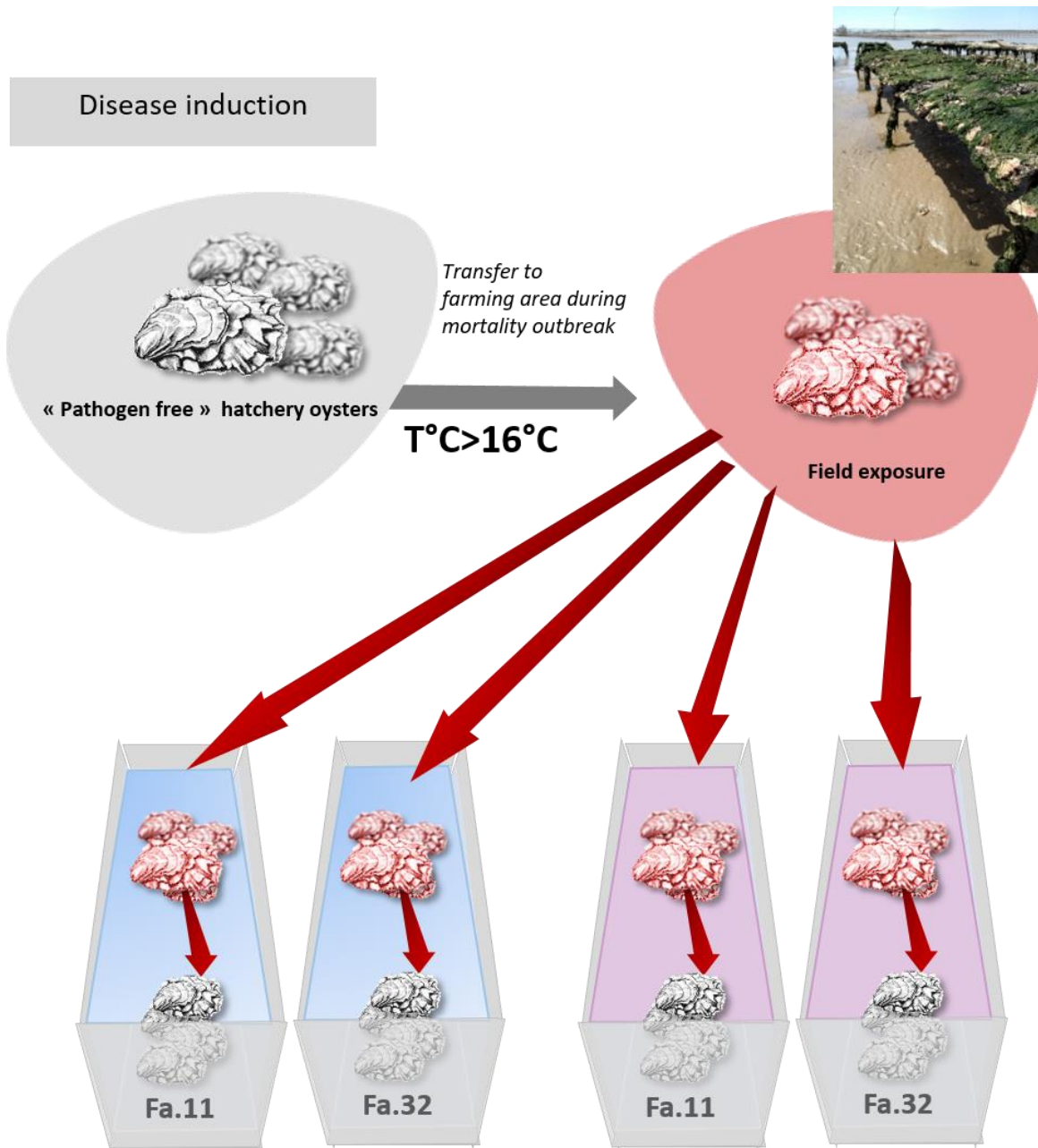
1284

1285

1286

1287

1288



1289

1290

Supplementary file 1, figure 3: Description of the design experimental for the disease induction.

1291

Experimental disease induction was performed with oyster donors which were initially placed in natural environment during an infectious period (temperature $>16^{\circ}\text{C}$ and mortalities recorded in the field). These oyster donors were placed in the same tanks as the recipient oysters. The recipient oysters are 4 months juveniles from Fa.11 and Fa.32 which have been exposed to an environmental microflora at the F1 generation (purple condition) or which have been placed in control water (blue condition). Experimental disease induction has been performed on the three generations (F1, F2 and F3 as indicated in sup. file 1, fig.1) and sampling for molecular biology has been performed as explained in sup. file 1, table 2.

1292

1293

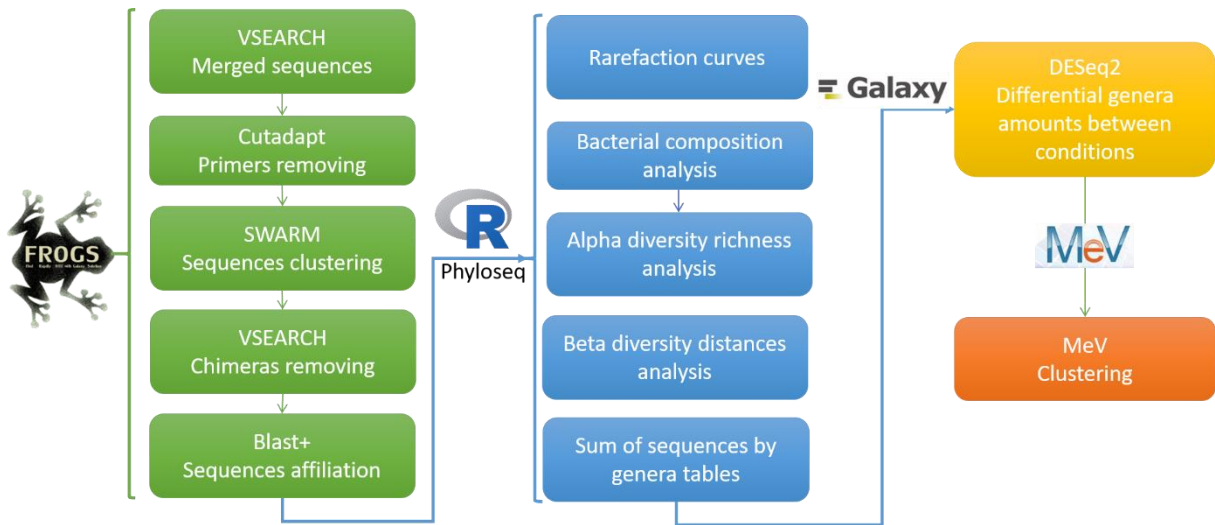
1294

1295

1296

1297

1298



1299

Supplementary file 1, figure 4: Bioinformatics pipeline for microbiota analysis

1300 First analysis on sequences were made with the FROGS pipeline. Affiliated sequences were submitted to different analysis
 1301 on R software using Phyloseq library.
 1302 Tables with sum of sequences for genera were used for differential comparison using DESeq2. Significant differences in
 1303 genera proportion were clustered using MeV.

1303

1304

1305

1306

1307

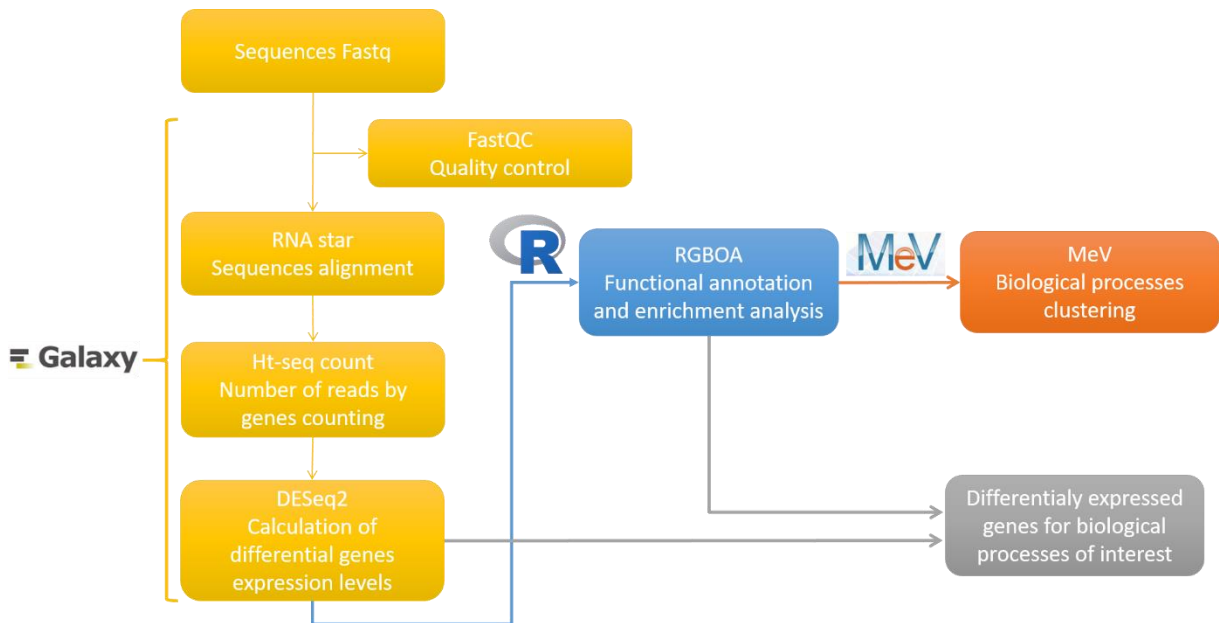
1308

1309

1310

1311

1312

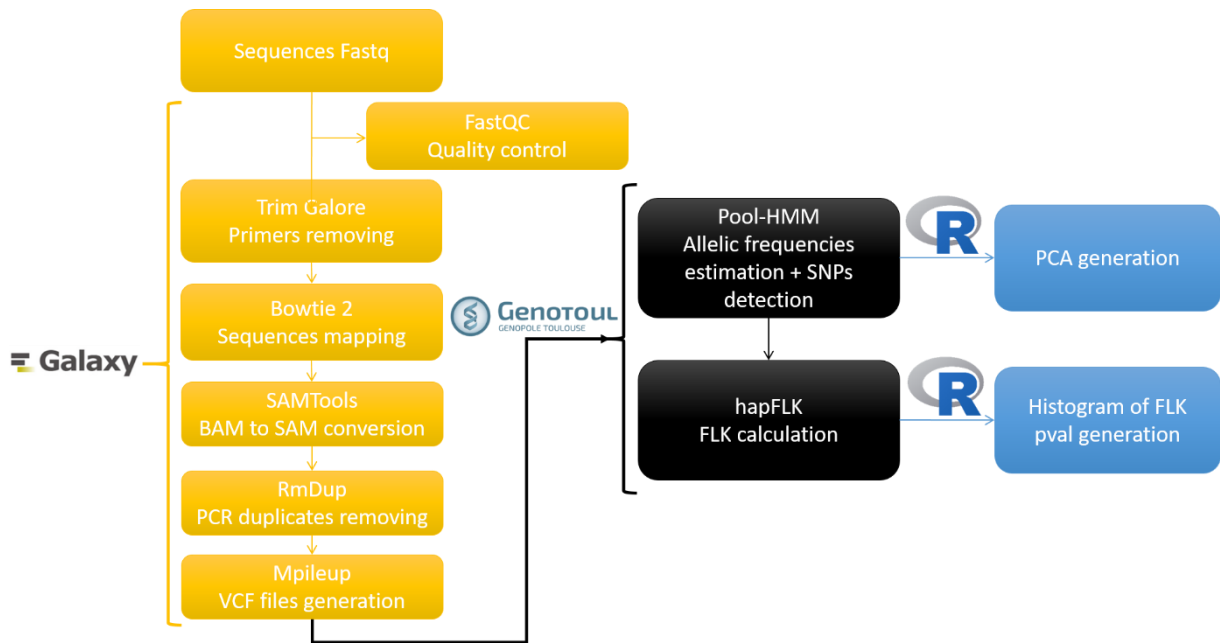


1313

Supplementary file 1, figure 5: Bioinformatics pipeline for transcriptomic analysis

1314 First analysis on sequences were made on Galaxy software. Differential genes expression levels were used
 1315 for functional annotation and enrichment analysis with RGOA.
 Clustering of biological enriched processes was made with MeV.
 Differentially expressed genes for biological processes of interest were sorted.

1316



1317

1318 **Supplementary file 1, figure 6: Bioinformatics pipeline for genetic analysis**

1319 First analysis on sequences were made on Galaxy software. VCF files were imported on Genotoul server and
 1320 used for allelic frequencies estimation and SNPs detection between conditions and generations from which
 1321 FLK indices were calculated.

1322 PCA and histogram of FLK pval distribution were generated with R software.

1321

1322

1323

1324

1325

1326

1327

1328

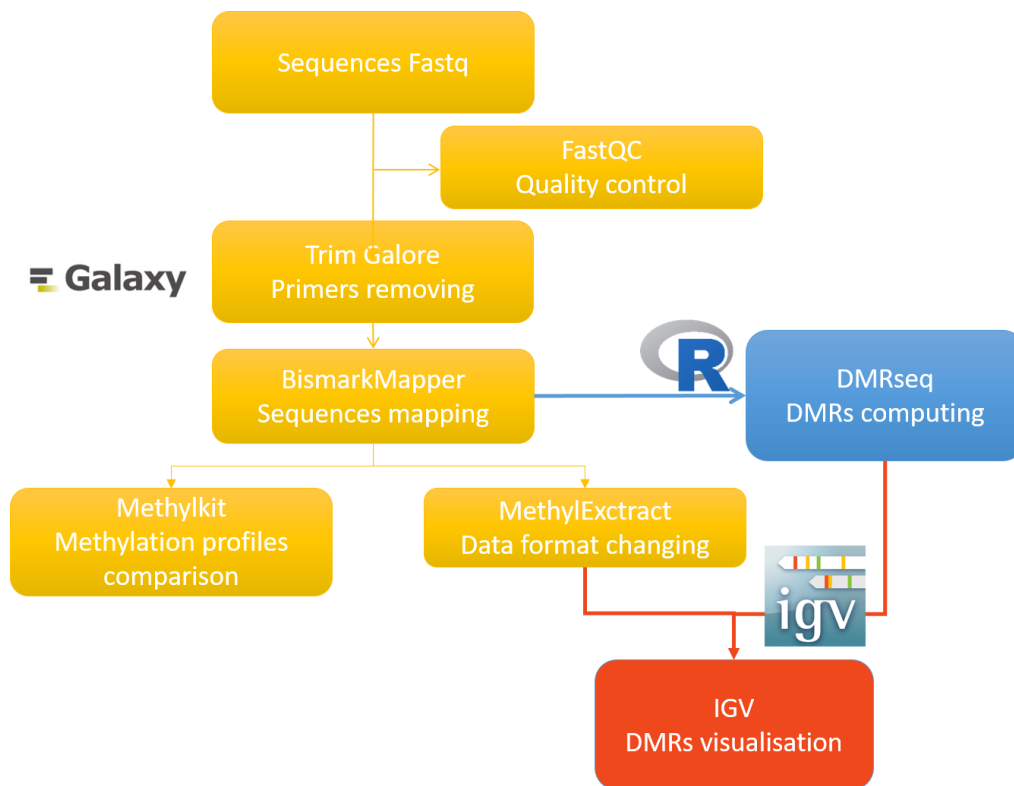
1329

1330

1331

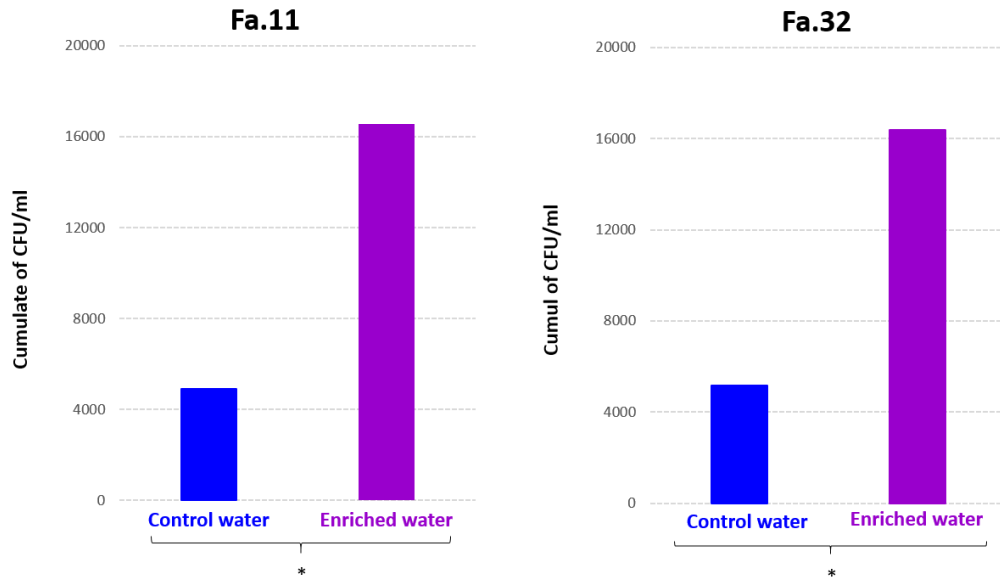
1332

1333



1334 **Supplementary file 1, figure 7: Bioinformatics pipeline for BS-seq analysis**

1335 First analysis on sequences were made on Galaxy software. Aligned sequences were used for global methylation
 profiles comparison with Methylkit. Aligned sequences were also imported on R for DMRs computing with
 DMRseq. Both mapping sequences and DMRs were visualized on IGV.



1336

Supplementary file 1, figure 8: Cultivable water microbiota from tanks.

1337

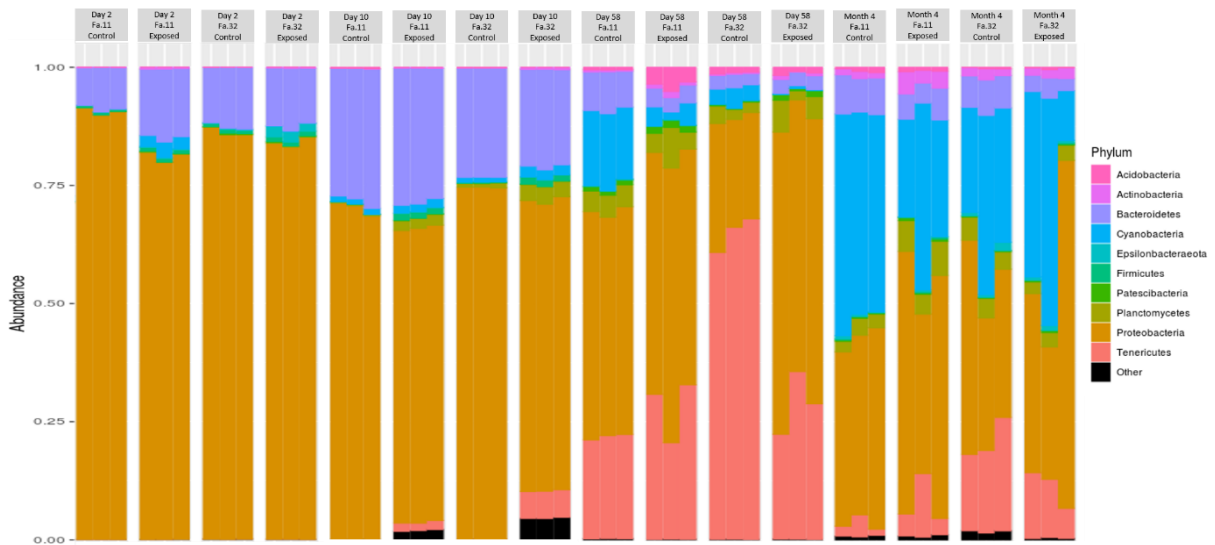
Bar graph of cumulated CFU by mL from water sampled at day 10 in the three tanks used per treatment: microorganisms enriched water (purple) control water (blue).

1338

* represent a significant statistical difference in the exposed compared to the control condition i.e: Wilcoxon test, $p < 0,05$.

1339

1340



1341

1342

1343

1344

1345

1346

1347

1348

1349

Supplementary file 1, figure 9: Relative phylum composition of microbiota in F1 samples.

1350

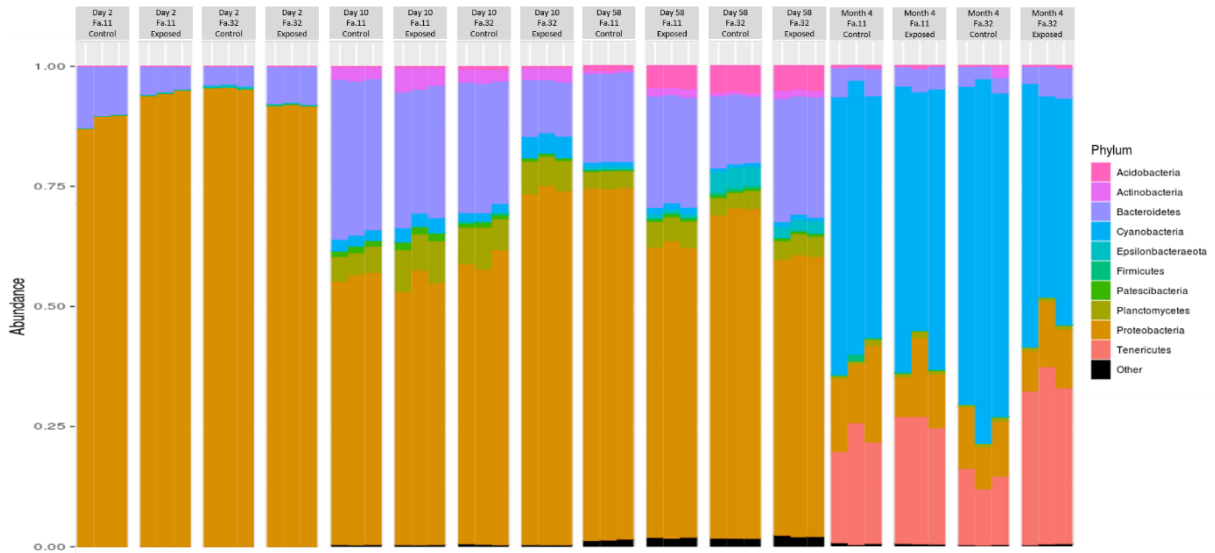
Bar graph of the 12 phylum that are the most represented in samples' microbiota. Each color represents a phylum. Each sample has three replicates. This analysis has been performed on microbiota sampled during the development to juvenile's stages (Day 2, Day 10, Day 58, 4 months) on Fa.11 and Fa.32.

1351

1352

1353

1354



1355

1356

1357

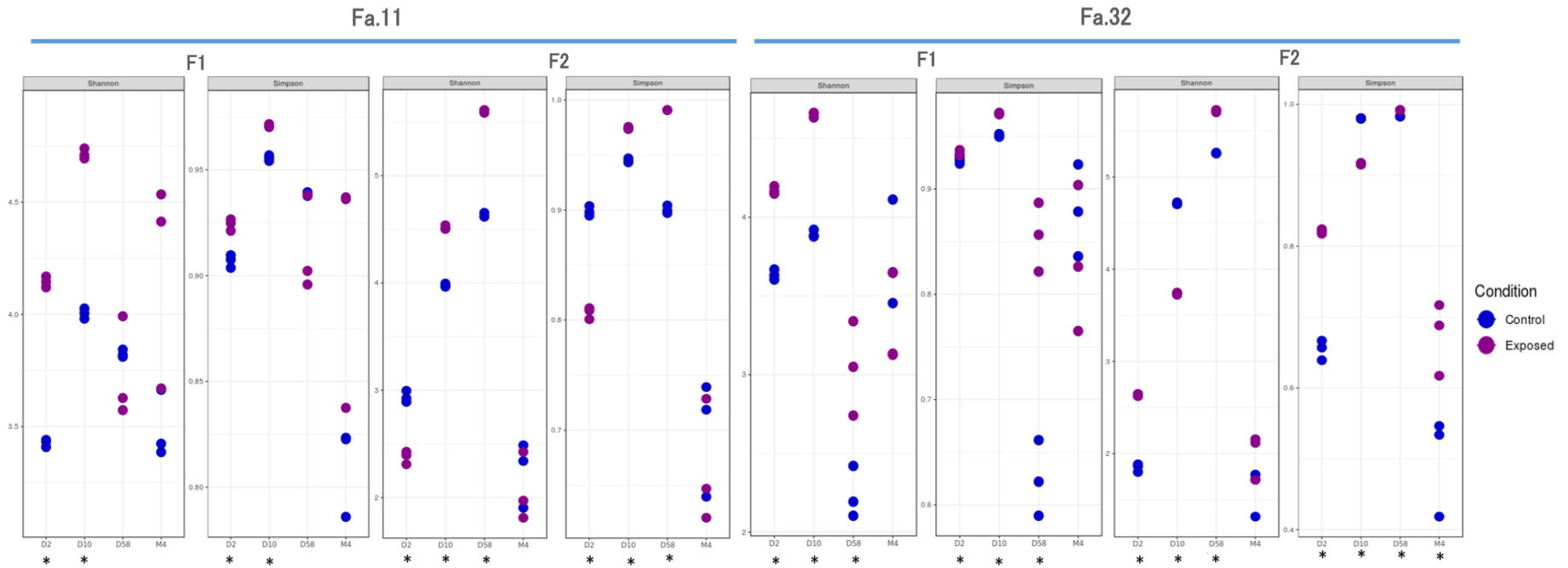
Supplementary file 1, figure 10: Relative phylum composition of microbiota in F2 samples.

Bar graph of the 12 phylum that are the most represented in samples' microbiota. Each color represents a phylum. Each sample has three replicates. This analysis has been performed on microbiota sampled during the development to juveniles stages (Day 2, Day 10, Day 58, 4 months) on Fa.11 and Fa.32.

1358

1359

1360



1361

1362

1363

1364

1365

1366

1367

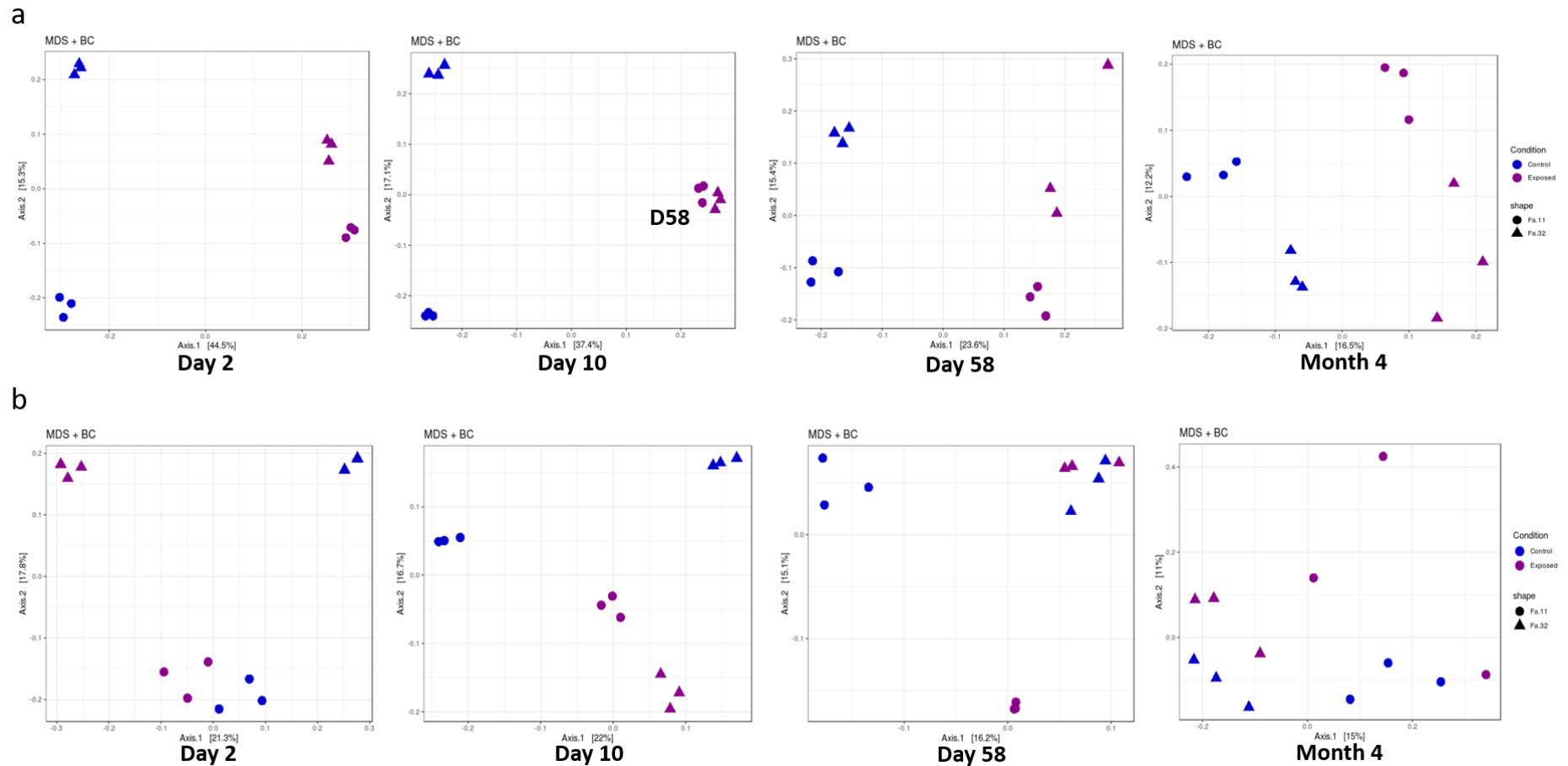
1368

Supplementary file 1, Figure 11: Alpha diversity based on 16S barcoding analysis performed on microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters of the F1 and F2 generations

Shannon and Simpson indices (y-axis) have been determined for the microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters during their development to juvenile's stages, at day 2, 10, 58 and 4 months after fertilisation (D2, D10, D58, 4 months on x-axis) for both generations (F1 and F2). Oysters were exposed to a microorganisms enriched water at the F1 generation (Purple bars), or oysters were raised in control condition at the F1 (Blue bars). * represent a statistically different index in the exposed compared to the control condition i.e: ANOVA, $p < 0,05$ or Kruskal test $p < 0,05$.

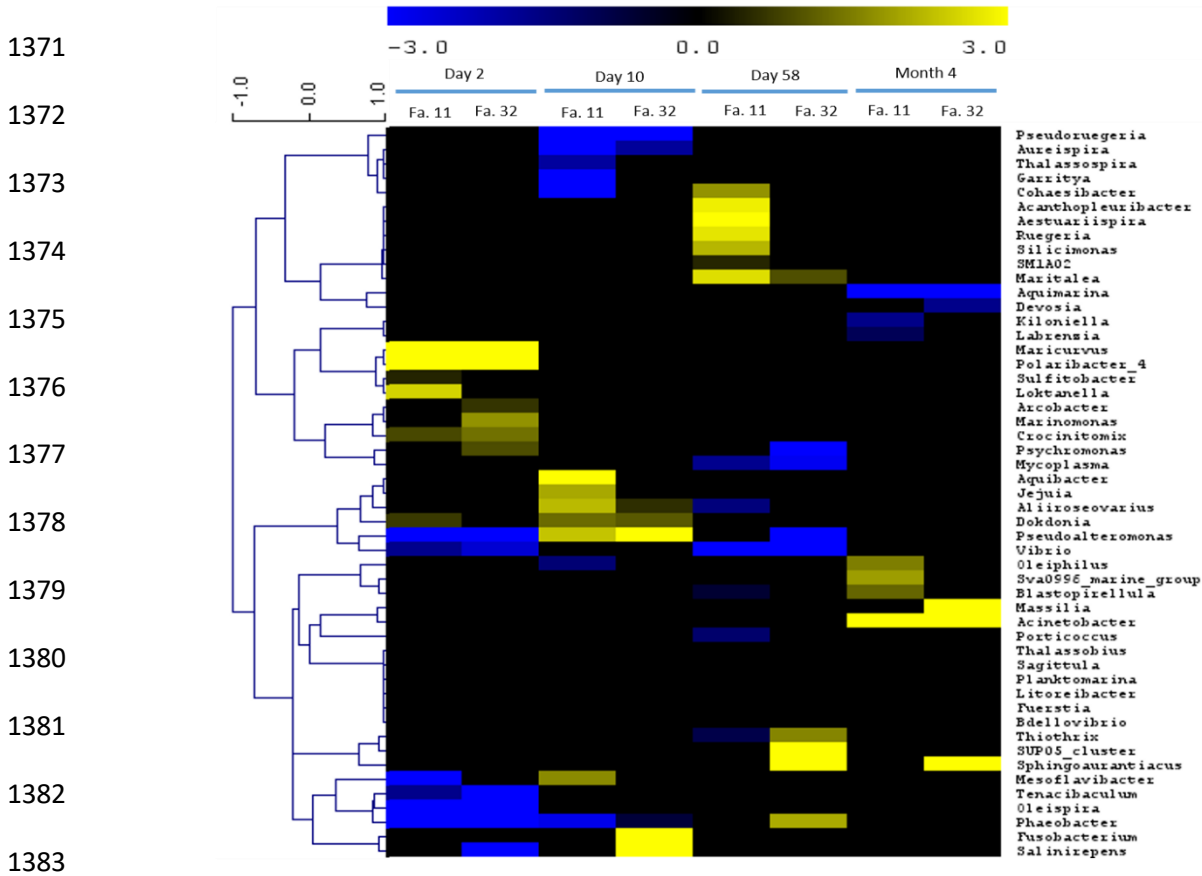
1369

1370



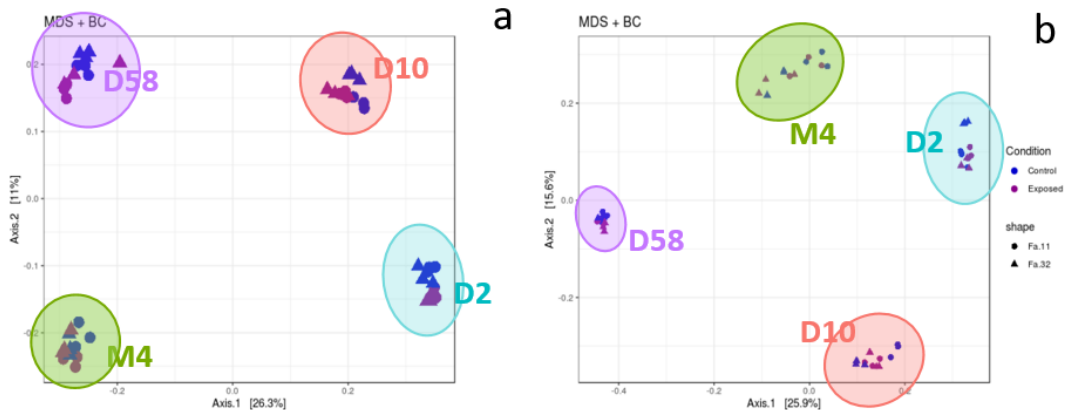
Supplementary file 1, Figure 12: PCA of Bray-Curtis index based on 16S barcoding analysis performed on microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters, with a separation of developmental time

The bacterial diversity of oyster microbiota was analysed by PCA, each developmental time separately. The analysis was performed on oysters sampled during the development to juveniles stages at day 2, 10, 58 and month 4 (M4) after fertilisation in Fa.11 (square) and Fa.32 (triangle) and for generation F1 (a) and F2 (b). Oysters were exposed to a microorganisms enriched water (purple dots) at the F1 generation, or oysters were raised in control condition (Blue dots). For the F1 generation, differences between conditions are significant for each time: multivariate homogeneity of group dispersions, day 2: $p = 0,007$, day 10: $p = 0,003$, day 58: $p = 0,005$ and month 4: $p = 0,005$. For the F2 generation, differences between conditions are significant only for day 58: multivariate homogeneity of group dispersions, day 58: $p = 0,008$ where the difference is due to Fa.11, pairwise comparison between families $p = 0,008$.



Supplementary file 1, Figure 13: Differential analysis of bacterial proportion in oyster exposed to microorganism enriched water versus control

Heatmap realized on Log2FC for the genus presents at more than 3% of total, obtained after DE-Seq comparison of bacterial proportion in oyster exposed to microorganism enriched water versus oyster exposed to control water. Each point represents a bacterial genus (y-axis) which has a proportion statistically significantly enriched (yellow) or depleted (blue) in the oyster exposed to microorganism enriched water versus control oyster. If there is no significant difference, heatmap is colored in black. This analysis has been realized for Fa.11 and Fa.32 during the development to juvenile stages (Day 2, Day 10, Day 58, Month 4) (x-axis) on the F1 generation.



Supplementary file 1, Figure 14: PCA of Bray-Curtis index based on 16S barcoding analysis performed on microbiota of Fa.11 and Fa.32 oysters

The bacterial diversity of oyster microbiota was analysed by PCA for all the developmental time. The analysis was performed on oysters sampled during the development to juvenile's stages, at day 2 (D2), 10 (D10), 58 (D58) and month 4 (M4) after fertilisation in Fa.11 (square) and Fa.32 (triangle) and for generation F1 (a) and F2 (b). Oysters were exposed to a microorganisms enriched water (purple dots) at the F1 generation, or oysters were raised in control condition (Blue dots). For the F1 and F2 generation, differences between developmental time is significant: multivariate homogeneity of group dispersions: $p = 0,001$, pairwise comparison for each: $p = 0,006$.

1398

Experimental infection

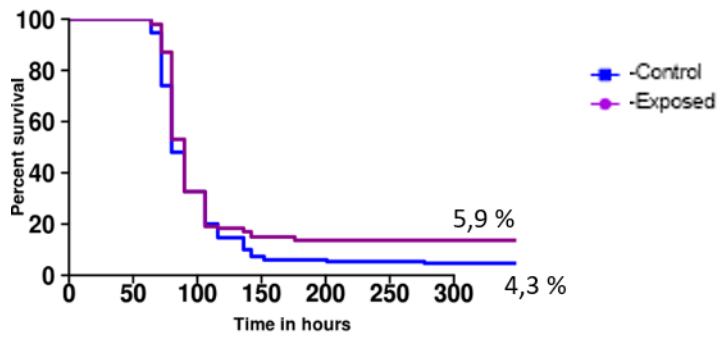
1399

1400

1401

1402

1403



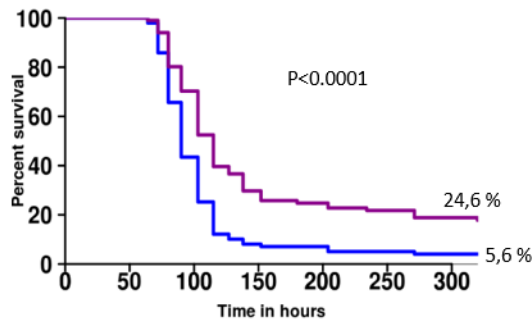
1404

1405

1406

1407

1408



1409

Supplementary file 1, Figure 15: Survival curves on F2 during second experimental infection.

1410

Survival curves realised according to mortality record of oysters during experimental infection (in hours), exposed (purple line) and control (blue line) for generation F2) for Fa.11 and Fa.32. Pval of log-rank test and final survival percentage for each condition are indicated on each graph.

1411

1412

Experimental infection

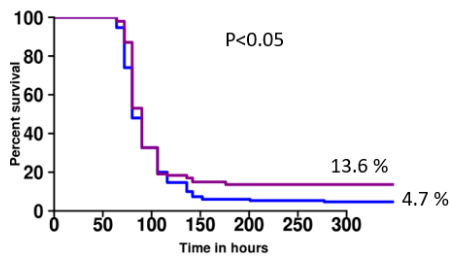
1413

1414

1415

1416

F11



1417

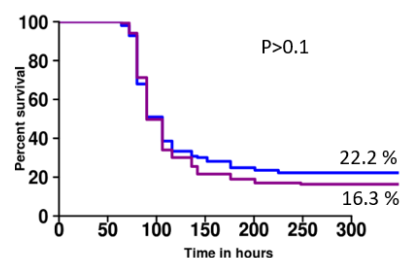
1418

1419

1420

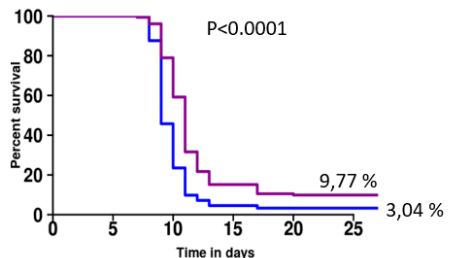
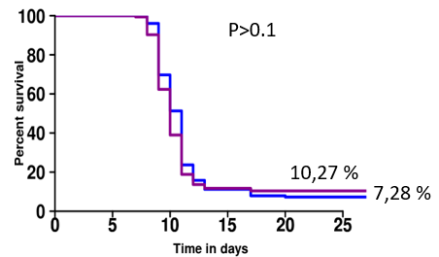
1421

F32



1422

Field



Supplementary file 1, Figure 16: Survival curves on F3 during disease induction.

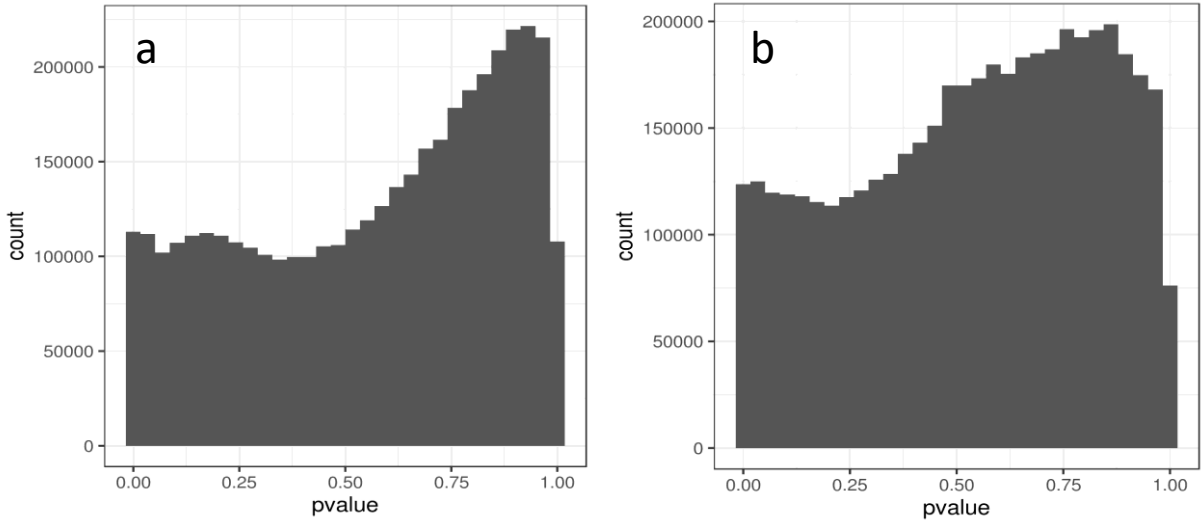
1423

Survival curves realised according to mortality record of oysters during experimental infection (in hours) or recorded in the field during POMS disease outbreak for Fa.11 and Fa.32, exposed (purple line) and control (blue line) condition for generation F3. Pval of log-rank test and final survival percentage for each condition are indicated on each graph.

1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450

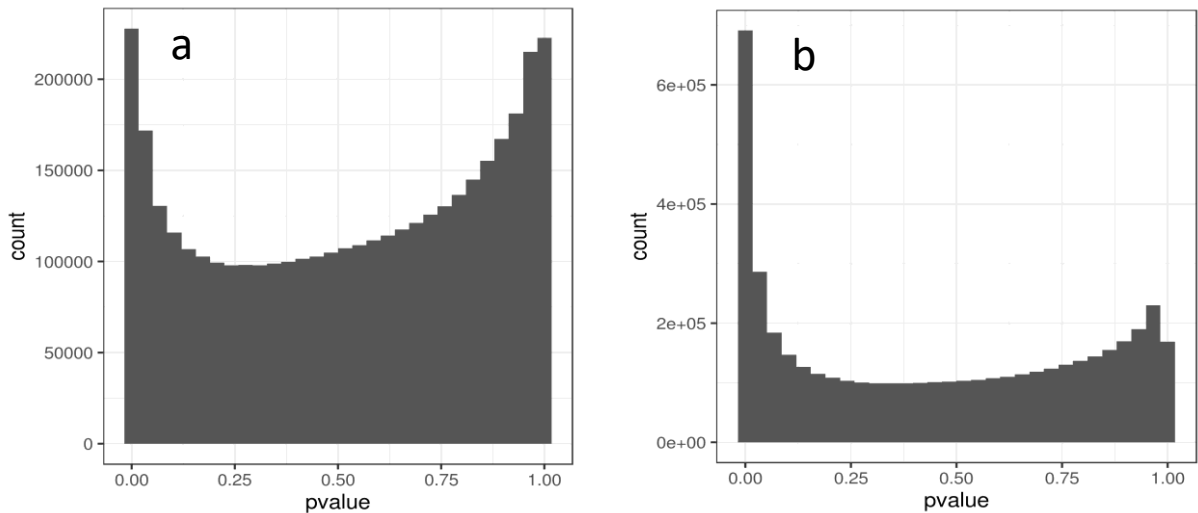
Supplementary file 1, Figure 17: Histogram of p.-values for FLK between exposed and control oyster for generations F0 and F1.

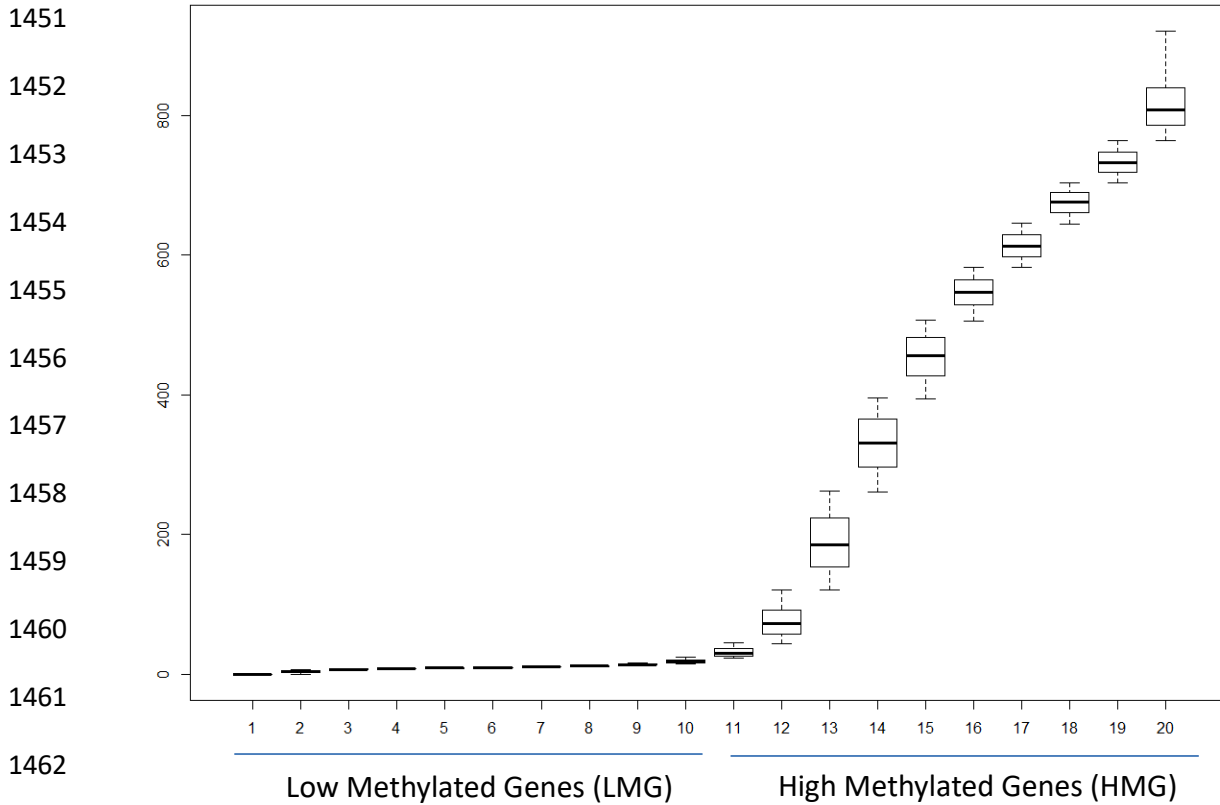
Flk test was performed on generation F0 and F1 and pvalues were plotted with R software for both families (a) Fa.11 and (b) Fa.32. In the case of genetic selection on some SNPs, we expect a pic of low pvalues. Here no pic of low pvalues is detectable revealing an absence of genetic selection.



Supplementary file 1, Figure 18: Histogram of p.-values for FLK between exposed and control oyster for all generations.

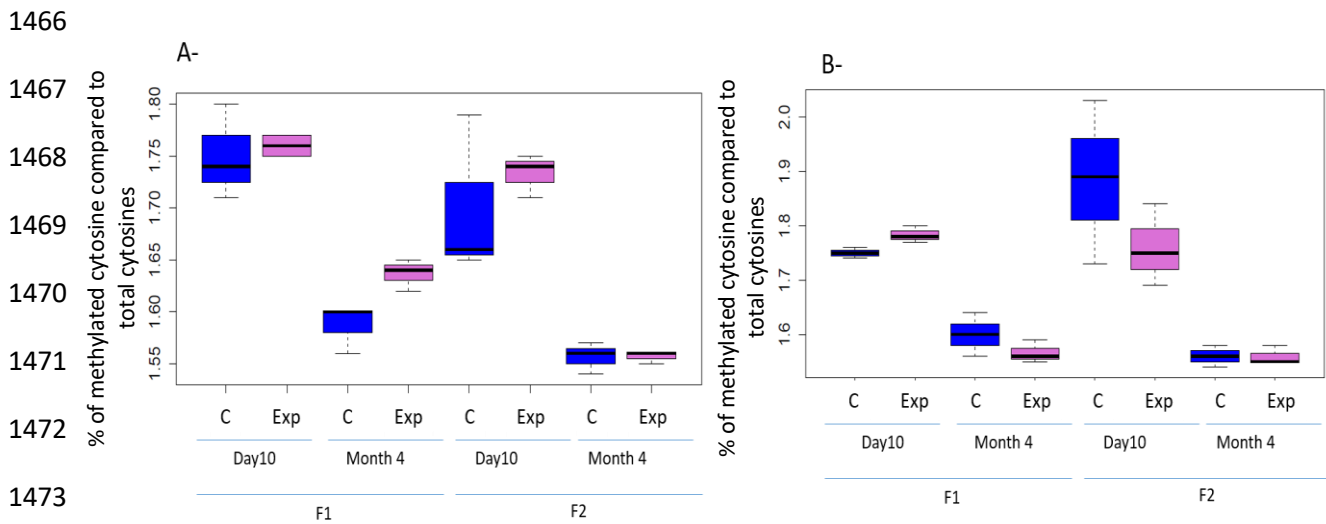
Flk test was performed on generation F0, F1, F2 and F3 and pvalues were plotted with R software for both families (a) Fa.11 and (b) Fa.32. Some SNPs are under genetic selection.





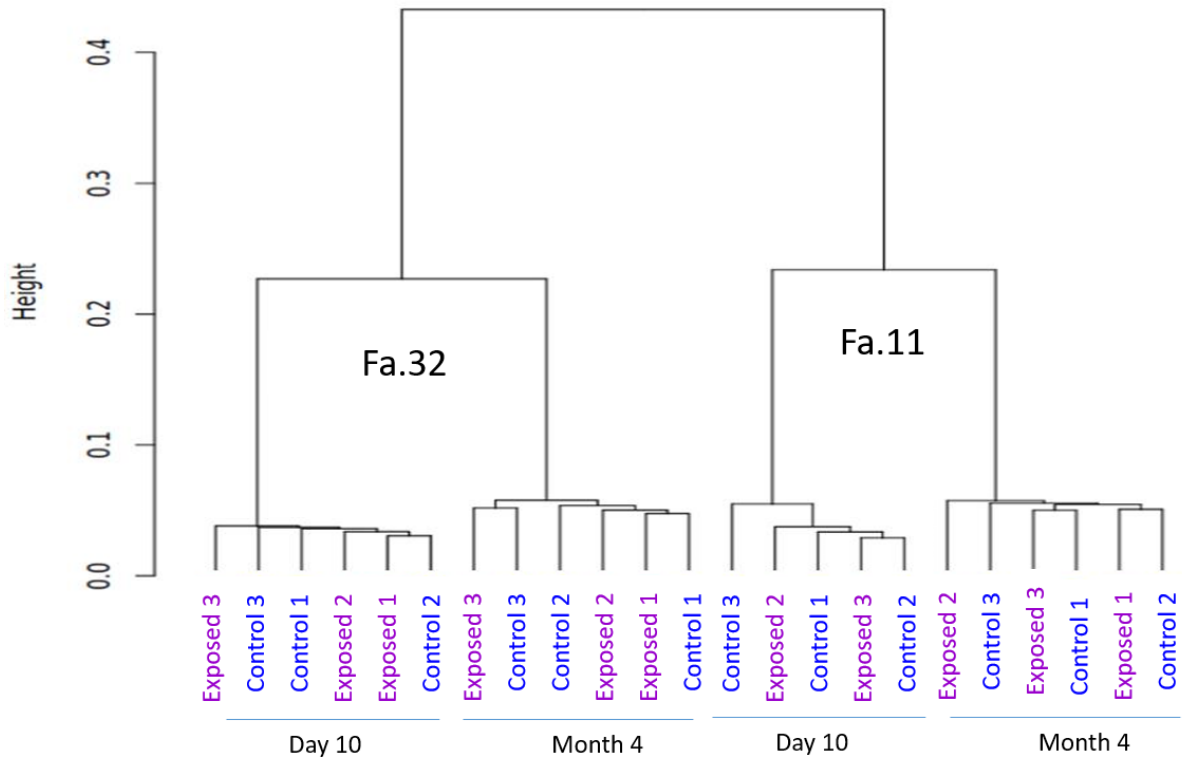
Supplementary file 1, figure 19: The classification of genes according to level of methylation

All the 28 027 genes from the V9 reference annotation were ordered by level of methylation (mean methylation per gene), and classified in twenty level of methylation, each level containing 1 402 genes, except for the last level which contains 1 389 genes since 28 027 is not a multiple of 20. This boxplot was obtained for the dataset for Fa.11 Month 4 of the F2 generation, control condition.



Supplementary file 1, Figure 20:

% of Cytosine methylation compared to all cytosines at day10 and month 4 for each condition Control (C, blue) and Exposed (Exp, pink) of generation F1 and F2 for Fa.11 (A) and Fa.32 (B). Each boxplot represents the percentage of cytosine methylation of 3 biological replicates. Statistical differences between conditions were tested with Wilcoxon-test, no significant difference was found (Fa.11: F1 day 10, $p = 0.8$; month 4, $p = 0.07$; F2 day 10, $p = 0.7$; month 4, $p = 1$ and Fa.32: F1 day 10, $p = 0.1$; month 4, $p = 0.27$ and F2 day 10, $p = 0.4$; month 4, $p = 1$).



1478

1479 **Supplementary file 1, Figure 21:**

1480 Cytosine methylation pattern clustering of the different samples is based on the Ward's method and was performed with
 1481 Methykit (Alkalin et al, 2012). The clustering has been performed based on cytosine methylation level obtained on the data
 1482 of day10 and month 4 for each condition Control (C, blue) and Exposed (Exp, pink) of generation F1 for Fa.11 (A) and Fa.32
 1483 (B).

1481

1482

1483

1484

1485

1486

1487

1488

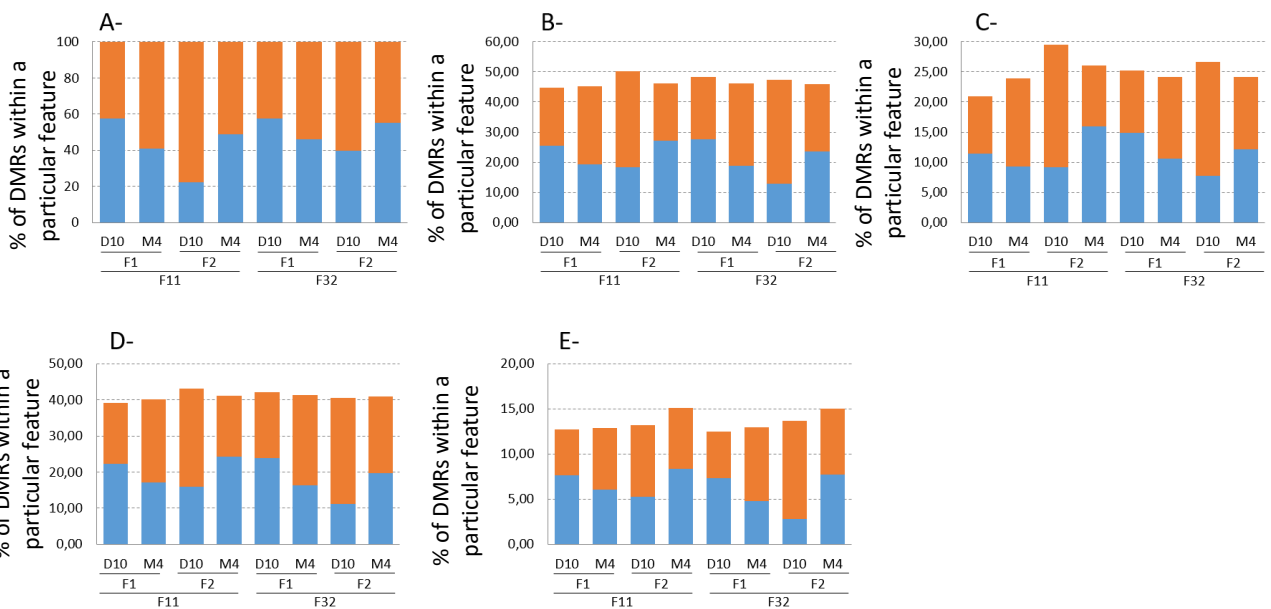
1489

1490

1491

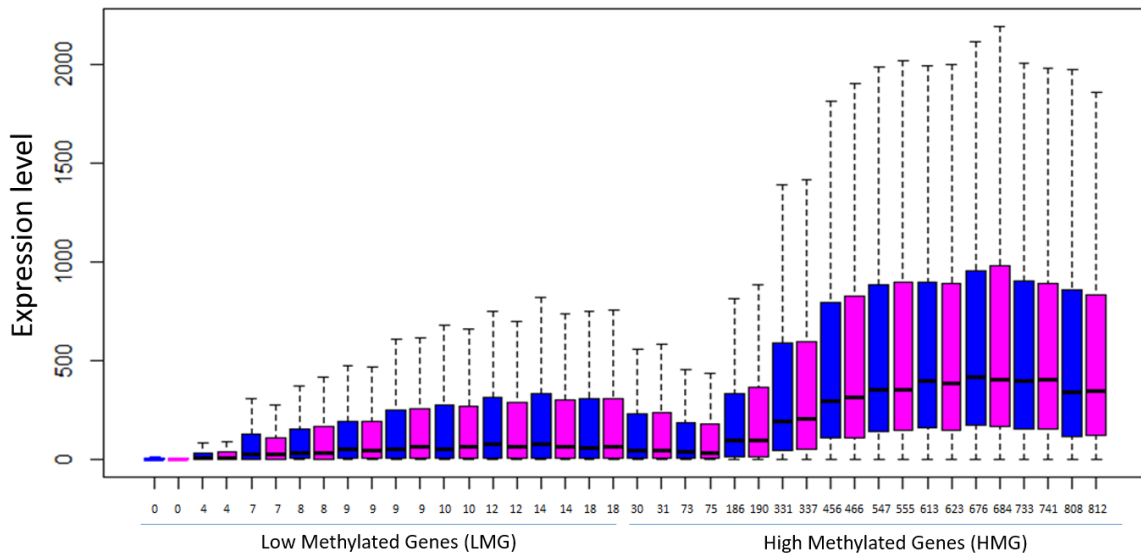
1492

1493



Supplementary file 1, figure 22: DMRs repartition

DMRs were intersected with different genome features according to the annotation of the *C. gigas* reference genome V9 (Zhang et al, 2012). The hypermethylated (blue) and hypomethylated (orange) were assigned to the different features: all genome (A), genes (B), exon (C), intron (D), promoters (E) for the following time point: Day 10 (D4) and month 4 (M4), of the F1 and F2 generation of Fa.11 and Fa.32. Y-axis represents the number of DMRs which falls into a particular feature compared to total DMRs (expressed as a %). For DMRs which overlap two different features, it is counted for both concerned features.



1494

Supplementary file 1 figure 23: The repartition of expression level according to level of methylation

1495

The expression level (y-axis) for all the genes within each of the twenty categories of methylation level was plotted according to increasing methylation level (x-axis, median methylation is indicated for each boxplot). This boxplot was obtained for the dataset of Fa.11 Month 4 of the F2 generation, for control condition (blue) and exposed condition (pink). Each boxplot contains 1402 genes, except for the last level which contains 1389 genes since 28027 (total amount of genes) is not a multiple of 20.

1496

1497

1498

1499

Supplementary file 1, table 1: Number of genitors (males and females) by generation and family and corresponding fecundation rate.

1500

Generation - Family	Numbers of genitors (males/ females)	Fecundation rate
F1 – Fa.11	39/61	95
F1 – Fa.32	20/80	75
F2 – Fa.11 – Exposed	37/42	95
F2 – Fa.11 – Control	32/46	95
F2 – Fa.32 – Exposed	27/53	98
F2 – Fa.32 – Control	29/50	96
F3 – Fa.11 – Exposed	16/64	95
F3 – Fa.11 – Control	12/66	95
F3 – Fa.32 – Exposed	32/45	90
F3 – Fa.32 – Control	31/39	75

1501

1502

1503

1504

1505

1506

Supplementary file 1, table 2: Sampling during the 3 generation experiment.

Sampling was performed in the same manner for both Fa.11 and Fa.32 during 3 generations in order to perform RNA-Seq, barcoding, genetic and epigenetic analysis. Samples were collected during the larval to juveniles' development (time point indicated in days, Day 0 represents the day of gamete fertilisation) or during experimental disease induction (time point indicated in Hours, Hours 0 represents the time when the donor of pathogens were introduced into the tanks to transmit the disease to the recipient oysters). Disease induction was performed on 4 months' juvenile oysters. For oysters which were sampled during larval stages (day 2 and day 10), each sampling point contains 3 pools of 10000 to 20000 larvae. For oysters which were sampled during juvenile's stages (day 35, day 58 and month 4 (H0, 3, 6, 12 and 24), each sampling points contains 3 pools of 10 oysters.)

Generation	Molecular analysis	Developmental times point (Days)	Experimental disease time point (Hour)
F1	RNA-seq	D2/D10/D35	H0 (Month 4)
	Barcoding	D2/D10/D58	H0 (Month 4)/H6/H12/H24/H48
	Genetic	Gametes from F0	H0 (Month 4)
	BS-seq	D10	H0 (Month 4)
F2	RNA-seq	D10	H0(Month 4)/H3/H6/H12/H24
	Barcoding	D2/D10/D58	H0/H6/H12/H24/H48
	Genetic		H0 (Month 4)
	BS-seq	D10	H0 (Month 4)
F3	Genetic		H0 (Month 4)

Supplementary file 1, table 3: Fertilisation success and survival rate during the oyster development

The number of larvae was counted during the development (Day 2, 27 and month 4) and the survival rate was calculated compared to total number of fertilised gametes introduced in each pipes for Fa. 11 (a) and Fa.32 (b). The mean and standard deviation of the survival rate in the three pipes for each condition are indicated. No statistically different survival rates were recorded between exposed and control oysters whatever the developmental time point, the family and the generation. Note that for some points only one count could be performed since all the oyster were gathered into a unique tank.

a.

		Day 0	Day 2	Day 27	Month 4
F0		100.0	67.4	48.5	
F1	Control	95.0	58.5 ± 10.6	3.6 ± 0.6	3.1
	Exposed	95.0	61.2 ± 7.9	2.8 ± 1.1	2.8
F2	Control	95.0	38.5 ± 2.3	0.2	0.2
	Exposed	95.0	42.5 ± 13.2	0.7	0.7
F3	Control	95.0	54.2 ± 2.9	0.6	0.4
	Exposed	95.0	50.4 ± 5.8	0.6	0.4

b.

		Day 0	Day 2	Day 27	Month 4
F0		100.0	57.9 ± 0	27.2 ± 0	
F1	Control	70.0	58.2 ± 4.8	2.1 ± 0.8	2.1
	Exposed	70.0	54.7 ± 5.7	4.6 ± 1.7	2.8
F2	Control	95.0	30.1 ± 6.1	0.3 ± 0	0.2
	Exposed	95.0	47.1 ± 5.0	0.1 ± 0	0.1

Supplementary file 1, table 4: Experimental and field infection information

- 1525 a. Information about recipient’s oysters for each experimental disease induction. The column “Age” represents the
 1526 age of oysters at the beginning of disease induction (DI). The same number of oysters were used for each family
 1527 and each condition.
 1528 b. Information about donor oysters for each experimental disease induction.
 1529 c. Information about oysters used on the field. The same number of oysters were used for each family and each
 1530 condition.
 1531

1532 a.

Generation	Number of recipients oysters by family and condition	Weight	Start DI	End DI	Age
	Mortalities monitoring	Sampling			
F1 (2016)	200*2	400	1400g	04/07/2016	+421h Day 111
F2 (2017)	100*2	320	1000g	05/07/2017	+320h Day 97
F3 (2018)	100*2	300	1100g	10/07/2018	+348h Day 100

1533

1534 b.

1535

Origin	Cohort number	Total weight
SI	01/2016	1800g
NSI	02/2017	1800g
NSI	02/2018	1690g

c.

Generation	Number of oysters
F1 (2016)	200*2
F2 (2017)	100*2
F3 2018	150*2

1542

1543 **Supplementary file 1, table 5: Quality of metrics of RNA-seq analysis**

Generation	Family	Time	Condition	Replicate	Sequenced reads	Mapped reads	Percentage of mapped reads
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	1	14 460 644	8 987 574	62.15%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	2	11 912 917	7 397 422	62.10%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	3	16 450 994	10 141 798	61.65%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	1	19 916 020	12 280 039	61.66%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	2	28 138 518	17 558 823	62.40%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	3	28 442 560	17 727 482	62.33%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	1	12 495 219	8 959 137	71.70%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	2	15 133 060	10 913 904	72.12%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	3	12 659 883	9 153 955	72.31%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	1	10 633 674	7 762 906	73.00%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	2	16 112 212	11 803 387	73.26%

F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	3	9 297 293	6 652 826	71.56%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	1	61 944 009	39 195 474	63.28%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	2	51 852 367	32 904 811	63.46%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	3	29 823 705	18 927 821	63.47%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	1	20 041 467	12 753 464	63.64%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	2	23 665 915	15 169 852	64.10%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	3	59 574 067	38 264 354	64.23%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	1	17 745 580	13 051 872	73.55%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	2	12 802 405	9 417 375	73.56%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	3	87 523 406	64 114 596	73.25%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	1	9 322 172	6 881 515	73.82%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	2	14 176 008	8 800 738	62.08%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	3	33 515 831	24 710 696	73.73%
F2	Fa.11	H3	Control	1	18 314 395	39 195 474	63.28%
F2	Fa.11	H3	Control	2	15 981 227	32 904 811	63.46%
F2	Fa.11	H3	Control	3	18 860 783	18 927 821	63.47%
F2	Fa.11	H3	Exposed	1	35 462 018	22 520 175	63.51%
F2	Fa.11	H3	Exposed	2	28 740 277	18 317 066	63.73%
F2	Fa.11	H3	Exposed	3	15 980 907	10 052 569	62.90%
F2	Fa.32	H3	Control	1	44 426 116	32 863 521	73.97%
F2	Fa.32	H3	Control	2	47 361 250	34 812 458	73.50%
F2	Fa.32	H3	Control	3	42 889 358	31 365 720	73.13%
F2	Fa.32	H3	Exposed	1	13 531 682	9 994 514	73.86%
F2	Fa.32	H3	Exposed	2	37 941 227	28 051 919	73.94%
F2	Fa.32	H3	Exposed	3	78 705 302	58 404 014	74.21%
F2	Fa.11	H6	Control	1	19 128 734	12 190 675	63.73%
F2	Fa.11	H6	Control	2	34 829 650	22 426 093	64.39%
F2	Fa.11	H6	Control	3	35 911 565	22 967 528	63.96%
F2	Fa.11	H6	Exposed	1	23 676 860	14 977 924	63.26%
F2	Fa.11	H6	Exposed	2	28 922 238	18 411 881	63.66%
F2	Fa.11	H6	Exposed	3	20 865 211	13 143 934	62.66%
F2	Fa.32	H6	Control	1	27 372 649	19 932 481	72.82%
F2	Fa.32	H6	Control	2	19 977 137	14 602 466	73.10%
F2	Fa.32	H6	Control	3	15 077 056	10 900 260	72.30%
F2	Fa.32	H6	Exposed	1	41 327 741	30 447 536	73.67%
F2	Fa.32	H6	Exposed	2	48 677 945	35 895 040	73.74%
F2	Fa.32	H6	Exposed	3	15 144 507	11 192 723	73.91%
F2	Fa.11	H12	Control	1	84 689 518	53 394 734	63.05%
F2	Fa.11	H12	Control	2	44 152 054	27 919 643	63.24%
F2	Fa.11	H12	Control	3	18 155 497	11 461 229	63.13%
F2	Fa.11	H12	Exposed	1	26 834 467	16 805 289	62.63%
F2	Fa.11	H12	Exposed	2	16 843 047	10 595 194	62.91%
F2	Fa.11	H12	Exposed	3	54 299 133	34 034 463	62.68%
F2	Fa.32	H12	Control	1	16 177 627	11 872 491	73.39%
F2	Fa.32	H12	Control	2	42 568 957	31 122 695	73.11%
F2	Fa.32	H12	Control	3	22 347 431	16 163 872	72.33%
F2	Fa.32	H12	Exposed	1	13 657 254	9 958 728	72.92%
F2	Fa.32	H12	Exposed	2	27 569 601	20 134 422	73.03%
F2	Fa.32	H12	Exposed	3	16 843 263	12 269 769	72.85%
F2	Fa.11	H24	Control	1	17 890 160	10 871 988	60.77%

F2	Fa.11	H24	Control	2	17 107 155	10 576 226	61.82%
F2	Fa.11	H24	Control	3	18 660 266	11 039 357	59.16%
F2	Fa.11	H24	Exposed	1	12 751 414	7 725 988	60.59%
F2	Fa.11	H24	Exposed	2	11 706 215	7 011 398	59.89%
F2	Fa.11	H24	Exposed	3	13 229 752	8 006 811	60.52%
F2	Fa.32	H24	Control	1	21 146 534	14 305 117	67.65%
F2	Fa.32	H24	Control	2	35 228 459	22 170 836	62.93%
F2	Fa.32	H24	Control	3	13 429 811	8 770 123	65.30%
F2	Fa.32	H24	Exposed	1	12 055 218	8 436 190	69.98%
F2	Fa.32	H24	Exposed	2	50 966 971	36 127 736	70.88%
F2	Fa.32	H24	Exposed	3	47 363 464	33 201 686	70.10%

1544

1545 **Supplementary file 1, table 6: Quality of metrics of genomic analysis.**

Generation	Family	Time	Condition	Sequenced reads	Mapped reads	Percentage of mapped reads
F0	Fa.11	Gamètes	Male	104 221 892	79 708 903	76.48%
F0	Fa.32	Gamètes	Male	113 498 958	86 985 601	76.64%
F0	Fa.11	Gamètes	Female	162 586 578	123 565 799	76.00%
F0	Fa.32	Gamètes	Female	124 922 484	94 941 088	76.00%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	101 601 678	78 019 929	76.79%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	108 649 880	83 595 218	76.94%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	93 684 366	72 071 383	76.93%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	122 907 874	94 331 793	76.75%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	94 305 277	72 162 398	76.52%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	127 025 362	97 504 668	76.76%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	106 822 425	81 644 379	76.43%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	124 610 92	95 726 110	76.82%
F3	Fa.11	H0 (month 4)	Control	114 026 263	87 674 794	76.89%
F3	Fa.32	H0 (month 4)	Control	82 052 208	63 106 353	76.91%
F3	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	125 441 243	96 552 125	76.97%
F3	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	110 256 421	84 368 213	76.52%

1546

1547 **Supplementary file 1, table 7: Quality of metrics of BS-seq analysis**

1548 WG-BS was performed on gDNA extracted from osyters samples at Day 10 and month 4 (Hour 0 of
 1549 experimental disease) for both Fa.11 and Fa.32 of generation F1 and F2. Data was trimmed using
 1550 trimm galore and aligned with bismark against the C. gigas reference genome V9 (Zhang et al, 2012).

1551

Generation	Family	Time	Condition	Replicate	Raw reads	Trimmed reads	Mapped reads	% of mapped reads
F1	Fa.11	Day 10	Control	1	116 690 127	116 528 302	42 661 489	36.6%
F1	Fa.11	Day 10	Control	2	132 655 871	132 457 628	46 442 341	35.1%
F1	Fa.11	Day 10	Control	3	67 367 660	67 282 879	23 749 449	35.3%
F1	Fa.11	Day 10	Exposed	1	128 959 477	128 895 150	40 073 860	31.1%
F1	Fa.11	Day 10	Exposed	2	102 699 990	102 581 825	36 470 754	35.6%
F1	Fa.11	Day 10	Exposed	3	148 046 003	147 892 433	52 332 994	35.4%
F1	Fa.32	Day 10	Control	1	113 392 336	113 119 552	40 128 213	35.5%
F1	Fa.32	Day 10	Control	2	133 638 983	133 438 344	48 991 011	36.7%
F1	Fa.32	Day 10	Control	3	116 210 679	116 005 341	41 199 047	35.5%
F1	Fa.32	Day 10	Exposed	1	144 817 285	144 508 389	50 925 416	35.2%
F1	Fa.32	Day 10	Exposed	2	119 899 706	119 686 670	42 695 852	35.7%
F1	Fa.32	Day 10	Exposed	3	112 925 305	112 735 090	40 240 209	35.7%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	1	136 628 893	136 449 135	46 700 460	34.2%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	2	135 069 615	134 901 317	45 677 428	33.9%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Control	3	111 216 323	111 075 370	36 840 743	33.2%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	1	161 150 656	160 939 521	48 572 364	30.2%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	2	134 060 619	133 899 029	42 724 139	31.9%
F1	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	3	115 692 466	115 522 882	39 490 608	34.2%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	1	133 994 954	133 866 136	46 797 523	35%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	2	128 257 406	128 123 951	39 625 982	30.9%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Control	3	126 703 617	126 593 595	43 932 360	34.7%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	1	135 868 263	135 771 360	46 023 500	33.9%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	2	107 125 342	107 046 744	38 081 960	35.6%
F1	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	3	108 211 411	108 123 642	37 728 030	34.9%
F2	Fa.11	Day 10	Control	1	123 006 454	122 923 319	42 854 887	34.9%
F2	Fa.11	Day 10	Control	2	135 080 888	134 993 097	47 974 052	35.5%

F2	Fa.11	Day 10	Control	3	100 463 832	100 375 232	31 391 366	31.3%
F2	Fa.11	Day 10	Exposed	1	118 049 507	117 951 640	38 830 639	32.9%
F2	Fa.11	Day 10	Exposed	2	120 706 101	120 616 075	39 426 360	32.7%
F2	Fa.11	Day 10	Exposed	3	119 052 425	118 957 318	39 067 325	32.8%
F2	Fa.32	Day 10	Control	1	123 260 878	123 191 655	39 931 171	32.4%
F2	Fa.32	Day 10	Control	2	124 295 652	124 206 719	41 996 653	33.8%
F2	Fa.32	Day 10	Control	3	123 037 919	122 968 247	37 426 816	30.4%
F2	Fa.32	Day 10	Exposed	1	117 801 444	117 701 603	40 900 247	34.7%
F2	Fa.32	Day 10	Exposed	2	122 926 232	122 800 280	41 942 113	34.2%
F2	Fa.32	Day 10	Exposed	3	115 763 737	115 687 148	36 118 612	31.2%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	1	123 681 466	123 584 719	43 247 794	35.0%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	2	116 040 677	115 957 631	39 535 598	34.1%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Control	3	111 016 728	110 917 648	37 328 088	33.7%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	1	113 433 808	113 342 737	39 581 808	34.9%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	2	138 493 145	138372820	47 644 851	34.4%
F2	Fa.11	H0 (month 4)	Exposed	3	113 035 684	112950327	39 384 394	34.9%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	1	102 401 276	102 319 757	35 086 355	34.3%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	2	132 404 601	132 276 335	46 149 631	34.9%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Control	3	135 986 541	135 859 611	46 888 389	34.5%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	1	129 565 845	129 451 642	43 839 988	33.9%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	2	118 605 765	118 458 290	40 392 026	34.1%
F2	Fa.32	H0 (month 4)	Exposed	3	115 959 516	115 871 927	40 352 705	34.8%

1552

1553 **Supplementary file 1, table 8: Genera transmission from enriched water to exposed oysters.**

1554 The comparison between “sum of sequences count” in microorganisms enriched vs. control water at day 2 and exposed
 1555 versus control oyster at day 2 F1 was done for each genera. Significant differences were identified with Deseq2. The term
 1556 “enriched” indicates a statistically significant enrichment in exposed compared to control oysters or microorganisms enriched
 1557 vs. control water (adjusted *pvalue* <0.05). The term “depleted” indicates a statistically significant depletion in exposed
 1558 compared to control oysters or microorganisms enriched vs. control water (adjusted *pvalue* <0.05). 57 genera are more
 1559 present in enriched water than in control water. Among them, 32 are enriched in Fa.11 exposed oyster (56,14%) and 28 are
 1560 enriched in Fa.32 exposed oysters (49,12%).

Genera	Fa.11	Fa.32	Water
Algicola	Enriched	Enriched	Enriched
Arcobacter	Enriched	Enriched	Enriched
Crocinitomix	Enriched	Enriched	Enriched
Fluviicola	Enriched	Enriched	Enriched
Kordia	Enriched	Enriched	Enriched
Lentilitoribacter	Enriched	Enriched	Enriched
Loktanella	Enriched	Enriched	Enriched
Marinagarivorans	Enriched	Enriched	Enriched
Marinibacterium	Enriched	Enriched	Enriched
Marinomonas	Enriched	Enriched	Enriched
Neptuniibacter	Enriched	Enriched	Enriched
Nonlabens	Enriched	Enriched	Enriched
Sedimentitalea	Enriched	Enriched	Enriched
Sulfitobacter	Enriched	Enriched	Enriched
Octadecabacter	Enriched	Enriched	Enriched
Oleiphilus	Enriched	Enriched	Enriched
OM27_clade	Enriched	Enriched	Enriched
Polaribacter_1	Enriched	Enriched	Enriched
Polaribacter_4	Enriched	Enriched	Enriched
Ponticoccus	Enriched	Enriched	Enriched
Psychromonas	Enriched	Enriched	Enriched
Psychrosphaera	Enriched	Enriched	Enriched
Roseobacter	Enriched	Enriched	Enriched
Roseobacter_clade_NAC11-7_lineage	Enriched	Enriched	Enriched
Umboniibacter	Enriched	Enriched	Enriched
Alkalimarinus	Depleted	Depleted	Depleted
Aureispira	Depleted	Depleted	Depleted
Flavirhabdus	Depleted	Depleted	Depleted
Litoribacillus	Depleted	Depleted	Depleted
Marinobacter	Depleted	Depleted	Depleted
Mesoflavibacter	Depleted	Depleted	Depleted

Neptunomonas	Depleted	Depleted	Depleted
Oceanospirillum	Depleted	Depleted	Depleted
Oleispira	Depleted	Depleted	Depleted
Phaeobacter	Depleted	Depleted	Depleted
Pseudofulvibacter	Depleted	Depleted	Depleted
Pseudomonas	Depleted	Depleted	Depleted
Rheinheimera	Depleted	Depleted	Depleted
Salinirepens	Depleted	Depleted	Depleted
Algimonas	Enriched	No difference	Enriched
Flaviramulus	Enriched	No difference	Enriched
Lacinutrix	Enriched	No difference	Enriched
Litoreibacter	Enriched	No difference	Enriched
Sagittula	Enriched	No difference	Enriched
SM1A02	Enriched	No difference	Enriched
Tateyamaria	Enriched	No difference	Enriched
Owenweeksia	No difference	Enriched	Enriched
Planktomarina	No difference	Enriched	Enriched
Glaciecola	Depleted	Enriched	Enriched
Aliikangiella	Enriched	Enriched	No difference
Amylibacter	Enriched	Enriched	No difference
Dokdonia	Enriched	Enriched	No difference
Ekhidna	Enriched	Enriched	No difference
Maricurvus	Enriched	Enriched	No difference
Mycobacterium	Enriched	Enriched	No difference
BD1-7_clade	No difference	No difference	Enriched
Candidatus_Thioglobus	No difference	No difference	Enriched
Lentibacter	No difference	No difference	Enriched
Litoricola	No difference	No difference	Enriched
Mameliella	No difference	No difference	Enriched
Mf105b01	No difference	No difference	Enriched
OM43_clade	No difference	No difference	Enriched
OM60(NOR5)_clade	No difference	No difference	Enriched
Photobacterium	No difference	No difference	Enriched
Porticoccus	No difference	No difference	Enriched
Primorskyibacter	No difference	No difference	Enriched
Psychriilyobacter	No difference	No difference	Enriched
Saccharophagus	No difference	No difference	Enriched
SUP05_cluster	No difference	No difference	Enriched
Thalassobius	No difference	No difference	Enriched
Zhongshania	No difference	No difference	Enriched
Aestuariicella	Depleted	Depleted	Enriched
Alteromonas	Depleted	Depleted	Enriched
Salinimonas	Depleted	Depleted	Enriched
Catenococcus	No difference	Depleted	Enriched
Aestuariibacter	Depleted	No difference	Enriched
Psychroserpens	No difference	Enriched	Enriched
Olleya	Enriched	Enriched	No difference
Paraglaciecola	Enriched	Enriched	No difference
Aminobacter	Enriched	No difference	No difference
Altererythrobacter	Enriched	No difference	No difference
Aquimarina	Enriched	No difference	No difference
Arenicella	Enriched	No difference	No difference
Fabibacter	Enriched	No difference	No difference
Halodesulfovibrio	Enriched	No difference	No difference
Lewinella	Enriched	No difference	No difference
Marinobacterium	Enriched	No difference	No difference
Nioella	Enriched	No difference	No difference
Agaribacter	Enriched	No difference	No difference
Paramaledivibacter	Enriched	No difference	No difference
Pseudahrensia	Enriched	No difference	No difference

Pseudohongiella	Enriched	No difference	No difference
Shimia	Enriched	No difference	No difference
Sphingorhabdus	Enriched	No difference	No difference
Terasakiella	Enriched	No difference	No difference
Ulviobacter	Enriched	No difference	No difference
Halioglobus	No difference	Enriched	No difference
Mycoplasma	No difference	Enriched	No difference
Albirhodobacter	Depleted	No difference	Depleted
Colwellia	Depleted	No difference	Depleted
Exiguobacterium	Depleted	No difference	Depleted
Flavobacterium	Depleted	No difference	Depleted
Idiomarina	Depleted	No difference	Depleted
Polaribacter_huanghezhanensis	Depleted	No difference	Depleted
Thalassotalea	Depleted	No difference	Depleted
Xanthomarina	Depleted	No difference	Depleted
Marivita	No difference	Depleted	Depleted
Oceanobacter	No difference	Depleted	Depleted
Tenacibaculum	No difference	Depleted	Depleted
Thalassospira	No difference	Depleted	Depleted
Achromobacter	No difference	No difference	Depleted
Anaeromicrobium	No difference	No difference	Depleted
Aquimarina	No difference	No difference	Depleted
Aurantimonas	No difference	No difference	Depleted
Aurantivirga	No difference	No difference	Depleted
Blastopirellula	No difference	No difference	Depleted
Bosea	No difference	No difference	Depleted
Boseongicola	No difference	No difference	Depleted
Brachybacterium	No difference	No difference	Depleted
Brevibacterium	No difference	No difference	Depleted
Brevundimonas	No difference	No difference	Depleted
Candidatus_Actinomarina	No difference	No difference	Depleted
Celeribacter	No difference	No difference	Depleted
Clade_la	No difference	No difference	Depleted
Clostridiisalibacter	No difference	No difference	Depleted
Cobetia	No difference	No difference	Depleted
Corynebacterium_1	No difference	No difference	Depleted
Dietzia	No difference	No difference	Depleted
Dolosigranulum	No difference	No difference	Depleted
Filomicrobium	No difference	No difference	Depleted
Fuerstia	No difference	No difference	Depleted
Galbibacter	No difference	No difference	Depleted
Gordonia	No difference	No difference	Depleted
Gramella	No difference	No difference	Depleted
Halomonas	No difference	No difference	Depleted
HTCC5015	No difference	No difference	Depleted
Hyphomicrobium	No difference	No difference	Depleted
Hyphomonas	No difference	No difference	Depleted
Kocuria	No difference	No difference	Depleted
Maribacter	No difference	No difference	Depleted
Maribius	No difference	No difference	Depleted
Marinicella	No difference	No difference	Depleted
Marinococcus	No difference	No difference	Depleted
Maritalea	No difference	No difference	Depleted
Martellella	No difference	No difference	Depleted
Mesonia	No difference	No difference	Depleted
Mesorhizobium	No difference	No difference	Depleted
Methyloversatilis	No difference	No difference	Depleted
Micrococcus	No difference	No difference	Depleted
ML602J-51	No difference	No difference	Depleted
Muricauda	No difference	No difference	Depleted

Mycobacterium	No difference	No difference	Depleted
Novosphingobium	No difference	No difference	Depleted
NS5_marine_group	No difference	No difference	Depleted
Oceanicaulis	No difference	No difference	Depleted
Paracoccus	No difference	No difference	Depleted
Paramaledivibacter	No difference	No difference	Depleted
Phenylobacterium	No difference	No difference	Depleted
Psychrobacter	No difference	No difference	Depleted
Rhodopseudomonas	No difference	No difference	Depleted
Salegentibacter	No difference	No difference	Depleted
Sphingobium	No difference	No difference	Depleted
Sphingomonas	No difference	No difference	Depleted
Sphingopyxis	No difference	No difference	Depleted
Staphylococcus	No difference	No difference	Depleted
Stappia	No difference	No difference	Depleted
Stenotrophomonas	No difference	No difference	Depleted
Tepidibacter	No difference	No difference	Depleted
Tistrella	No difference	No difference	Depleted
Vitellibacter	No difference	No difference	Depleted
Alcanivorax	Depleted	Depleted	No difference
Aquibacter	Depleted	Depleted	No difference
Colwellia	Depleted	Depleted	No difference
Kiloniella	Depleted	Depleted	No difference
Oleibacter	Depleted	Depleted	No difference
Planktotalea	Depleted	Depleted	No difference
Pseudoalteromonas	Depleted	Depleted	No difference
Clostridium_sensu_stricto_13	Depleted	No difference	No difference
HTCC5015	Depleted	No difference	No difference
Kordiimonas	Depleted	No difference	No difference
Oceaniserpentilla	Depleted	No difference	No difference
Shewanella	Depleted	No difference	No difference
Cohaesibacter	No difference	Depleted	No difference
Jannaschia	No difference	Depleted	No difference
NS10_marine_group	No difference	Depleted	No difference
Ruegeria	Enriched	Depleted	No difference
Bacillus	Enriched	No difference	Depleted
Acinetobacter	No difference	Enriched	Depleted
Halodesulfobivrio	No difference	Enriched	Depleted

1561

1562

1563

1564

1565

1566

1567

1568

1569

1570 **Supplementary file 1, table 9: Number of differentially expressed genes**

1571 Genes statistically differentially expressed (adjusted p-value < 0.05) were determined using DeSeq2 analysis out of the 28 027
 1572 genes of the *C. gigas* reference genome V9 (Zhang et al, 2012). Comparison was performed between the microorganism
 1573 exposed and control oysters for Both Fa.11 (a) and Fa.32 (b) for the following time point of the F1 generation: Day2, 10, 35
 1574 and Month 4 = Hour 0 of disease induction and for the following time point of the F2 generation: Day 10, Month 4 = Hour 0
 1575 of disease induction, hour 3, 6, 12 and 24 after disease induction.

1576 a. Fa.11

Time point	Differentially expressed genes	Induced	Repressed
	FDR <0.05	FDR <0.05	FDR <0.05
F1	Day 2	981	629
	Day 10	4 198	2 540
	Day 35	12 369	5 685
	Month 4	25	12
F2	Day 10	5 064	2 696
	Month 4	708	272
	Hour 3	468	255
	Hour 6	168	61
	Hour 12	221	114
	Hour 24	97	53

1577

1578 b. Fa.32

Time point	Differentially expressed genes	Induced	Repressed
	FDR <0.05	FDR <0.05	FDR <0.05
F1	Day 2	3 410	2 098
	Day 10	1 100	563
	Day 35	305	104
	Month 4	35	14
F2	Day 10	6 029	3 184
	Month 4	120	62
	Hour 3	249	84
	Hour 6	67	18
	Hour 12	104	48
	Hour 24	233	157

1579

1580

1581

1582

1583

1584

1585

1586

1587 Supplementary file 1, table 10: Number of significant Flk and significant SNPs between conditions and generations.

1588 SNP allele frequencies were estimated in each condition (exposed vs. control), each generation (F1, F2 and F3) and each
 1589 family (Fa.11 and Fa.32) giving 12 genetic populations. Within each family, the FLK test was applied at all SNPs based on three
 1590 different sets of populations (G0-1, G1 or G0-3). The number of significant tests at a FDR of 5% is reported for each family
 1591 and population subset.

1592

Family	Generations	FLK (pvalue<0,05)	Number of significant SNPs (FDR<0,05)
Fa.11	G0/G1/G2/G3	392 386	54 274
Fa.11	G0/G1	219 750	0
Fa.11	G1	194 947	0
Fa.32	G0/G1/G2/G3	966 820	490 800
Fa.32	G0/G1	242 680	2 469
Fa.32	G1	194 596	0

Supplementary file 1, table 11: Optimisation of DMRseq parameters

DmrSim was used to test for the detection of true positives (TP) and false positives (FP) in an artificial dataset of DMRs. Block size: default block=FALSE ; minnumregion (default = 5); bpspan (default = 1000); mininspan (default=30); maxgapsmooth (default=2500); Smooth (default= TRUE); Smooth (default= TRUE)

	Blocks ize	Minnum region	deltamax	bpspan	Minin span	Maxgap smooth	Smooth	pval=0.05		pval=0.1	
								% TP	% FP	% TP	% FP
Assay1	500	5	0.25	1000	10	2500	TRUE	29.4	2.2	44.4	13.9
Assay4	500	5	0.25	250	3	2500	TRUE	25.0	0.6	36.1	5.6
Assay5	100	5	0.25	250	10	2500	TRUE	36.1	0.0	50.0	11.1
Assay8	100	3	0.25	250	3	2500	TRUE	41.7	3.3	58.3	13.3
Assay9	100	3	0.25	1000	10	2500	TRUE	32.2	2.8	47.2	16.7
Assay10	FALSE	3	0.25	1000	3	2500	TRUE	42.2	0.0	59.4	2.8
Assay11	FALSE	3	0.25	1000	10	2500	TRUE	48.3	0.0	63.9	3.9
Assay12	FALSE	3	0.25	1000	30	2500	TRUE	44.4	0.0	61.7	1.1
Assay13	FALSE	4	0.25	1000	10	2500	TRUE	40.6	0.6	60.0	5.6
Assay14	FALSE	5	0.25	1000	10	2500	TRUE	50.0	0.0	64.4	2.2
Assay15	FALSE	3	0.25	500	10	2500	TRUE	48.9	0.6	62.8	8.3
Assay16	FALSE	3	0.25	250	10	2500	TRUE	52.8	1.1	69.4	9.4
Assay17	FALSE	5	0.25	500	10	2500	TRUE	47.8	0.0	55.6	6.1
Assay18	FALSE	5	0.25	250	10	2500	TRUE	44.4	0.6	61.1	7.2
Assay19	FALSE	5	0.25	250	10	500	TRUE	39.4	0.6	55.0	2.2
Assay27	FALSE	5	0.2	250	3	2500	TRUE	33.3	1.1	46.1	6.1
Assay28	FALSE	5	0.2	100	3	2500	TRUE	29.4	1.7	38.9	6.1
Assay29	FALSE	5	0.2	2000	3	2500	TRUE	42.8	0.0	55.6	3.3
Assay33	FALSE	3	0.2	None	None	None	FALSE	19.4	3.3	31.7	6.7
Assay34	FALSE	5	0.2	None	None	None	FALSE	25.0	0.0	36.1	4.4
Assay35	FALSE	5	0.2	None	None	None	FALSE	18.9	2.8	27.8	8.3
Assay36	FALSE	5	0.25	1000	10	2500	TRUE	44.4	0.4	57.8	8.9
Assay37	FALSE	5	0.2	1000	10	2500	TRUE	36.1	0.2	47.2	2.8

Supplementary file 1, table 12: Number of differentially methylated regions

Regions statistically differentially methylated (DMRs) were determined using DMRSeq package and based on a p-value < 0.05 among the 28 027 genes of the *C. gigas* reference genome V9 (Zhang et al, 2012). Comparison was performed between the microorganism exposed and control oysters for Both Fa.11 and Fa.32 for the following time point of the F1 generation (Day10, and Month 4 = Hour 0 of disease induction) and for the following time point of the F2 generation (Day10, and Month 4 = Hour 0 of disease induction).

Family	Generation	Time point	Total number of DMRs	Number and % of hypermethylated DMRs		Number and % of hypomethylated DMRs	
Fa.11	F1	Day 10	4325	2482	57.4%	1843	42.6%
		Month 4	4985	2040	40.9%	2945	59.1%
	F2	Day 10	5531	1230	22,2%	4301	77,8%
		Month 4	5207	2550	49,0%	2657	51,0%
Fa.32	F1	Day 10	3407	1966	57,7%	1441	42,3%
		Month 4	4131	1905	46,1%	2226	53,9%
	F2	Day 10	4949	1957	39,5%	2992	60,5%
		Month 4	6781	3730	55,0%	3051	45,0%

Discussion

I. Rappels et discussion autour des principaux résultats

L'objectif principal de la thèse était d'étudier la place de différents mécanismes du système d'héritabilité, notamment la place de l'épigénétique, dans l'évolution adaptative. Ces travaux s'intègrent dans un cadre conceptuel général développé dans l'équipe EcoEvi du laboratoire IHPE, et qui a pour objectif d'étudier l'effet des environnements (biotique et abiotique) sur l'évolution des organismes, avec une vision la plus intégrative possible (transmission d'éléments génétiques, épigénétiques, cytoplasmiques et des symbiotes). Les travaux développés dans cette équipe portent essentiellement sur des systèmes en interaction hôtes/symbiotes et hôtes/parasites afin de mieux comprendre les mécanismes évolutifs et adaptatifs de ces interactions et de proposer des stratégies de contrôle. Les modèles principalement étudiés dans cette unité sont l'huitre creuse *Crassostrea gigas* et l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata*. Au cours de mon stage de master 2, également réalisé à l'IHPE, j'ai travaillé sur deux types de stress environnementaux dont j'ai étudié l'influence sur la méthylation de l'ADN chez *C. gigas* et *B. glabrata* (Fallet, 2015). Le premier stress était un stress biotique consistant en l'infection de *Biomphalaria glabrata* par *Schistosoma mansoni*. Plusieurs régions différentiellement exprimées liées à la primo-infection ont ainsi été identifiées (Pinaud et al. In prep). Le second stress a été initié au cours de mon stage de master 2, dans le cadre de la thèse de Rodolfo Rondon. Il a consisté en une exposition parentale au diuron et l'influence de cette exposition sur le méthylome de la descendance a été étudiée chez *C. gigas* (Rondon et al., 2017). Cette étude a été poursuivie dans le cadre de ma thèse, dans laquelle l'induction d'un nouveau type de stress a également été induite sur *C. gigas*. Ce manuscrit traite donc de la réponse de *C. gigas* à deux types de stress environnementaux. Les phénotypes induits par ces stress ainsi que les déterminants moléculaires de la mise en place de ces phénotypes alternatifs ont été étudiés.

1. Chapitre 1 : La place de l'épigénétique chez les mollusques

A. Synthèse des connaissances concernant l'épigénétique chez les mollusques

Cette thèse portant sur le potentiel des mécanismes épigénétiques dans la réponse adaptative à des stress environnementaux, chez l'huitre creuse, il a été tout naturel de réaliser un travail bibliographique portant sur ces mécanismes et les effets transgénérationnels chez les mollusques. Cette synthèse bibliographique a été focalisée sur la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, deux porteurs de l'information épigénétique qui ont été étudiés dans la thèse. Ainsi, chez les mollusques, ces deux porteurs sont impliqués dans le succès reproducteur et le développement larvaire ainsi que dans la réponse environnementale, potentiellement adaptative, à un nombre varié

de stimuli biotiques et abiotiques. Les modifications d'histones sont également associées à l'apprentissage et à la mémoire à long terme chez deux espèces de gastéropodes : *Helix lucorum* et *Aplysia sp.* Un autre résultat issu de cette synthèse bibliographique est que les effets transgénérationnels chez les mollusques ont été très peu étudiés. En effet, des effets intergénérationnels ont été mis en évidence seulement chez 14 espèces, avec très peu de cas d'implication de la composante épigénétique dans ces effets, et aucun concernant les modifications d'histones. De plus, très peu d'études ont montré la transmission du phénotype sur plus de deux générations, rendant difficile l'acceptation de l'existence d'effets transgénérationnels chez ces organismes et ne permettant pas de répondre quant à la persistance à long terme de ces effets. Ainsi, il s'avère que les relations entre variabilité phénotypique, information épigénétique et hérédité chez les mollusques sont encore très mal connues. Une lacune subsiste dans la littérature, très peu d'études ayant contribué à faire le lien entre épigénétique et effets transgénérationnels. Compte tenu de l'importance écologique et économique des mollusques, cette situation me semble insatisfaisante et elle a motivé les travaux expérimentaux présentés dans cette thèse.

Résultats clefs :

- *Méthylation de l'ADN et modifications des histones sont impliquées dans le développement, la réponse aux changements environnementaux et la mémoire à long terme chez les mollusques*
- *Une lacune entre porteurs de l'information épigénétique et effets transgénérationnels subsiste chez des espèces.*

B. Identification des zones d'ombre subsistantes pour connaître l'implication de l'épigénétique dans l'évolution adaptative chez les mollusques

Les travaux de la synthèse bibliographique ont mis en exergue une lacune entre porteurs de l'information épigénétique et effets transgénérationnels. Afin d'appréhender la nature évolutive et adaptative de l'information épigénétique de manière globale, nous avons identifié trois points essentiels à approfondir, certains points sur ont été développés au cours de la thèse : (i) la nécessité d'étudier comment, et à quel point les états chromatinien sont liés à la variabilité phénotypique au cours des générations ; (ii) estimer la nature adaptative des effets et états chromatinien transmissibles et (iii) suivre les états chromatinien de la lignée somatique à la lignée germinale au cours des générations pour déterminer s'ils sont véritablement des véhicules d'une partie de l'information héréditaire. Ces conclusions sur les mécanismes épigénétiques chez les mollusques constituent des questions en suspens depuis plusieurs années et auxquelles le laboratoire IHPE cherche à répondre. Mes travaux de thèse ont permis de faire la lumière sur certaines de ces interrogations.

- *Quel est le lien entre porteurs de l'information épigénétique et variabilité transmissible ?*
- *Comment ces modifications sont-elles transmises entre générations ?*
- *Les effets transgénérationnels sont-ils adaptatifs ?*

2. Chapitre 2 : Influence de différents types de stress sur la réponse multi/transgénérationnelle des huitres

A. Modification du méthylome suite à un stress environnemental abiotique parental

Le rejet dans l'environnement de polluants chimiques peut avoir des conséquences catastrophiques pour les organismes qui y vivent. Les zones littorales sont les plus élevées en terme de densité humaine (Small & Nicholls, 2003) et sont aussi, avec les estuaires, les zones les plus impactées par la pollution anthropique, notamment via l'accumulation des rejets chimiques en amont du bassin versant. Ainsi divers polluants néfastes pour les organismes marins peuvent être retrouvés dans les écosystèmes aquatiques tels les plastiques et micro-plastiques (Wright et al., 2013), les pesticides, les métaux lourds et les hydrocarbures.

Les huitres sont des organismes filtreurs, sessiles à l'âge adulte et principalement élevées dans les zones intertidales et les zones marines côtières. Elles sont ainsi particulièrement soumises aux contraintes environnementales et aux polluants chimiques et sont susceptibles d'accumuler les métaux lourds et les pesticides dans leurs tissus. Parmi les pesticides, le diuron a d'ores et déjà été la cible de nombreuses études qui ont mis en évidence ses effets toxiques. Il a ainsi été identifié comme génotoxique (Akcha et al., 2012; Barranger et al., 2014), néfaste pour la reproduction (Buisson et al., 2008; Mai et al., 2013) et entraînant l'apparition d'anomalies chromosomiques chez les descendants (Bouilly et al., 2007; Barranger et al., 2014). Les effets négatifs du diuron sur le système immunitaire sont également nombreux via une diminution de l'activité des hémocytes et de la phagocytose (Gagnaire et al., 2006, 2007; Bouilly et al., 2007; Akcha et al., 2016), une diminution de l'expression de gènes notamment immunitaires (Tanguy et al., 2005; Gagnaire et al., 2007; Geret et al., 2011; Akcha et al., 2016) et l'inhibition de l'activité de la superoxyde dismutase dans le plasma (Luna-Acosta et al., 2012). De plus, la transmission de ses effets génotoxiques a clairement été établie via un possible transfert d'ADN endommagé aux descendants (Barranger et al., 2014).

Les travaux effectués dans le cadre du doctorat de Rodolfo Rondon ont permis de montrer qu'une exposition des géniteurs au diuron, au cours de la gamétogénèse conduit à des changements dans le méthylome de la descendance (génération F1) en générant des régions différenciellement méthylées. J'ai été associée à ce travail en approfondissant le lien qui existe entre ces DMRs et l'expression des gènes. Mes travaux en particulier sur ce point du projet, ont permis de montrer l'existence d'une corrélation entre abondance des transcrits et taux de méthylation de l'ADN, uniquement sur les gènes très méthylés, ne permettant pas de conclure quant à l'existence d'une interaction entre changements de méthylation de l'ADN et changement dans l'expression des gènes, et ce malgré l'observation d'importantes différences dans la méthylation de l'ADN. De plus, aucun lien

concret entre épissage alternatif et méthylation de l'ADN n'a été mis en évidence sur les quelques gènes ciblés. Ces résultats soulèvent la question de l'implication de la méthylation de l'ADN pour réguler l'expression des gènes.

Résultats principaux :

- *Une exposition à un stress abiotique sur les huitres parentes entraîne des modifications ciblées dans le méthylome de la descendance.*
- *Aucun lien concret entre modification de la méthylation de l'ADN et changement de l'expression des gènes n'a été identifié.*

Perspective :

- ➔ *Nécessité de faire des études complémentaires afin de comprendre le rôle de la méthylation de l'ADN chez les invertébrés, est-ce vraiment un porteur d'information épigénétique ? Est-elle impliquée dans la régulation de l'expression des gènes ?*

**B. Plasticité phénotypique adaptative et transgénérationnelle de la résistance
l'huitre creuse à une infection, grâce à une exposition microbienne**

Le syndrome POMS entraîne des taux de mortalités alarmant chez les huitres juvéniles. Ce syndrome est plurifactoriel et différents facteurs sont susceptibles d'être impliqués dans son émergence : la présence d'agents pathogènes dans l'eau, des facteurs abiotiques (température, salinité et qualité de l'eau), des facteurs propres aux huitres (génétique, microbiote). Une étude approfondie a récemment permis de mieux caractériser les déterminants microbiens du syndrome POMS (de Lorgeril et al., 2018). Le virus OsHV1- μ var est un acteur majeur du déclenchement de la maladie : il entraîne une immunosuppression des huitres qui a pour conséquence de destabiliser le microbiote et d'entraîner la colonisation des huitres par des bactéries opportunistes. Les huitres finissent par mourir de septicémie.

a. Amélioration de la survie au syndrome POMS suite à une exposition microbienne précoce

Dans le cadre du projet Transgigas, nous avons exposé des larves d'huitres à une microflore environnementale. Cette exposition larvaire a conduit à une amélioration significative de la survie des huitres lors d'une induction de la maladie POMS au stade juvénile. Ce phénotype a été observé sur la génération exposée, les descendants de la génération exposée, bien que ceux-ci n'aient pas subi le stress, et les petits descendants de la génération exposée. La transmission du phénotype de la génération exposée (F1) à la descendance (F2) constitue un effet multigénérationnel étant donné que chez l'huitre, les cellules germinales sont formées très tôt au cours du développement embryonnaire (Fabioux, 2004; Fabioux et al., 2004). Dans ce cas, les cellules germinales de la génération exposée étaient déjà formées et ont pu subir l'influence de l'exposition via un transfert de l'information de la

lignée somatique à la lignée germinale. La transmission du phénotype jusqu'à la petite descendance (F3) constitue quant à elle un exemple d'effet transgénérationnel car les cellules germinales à l'origine de la F3 n'ont pas directement subi l'exposition. Néanmoins, la F3 a présenté des résultats contrastés en terme d'amélioration de la survie au POMS, avec les petits-descendants de grands parents exposés montrant une survie améliorée seulement au cours de l'infection expérimentale pour la Fa.11 et ceux de la Fa.32 exposée présentant une amélioration de la survie uniquement sur le terrain. Ainsi, il est possible que la plasticité transgénérationnelle induite par l'exposition à la flore microbienne environnementale disparaisse petit à petit, suggérant le caractère réversible de ce phénotype et soulevant l'hypothèse de l'implication de la composante épigénétique dans la mise en place et/ou le maintien de ce phénotype. En effet, les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans différents changements phénotypiques réversibles. Par exemple, les abeilles, *Apis mellifera*, peuvent changer de « métier » via un changement du patron de méthylation de l'ADN (Herb et al., 2012) et chez l'Homme, les comportements de troubles paniques sont supprimés grâce à la thérapie cognitive et comportementale qui a été corrélée à une augmentation de la méthylation de l'ADN du gène codant pour l'oxydase monoamine A, une enzyme oeuvrant dans la dégradation des amines tels que la dopamine et la sérotonine (Ziegler et al., 2016).

Résultat principal :

- *Une exposition précoce des huitres à une flore microbienne environnementale a permis d'améliorer leur survie au POMS sur trois générations consécutives.*

Perspective :

- ➔ *Il serait intéressant de travailler sur une quatrième génération afin de vérifier la réversibilité du phénotype.*

b. Modification du microbiote des huitres suite à l'exposition environnementale

Suite à l'exposition à la microflore environnementale, le microbiote des huitres exposées a été profondément modifié chez la génération F1 par rapport aux huitres contrôles. Une modification du microbiote est également retrouvée sur la F2 mais de façon amoindrie. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : (i) l'exposition de la F1 à l'eau enrichie en microorganismes a conduit à l'installation d'une microflore protectrice qui se maintient et a été directement transmise de la F1 à la F2 ; (ii) l'exposition de la F1 à l'eau enrichie en microorganismes entraîne une modulation de la réponse immunitaire, ce changement dans la réponse immunitaire est transmissible à la génération suivante et est à l'origine d'une colonisation par le microbiote qui dépend de cette immunité (différente de chez les contrôles). Si cette néo-réponse immunitaire se transmet de génération en génération, la composition du microbiote se trouve modifiée à chaque génération ayant conservé le phénotype immuno-modulé. Dans le cas de l'hypothèse (i) différents travaux dans la littérature montrent la

possibilité d'un transfert vertical du microbiote. Chez les mammifères, une transmission du microbiote de la mère à l'enfant peut survenir via le liquide amniotique (Bearfield et al., 2002; Jiménez et al., 2008), par la circulation sanguine via le placenta et le cordon ombilical (Han et al., 2004), par voie vaginale lors de l'accouchement ou la mise bas (Buddington et al., 2010; Nagata et al., 2012) et pendant l'allaitement (Perez et al., 2007). Chez les espèces ovipares d'autres mécanismes de transmission entrent en jeu : la transmission de symbiote bactérien se fait via ingestion du mucus maternel chez la punaise (Hosokawa et al., 2012) et de mucus parental chez le poisson disque (Sylvain & Derome, 2017), par la consommation de sécrétions fécales provenant de la mère chez le bousier (Schwab et al., 2016) et par régurgitation de nourriture des parents aux descendants chez les coléoptères charognards (Wang & Rozen, 2017). De nombreuses espèces d'insectes parmi les coléoptères, les diptères, les hémiptères et les hyménoptères transmettent leur microbiote via un dépôt à la surface des œufs (Salem et al., 2015) ou dans l'environnement où vont éclore les larves (Kaltenpoth et al., 2005). De plus, les bactéries *Wolbachia* sont transmises directement par les drosophiles femelles à leur progéniture via l'ovocyte. Enfin, la transmission verticale de symbiotes bactériens a été mise en évidence chez le bivalve *Solemya velum* via les gamètes femelles et/ou la capsule gélatineuse dans laquelle se développe les larves (Krueger et al., 1996) révélant l'existence d'un mode de transmission direct du microbiote chez une espèce de mollusque. Il est envisageable dans notre cas que le microbiote parental ait été transmis à la descendance via les gamètes ou les œufs. Une modulation du microbiote chez la F2 sous l'influence du microbiote de la F1 (hypothèse 2) est également envisageable car le changement du microbiote et/ou la détection de la flore bactérienne environnementale chez la F1 exposée a entraîné des changements dans l'expression de nombreux gènes dont des gènes immunitaires. Ces changements ont pu participer à la modulation du microbiote.

Résultat principal :

- *L'exposition à la microflore microbienne environnementale a entraîné une modification du microbiote des huitres sur (au moins) deux générations : la génération exposée et la descendance de la génération exposée.*

Perspective :

➔ *Le microbiote est-il transmis aussi à la F3 ?*

c. Influence de l'exposition environnementale sur le transcriptome

L'exposition au stade larvaire a induit de nombreux changements dans l'expression des gènes impliqués dans de grands processus biologiques (les processus cellulaires généraux, le métabolisme, la réponse aux stimuli environnementaux, la réponse immunitaire, la structure chromatinienne, la réplication et la recombinaison de l'ADN, la transcription et l'expression des gènes, la réparation de

l'ADN, le développement, le destin cellulaire, les processus liés à l'ARN, la traduction et la formation des protéines, la transduction du signal et le transport). Une partie de ces changements transcriptomiques entre individus exposés et contrôles ont subsisté après l'exposition, jusqu'au jour 35, mais la majorité ont disparu au stade juvénile (mois 4), revenant à un stade basal. Par ailleurs, les deux familles étudiées ont montré des réponses opposées pour certains processus. Nous nous sommes focalisés sur la réponse aux stimuli environnementaux et sur la réponse immunitaire. Au sein de ces deux processus, les deux familles ont également présenté des différences d'expression. La Fa.32 a montré une surexpression de gènes impliqués dans la réponse aux stimuli extérieurs, la réponse au stress et la régulation de la réponse au stress, la réponse aux bactéries, la réponse aux autres organismes et la régulation de la réponse de défense. De plus, la transcription virale était surexprimée au jour 2 tandis que la cascade STAT était sous exprimées. Enfin, les deux familles ont montré une surexpression de gènes impliqués dans la réponse de défense et la réponse aux virus. Cette dernière fonction biologique est restée enrichie jusqu'au mois 4. Lors de l'induction au POMS chez la génération F2, l'amélioration de la survie des huitres exposées s'est accompagnée de changements transcriptomiques, avec notamment la surexpression d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Par ailleurs, deux types de comportement ont été observés chez les deux familles : la Fa.11 a présenté une réponse basale tandis que la Fa.32 a émis une réponse inductible.

Cet effet environnemental à long terme, sur l'immunité, met en évidence l'existence d'une mémoire immunitaire innée (*innate immune memory*). La mémoire immunitaire innée inclut à la fois les mécanismes de tolérance aux pathogènes et les mécanismes entraînant une meilleure défense immunitaire secondaire, à la suite d'une première infection. Le priming immunitaire et l'immunité entraînée (qui sont deux termes équivalents) englobent ces mécanismes d'amélioration de la réponse après une première stimulation et consistent en : la mémorisation, par les cellules de l'immunité innée, des événements infectieux passés, ce qui permettra la mise en place d'une meilleure réponse immunitaire lors d'une seconde rencontre avec un pathogène (Netea & Meer, 2017; Penkov et al., 2019). L'immunité entraînée a été décrite chez les vertébrés (Di Luzio & Williams, 1978; Netea et al., 2011; Marakalala et al., 2013; Netea & Meer, 2017) mais également chez les invertébrés (Kurtz & Franz, 2003; Moret & Siva-Jothy, 2003; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Pham et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Portela et al., 2013; J. C. Sun et al., 2014; Pinaud et al., 2016) et les plantes (Kachroo & Robin, 2013; Netea & Meer, 2017). Un effet intergénérationnel du priming immunitaire a aussi été observé chez diverses espèces (Sadd et al., 2005; Luna & Ton, 2012; Timothy J. Green et al., 2016; Norouzitallab et al., 2016b; Lafont et al., 2019). Chez les invertébrés, différents mécanismes sont impliqués dans le priming immunitaire tels que la surexpression de voies de régulation immunitaire comme la voie Toll* et l'activation des phagocytes chez *Drosophila melanogaster* (Boutros et al., 2002; Pham et al., 2007) ou la différenciation des cellules immunitaires chez *Anopheles gambiae* (Rodrigues et al., 2010).

Des modifications épigénétiques ont été identifiées comme impliquées dans le priming immunitaire que ce soit chez les vertébrés, les invertébrés ou les plantes. Par exemple, chez l'Homme, la différenciation des monocytes en macrophages suite à une infection est associée à la surexpression de nombreux gènes du métabolisme et liée à des modifications post-traductionnelles des histones au niveau des promoteurs ou des amplificateurs des gènes (augmentation de H3K27ac, de H3K9me1 et H3K4me3) (Quintin et al., 2012; Saeed et al., 2014). Chez *Arabidopsis*, la voie RdDM est impliquée dans la SAR (résistance systémique acquise pour « Systemic Acquired Resistance») via une hypométhylation de certains sites non CpG (Luna & Ton, 2012). Enfin, chez *Artemia*, le priming immunitaire est associé à une augmentation de H4ac et H3K4me3 mais aucune corrélation entre les modifications d'histones et l'expression des gènes n'a pu être établie (Norouzitallab et al., 2016b). Les micro ARNs peuvent également être impliqués dans le priming immunitaire ou la mémoire immunitaire innée : miR-200 agit sur les coelomocytes d'*Apostichopus japonicus* en réponse à une exposition à des LPS et lors d'une seconde infection par *Vibrio splendidus*, entraînant une surexpression des gènes de la voie Toll (Lv et al., 2015) ; miR-221 et miR-222 régulent la reprogrammation fonctionnelle des macrophages suite à une exposition prolongée à des LPS chez la souris (Seeley et al., 2018). Si un consensus sur l'implication des mécanismes épigénétique dans la mémoire immunitaire innée, a émergé, le rôle que jouent ces mécanismes n'a pas encore été découvert. Néanmoins, suite à une infection, les cellules de l'immunité innée subissent des régulations métaboliques. Par exemple, un changement d'activité métabolique allant de la phosphorylation oxydative à la glycolyse a été observée chez les monocytes humains primés (Cheng et al., 2014; Saeed et al., 2014) et le lien entre modifications épigénétiques et reprogrammation métabolique a été établi. En effet, les composés métaboliques intermédiaires peuvent agir avec ou moduler l'activité des enzymes agissant sur la conformation de la chromatine (Donohoe & Bultman, 2012; Gut & Verdin, 2013). Ces différents résultats ont conduit certains auteurs à émettre l'hypothèse suivante : une infection ou une stimulation des cellules de l'immunité innée, par les mécanismes de reconnaissances des pathogènes, va entraîner une reprogrammation métabolique de ces cellules. Cette reprogrammation peut modifier les porteurs de l'information épigénétique ce qui pourrait permettre à la cellule de mémoriser cette rencontre et d'ainsi mettre en place une réponse plus efficace lors d'une prochaine infection (Netea & Meer, 2017; Penkov et al., 2019). Par ailleurs, le microbiote agit à la fois sur le transcriptome et sur le méthylome de l'hôte (Pan et al., 2018) notamment grâce aux métabolites qu'il produit (Penkov et al., 2019) (Figure 22). Cette influence du microbiote sur l'immunité révèle le potentiel que l'utilisation de probiotiques peut avoir pour primer les organismes et améliorer leur réponse immunitaire à des infections futures (Sanders, 2008; Martínez Cruz et al., 2012; Standen et al., 2013).

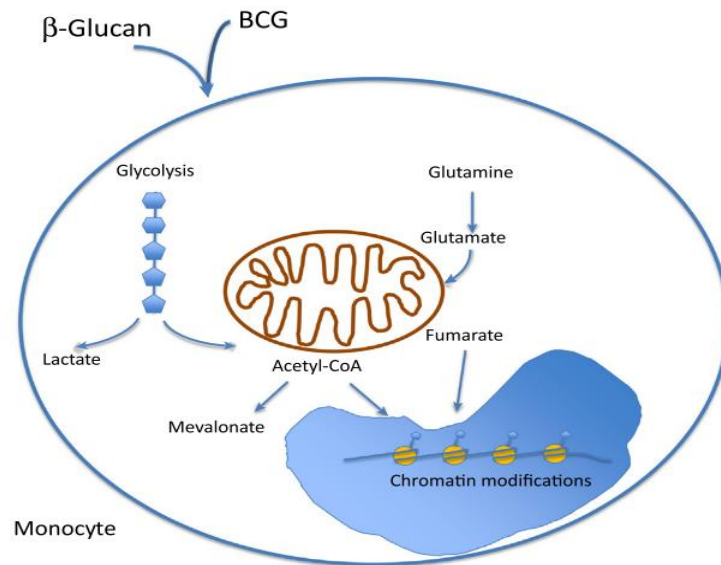


Figure 22 : Illustration du mécanisme de priming immunitaire dans un monocyte humain.

Les β-Glucan ou les BCG peuvent entraîner des changements métaboliques comme l'induction de la glycolyse ou le métabolisme du cholestérol. Certains intermédiaires métaboliques comme l'acetyl-CoA, le fumarate ou le mevalonate peuvent induire des modifications épigénétiques qui vont permettre la mémoire immunitaire innée.

D'après Penkov et al, 2019.

Durant mes travaux de thèse, l'exposition précoce à la microflore environnementale a permis de moduler l'expression de certains gènes montrant l'influence du microbiote acquis via l'environnement sur le transcriptome des huitres. Parmi les gènes régulés suite à l'exposition, un grand nombre a été identifié comme liés au métabolisme et une partie comme impliquée dans la réponse immunitaire. La majorité des gènes impliqués dans la réponse immunitaire a été surexprimée suite à l'exposition. Via ces résultats, nous avons fait la démonstration d'un priming immunitaire transgénérationnel chez *C. gigas*, un mécanisme qui avait été suggéré chez l'huitre, en réponse à une injection au poly(I :C), mais qui avait été étudié sur seulement deux générations (Timothy J. Green et al., 2016; Lafont et al., 2019). Après avoir établi une convergence entre phénotype écologique (survie) et moléculaire (changements transcriptomiques) révélant l'induction par l'exposition d'un priming immunitaire, nous nous sommes demandés par quels mécanismes moléculaires le phénotype induit par l'exposition a pu être mémorisé et transmis aux générations suivantes. Nous avons alors étudié l'influence du génome et de l'épigénome dans ce priming immunitaire.

Résultats principaux :

- *Le transcriptome des huitres a été profondément modifié sur deux générations, suite à l'exposition à la microflore environnementale.*
- *Des gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont ainsi été régulés ce qui, avec l'observation de l'augmentation des taux de survie, témoigne d'un mécanisme de priming immunitaire transgénérationnel.*

Perspective :

- ➔ *Utilisation de bactéries en tant que probiotiques pour primer les huitres dans les exploitations ostréicoles et ainsi leur permettre de mieux résister au POMS.*

3. Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place du phénotype et sa transmission

A. La sélection génétique

A la fois l'exposition au diuron et l'exposition à la microflore environnementale ont pu induire une sélection génétique des individus résistants. Nous avons donc testé cette hypothèse au sein des deux études présentées dans ma thèse en identifiant les SNPs présents entre condition exposée et condition contrôle. Dans le cadre du travail de Rodolfo Rondon, l'indice Tajima D a été utilisé tandis que dans mon étude sur l'exposition microbienne environnementale nous avons utilisé le test FLK. Dans les deux cas, aucune distorsion majeure dans les fréquences alléliques n'a été révélée, ce qui nous a permis d'exclure l'hypothèse d'une sélection génétique parmi les individus.

Dans le cadre de l'étude sur l'exposition à la microflore environnementale, ce résultat a été renforcé par l'absence de différences survenues dans les taux de mortalités des larves entre les deux conditions et ce, pendant tout le développement. Néanmoins, via l'analyse des SNPs, nous avons pu observer des différences plus faibles, par rapport à l'attendu, entre les deux conditions. Ce phénomène peut être dû au fait que les huitres de la F0 étaient des pleins frères ce qui a pu exacerber l'incidence des allèles délétères récessifs. La faible différenciation entre les populations à la F1 pourrait alors être la conséquence d'une sélection négative qui aurait purgé de la même façon les individus portant des allèles délétères dans les populations des deux conditions. Par ailleurs, nous avons observé une séparation génétique au sein de la Fa.11, entre les descendants de parents exposés et contrôles à la F2 et entre les petits descendants de grands parents exposés et contrôles à la F3. Cette différence génétique pourrait expliquer la différence de comportement observé dans la réponse transcriptomique au syndrome POMS.

Suite à l'absence de ségrégation génétique entre les huitres de nos deux conditions à la F1, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'exposition sur l'épigénétique via l'étude de la méthylation de l'ADN.

Résultat principal :

- *Dans aucune des deux études, l'occurrence d'une sélection génétique suite à l'exposition n'a été démontrée.*

B. La méthylation de l'ADN

a. Modification du méthylome en réponse au stress environnemental

L'exposition à des stress environnementaux biotiques ou abiotiques n'a pas révélé de changement de la méthylation de l'ADN au niveau global. En revanche certaines régions différenciellement méthylées entre les conditions exposées et contrôle ont été identifiées dans les deux études présentées dans cette thèse, mettant en évidence un impact environnemental sur les changements de méthylation de l'ADN. Ces deux études présentent des résultats similaires en termes de régions touchées par les DMRs avec au moins la moitié de DMRs intragéniques (diuron : 73%, microflore : 50%) et réparties à environ 50-50 dans les introns et les exons (microflore : 40 et 30% respectivement). La proportion de DMRs dans les promoteurs est beaucoup plus importante dans l'étude sur la microflore environnementale (10-15%) que dans celle du diuron (0.7%). Les deux stress environnementaux induisent donc des changements dans le méthylome mais ces changements seraient stimuli spécifiques.

Résultat principal :

- *Les stress environnementaux entraînent des changements sur certains loci dans le patron de méthylation des huitres.*

Perspectives :

- ➔ *Ces DMRs sont-elles identiques entre Fa.11 et Fa.32 et donc sont-elles aléatoires ou ciblées ?*

b. Transmission des modifications de la méthylation de l'ADN aux générations suivantes

La transmission des DMRs entre générations n'a pas été étudiée dans la thèse de Rodolfo Rondon et est en cours d'étude dans le cadre de cette thèse. Ainsi, il est prévu de regarder si les DMRs liées à certains gènes d'intérêts sont identiques chez la F1 et la F2. Cette analyse permettrait de répondre à certaines de nos interrogations concernant la transmission des marques épigénétiques entre générations. La transmission de facteurs épigénétiques a été mise en évidence chez différents organismes. La transmission de modifications aléatoires d'histones dans la lignée mitotique a été montrée chez *Schistosoma mansoni* (Roquis et al., 2016). Une transmission du patron de méthylation des loci soumis à empreinte a été observée chez les mammifères via la DNMT1 présente dans l'embryon (Li et al., 1993) et grâce à différentes protéines participant à la maintenance de la méthylation, comme le facteur de transcription ZFP57 (Li et al., 2008). D'autres gènes non soumis à empreinte vont également conserver leur pattern de méthylation (Borgel et al., 2010; Dias & Ressler, 2014) chez la souris, notamment certaines classes de retrotransposons (Lane et al., 2003). Chez le poisson zèbre, le méthylome paternel est également transmis (Jiang et al., 2013; Potok et al., 2013). Une partie des

marques de méthylation de l'ADN peut donc être transmise à la descendance et peut ainsi avoir des conséquences sur les générations suivantes (Daxinger & Whitelaw, 2012; Szyf, 2015).

Ainsi, en poursuivant notre analyse, nous pourrions éventuellement mettre en évidence une transmission des épimutations aux générations suivantes. Toutefois, cela ne nous permettra pas de répondre aux questions que nous nous posons au sujet des mécanismes de transmission des modifications épigénétiques, entre lignée germinale et lignée somatique, ni à l'implication potentielle d'autres porteurs de l'information épigénétique dans la transmission entre générations.

Perspectives :

- ➔ *Les DMRs sont-elles identiques au sein des différentes générations ?*
- ➔ *Les mécanismes permettant un transfert de l'information épigénétique entre générations et un maintien de cette information pendant la reprogrammation épigénétique sont encore inconnus.*

c. Impact des changements de méthylation de l'ADN sur l'expression des gènes

Un consensus de la littérature au sujet de la méthylation intragénique existe : plus un gène est méthylé, plus il est exprimé. Cela a été démontré, quel que soit l'espèce, et est valable aussi bien pour les plantes que pour les animaux. Chez l'huître creuse, le même mécanisme a été identifié (Olson & Roberts, 2014; Wang et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés à la fois dans la thèse de Rodolfo Rondon et dans mon étude. Dans les deux cas, deux patterns de méthylation de l'ADN ont été observés : les régions faiblement méthylées et les régions fortement méthylées et globalement, l'expression des gènes est plus forte au niveau des régions fortement méthylées. J'apporte, via mes travaux de thèse, un nouvel élément complétant ce consensus : le modèle de corrélation entre niveau de méthylation et expression des gènes n'est pas linéaire et il existe un niveau de méthylation optimal correspondant à un niveau d'expression maximum. Ainsi, nous avons identifié deux pics d'expression génique : l'un au niveau de la médiane des zones faiblement méthylées et l'autre au niveau médian des zones fortement méthylées révélant que certains gènes peu méthylés peuvent être exprimés et qu'au niveau des gènes fortement méthylés, il existe un seuil en dessous et au-dessus duquel l'expression n'est pas optimale. De plus, un certain nombre de DMRs pouvant être associés à des gènes différentiellement exprimés ont été observés suite à l'exposition microbienne. Mais aucun pattern reliant hyperméthylation à répression de l'expression des gènes ou inversement n'a été mis en évidence ce qui soulève à nouveau des interrogations au sujet de l'existence d'un lien entre modifications de la méthylation et changement de l'expression des gènes. Issue de nos observations, une nouvelle question émerge : est-ce que les DMRs observées sont là pour tendre vers le seuil optimal d'expression ?

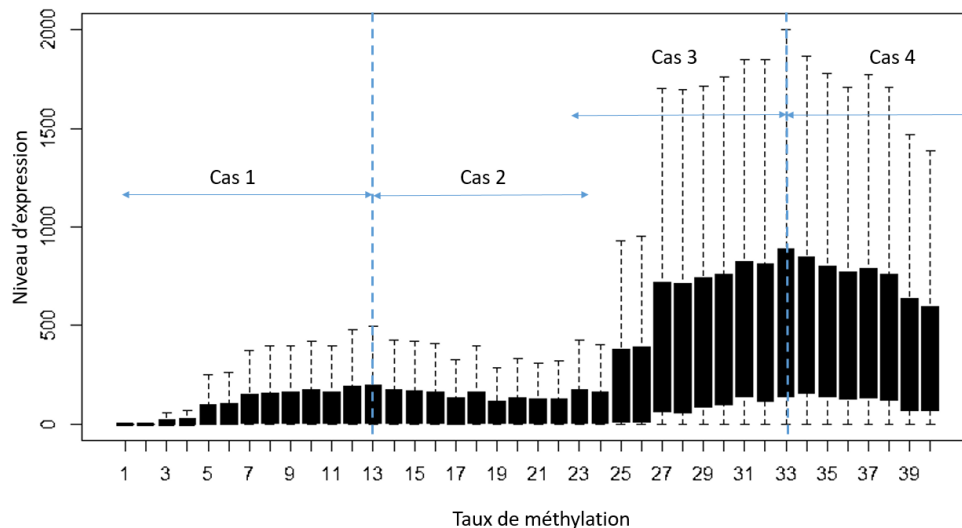


Figure 23 : Lien entre méthylation de l'ADN et expression des gènes mise en évidence lors de l'expérience d'exposition à la microflore environnementale.

Les ventiles avec un nombre de gènes identiques ont été triés par taux global de méthylation intragénique et sont représentés en fonction de leur niveau d'expression moyen.

4 classes de gènes ont été identifiées : les gènes très faiblement méthylés et faiblement exprimés (cas 1), les gènes peu méthylés et faiblement exprimés (cas 2), les gènes fortement méthylés et fortement exprimés (cas 3) et les gènes très fortement méthylés et fortement exprimés (cas 4). Les optimums d'expression pour les gènes faiblement et fortement méthylés sont représentés en pointillé.

Afin d'étudier le lien entre différentiel de méthylation et différentiel d'expression dans le cadre d'un stress environnemental, il serait alors intéressant de regarder si les gènes potentiellement inductibles : Figure 23, cas 1 et 2, vont respectivement s'hyperméthyliser et s'hypométhyliser afin d'atteindre l'optimum d'expression des gènes faiblement méthylés. Ce travail dans le cadre de mon projet est en cours, tout comme l'annotation fonctionnelle des gènes différentiellement méthylés dont les résultats pourront éventuellement nous permettre de conclure sur le lien entre changements de méthylation de l'ADN et résultats phénotypiques.

Résultats principaux :

- Globalement, plus le niveau de méthylation intragénique est élevé, plus un gène est exprimé.
- Il existe des optimums de méthylation, au sein des gènes faiblement méthylés et des gènes fortement méthylés, qui correspondent à des maximums d'expression pour les gènes de cette catégorie.

Perspectives :

- ➔ Réaliser une annotation fonctionnelle des gènes liés aux DMRs identifiées.
- ➔ Les gènes inductibles tendent-ils vers l'optimum de méthylation correspondant au maximum d'expression ?

C. Les autres porteurs de l'information épigénétique

Actuellement, aucun cas de transmission transgénérationnelle de modifications d'histones dans la réponse environnementale n'a encore été montré chez les mollusques. C'est pourquoi l'idée de

départ de ma thèse était d'étudier les modifications post-traductionnelles des histones dans le cadre de l'exposition à la microflore environnementale. Pour cela, j'ai réalisé un travail de mise au point de la méthode d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) au début de ma thèse. Ce travail est présenté en annexe du présent manuscrit. Les résultats obtenus en qPCR ciblée étaient prometteurs et nous ont conduit à réaliser un séquençage massif de certains échantillons. Malheureusement, les résultats obtenus à la suite de ce séquençage ont présenté beaucoup de bruit de fond et n'ont pas permis une interprétation correcte des données. La mise au point du ChIP a été tentée sur d'autres espèces de mollusques dans notre unité, sans succès : l'huitre perlière, *Pinctada margaritifera* (Strenger P-L, communication personnelle) et l'escargot *Biomphalaria glabrata*, Lassica C., communication personnelle). L'étude des modifications d'histones chez les mollusques est donc limitée par les moyens techniques actuellement à notre disposition. Des travaux supplémentaires utilisant d'autres techniques pour appréhender les différents états chromatinien (ATAC-seq, FISH) sont donc nécessaires. Une des perspectives majeures de ces travaux serait aussi d'étudier l'implication des ARNs non codants dans la réponse environnementale transgénérationnelle, notamment afin d'identifier un éventuel transfert de l'information épigénétique via un transfert d'ARNs non codants entre génération.

Perspective :

- ➔ *Des études supplémentaires sont nécessaires pour étudier l'implication des autres porteurs de l'information épigénétique dans la réponse adaptative transgénérationnelle chez les huitres.*

4. Interactions entre génome et épigénome

Un effet famille sur le clustering de la méthylation de l'ADN a été révélé dans le cadre de l'étude sur le stress biotique. Ces deux familles sont génétiquement distinctes, ce clustering suggère alors un lien fort entre génome et épigénome. Ce lien est attendu compte tenu de l'interdépendance entre génome et épigénome. Nous avons vu que les mécanismes épigénétiques jouent un rôle dans l'expression des gènes, mais aussi dans la réparation des mutations, la réplication de l'ADN et l'inactivation des éléments transposables. D'autre part, la méthylation de l'ADN n'est pas aléatoire et est notamment guidée par les informations présentes dans la séquence d'ADN, de façon cellule spécifique (Lienert et al., 2011; Cedar & Bergman, 2012). Les modifications d'histones sont également établies en partie via des signaux produits par la séquence génomique. Ainsi, les complexes répressifs Polycomb sont préférentiellement associés à des régions génomiques particulières (Tanay et al., 2007; Ku et al., 2008). Des liens entre génome et épigénome ont également été mis en évidence par des études sur le cancer (Figure 24).

L'implication de mutations dans les gènes codants pour des régulateurs de mécanismes épigénétique a ainsi été avérée dans le développement des cellules cancéreuses (voir Shen & Laird, 2013 pour une review). Il est donc envisageable que des mutations aient provoqué les épimutations observées. Cependant, aucune indication de sélection des phénotypes qui sont directement liés à des mutations génétiques, provoquant ainsi un biais dans la fréquence allélique suivant l'exposition, n'a été observée.

Résultat principal :

- *Le génome et l'épigénome sont en interaction et œuvrent de concert dans l'établissement du phénotype.*

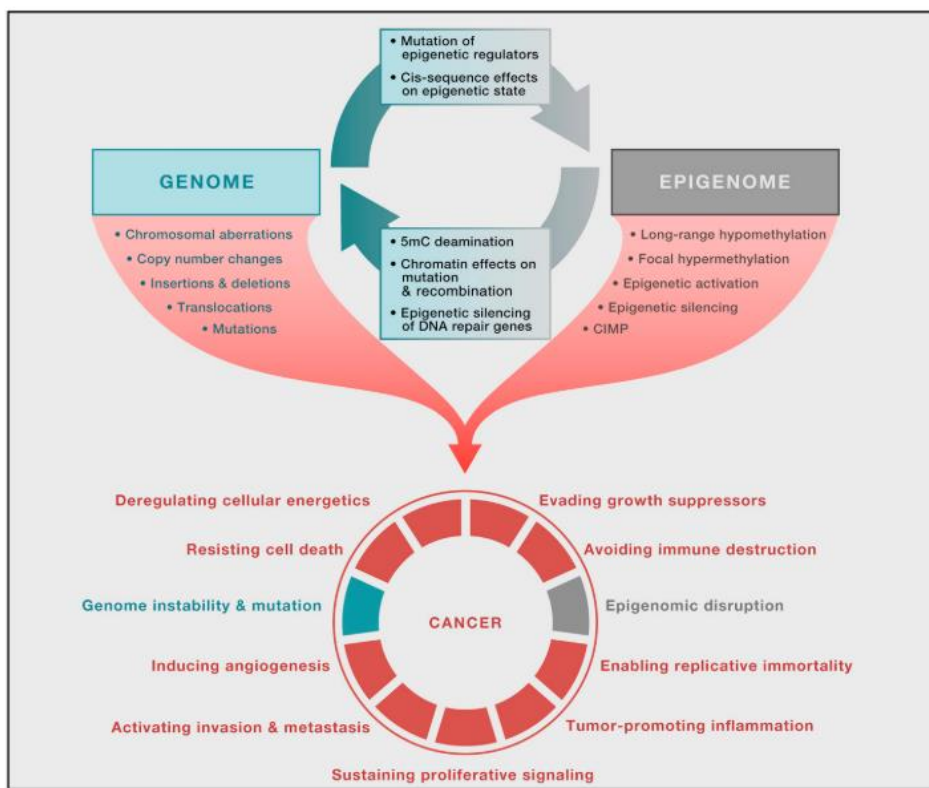


Figure 24 : Relations entre génome et épigénome dans le cancer.

Le génome et l'épigénome interagissent ensemble pour générer la variabilité phénotypique et parfois générer des phénotypes conduisant à l'émergence de cancers.

D'après Shen & Laird, 2013

Les résultats issus de l'étude sur l'exposition à la microflore environnementale sont représentés schématiquement sur la figure 25.

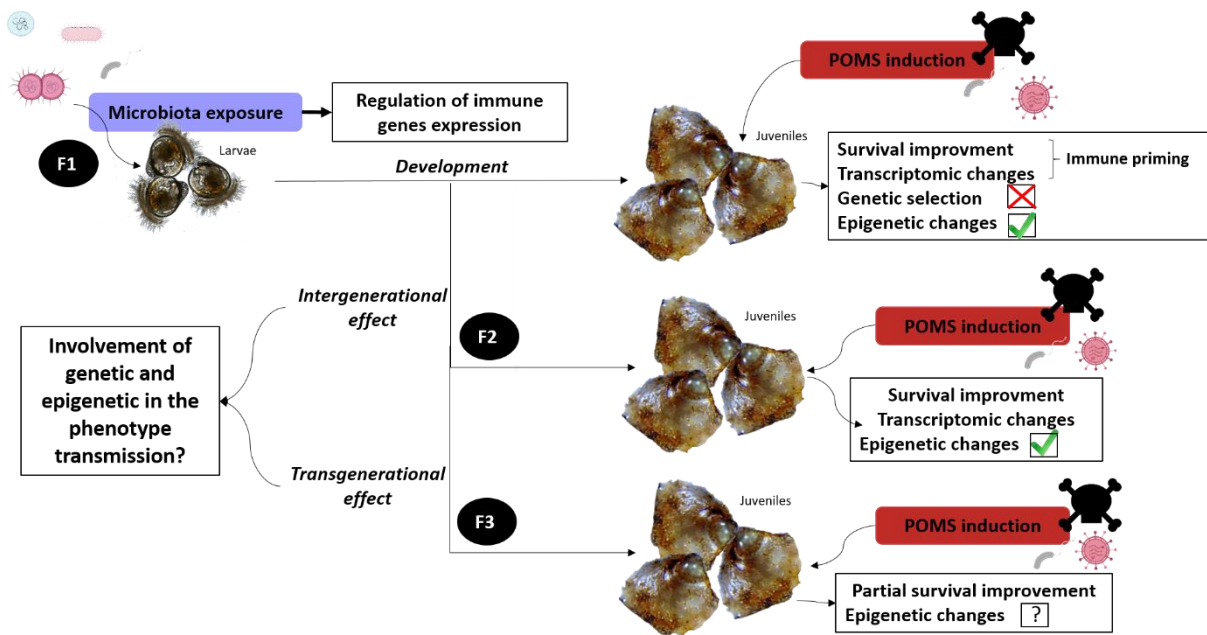


Figure 25 : Schéma illustrant les principaux résultats obtenus dans le cadre de l'étude sur l'exposition à la microflore environnementale.

L'exposition à l'eau enrichie en microorganismes, pendant les stades larvaires, a entraîné une modification du microbiote des huitres. Ce changement de microbiote a entraîné une régulation transcriptomique, notamment au niveau de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Lors de l'induction du syndrome POMS au stade juvénile, les huitres exposées ont montré une survie améliorée et une surexpression de gènes de l'immunité, par rapport aux huitres contrôles. Des DMRs liées à l'exposition larvaire ont été identifiées, en revanche aucune preuve de sélection génétique issue de cette exposition n'a été décelée. Le phénotype de réponse améliorée au syndrome POMS dans la condition exposée, a été retrouvé aux générations F2 et F3 bien que celles-ci n'aient pas subies l'exposition larvaire. Cela a mis en évidence l'occurrence d'un priming immunitaire transgénérationnel.

II. Résultats supplémentaires

1. Caractéristiques générales du méthylome des huitres

Les deux études expérimentales présentées dans cette thèse ont permis de vérifier les connaissances portant sur la méthylation de l'ADN chez *C. gigas*. L'huitre creuse possède bien un patron de méthylation de type mosaïque avec une succession de large régions méthylées séparées par de larges régions non méthylées (Sarda et al., 2012). Le pourcentage de cytosines méthylées est d'environ 16.6% du total de cytosines, résultat cohérent avec celui de 15% observé par Olson et Robert (2014) et proche de la fourchette de pourcentage de méthylation des cytosines estimée chez les mollusques (5-15%). Ce pourcentage équivaut à environ 2% par rapport au nombre de cytosines total (2% trouvé dans l'étude sur le diuron et une moyenne de 1.67% observée dans l'étude sur l'exposition à la microflore environnementale. Enfin les cytosines méthylées sont principalement retrouvées dans les îlots CpGs* (Wang et al., 2014).

Durant l'expérience d'exposition à la microflore environnementale, un changement du niveau global de méthylation des cytosines a été mis en évidence. Ce taux de méthylation global des cytosines est

significativement plus élevé pendant les stades larvaires qu'au stade juvénile et ce sur les deux familles et les deux générations étudiées. Un résultat opposé, montrant une augmentation de la méthylation après métamorphose a été produit par Rivière et al (2017), mais uniquement dans les exons et non pas au niveau global. Il est alors possible qu'au cours du développement, la méthylation des exons des larves d'huitres augmente tandis que les méthylations intergénique et intronique diminuent. Enfin, il a été observé que des gènes codants pour la machinerie de méthylation de l'ADN sont surexprimés dans les tissus des gonades par rapport aux tissus somatiques (Riviere et al., 2013), cette observation pourrait contribuer à expliquer l'hyperméthylation que nous avons observée chez les stades larvaires par rapport au stade juvénile. Il est possible que le niveau de méthylation de l'ADN soit élevé dans les cellules germinales et les stades de développement précoce afin d'induire l'expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et le développement. A la fin du développement, ces gènes n'ont plus besoin d'être fortement exprimés et pourraient alors s'hypométyler.

Perspective :

- ➔ *Comparer le niveau de méthylation entre stade du développement et regarder si des différences existent sur les gènes liés au développement.*

2. Certaines phases du développement sont plus sensibles aux stimuli environnementaux

A. Stades entourant la conception

L'expérience avec le diruon a été réalisée au début et pendant la gamétogénèse des huitres. Le stimulus environnemental sur les parents pendant cette phase de gamétogénèse, a suffi à induire le phénotype chez la descendance F1. Le stimulus environnemental a alors été transmis du soma à la lignée germinale des parents. La période entourant la conception chez les mammifères a également été identifiée comme une fenêtre développementale sur laquelle les stimuli environnementaux agissent particulièrement (Watkins et al., 2010).

B. Stades précoces de développement

L'exposition à la microflore environnementale a été effectuée sur les stades larvaires (juste après la fécondation et pendant 10 jours). Cette exposition précoce a permis d'influer sur le phénotype juvénile et a eu des conséquences majeures sur le transcriptome des huitres avec de nombreux changements d'expression de gènes entre condition exposée et non exposée sur deux générations (F1 et F2). Ce résultat contribue à confirmer la sensibilité des stades précoces de développement aux stimuli environnementaux, une exposition environnementale à ces stades contribue à modifier durablement le phénotype des individus et ce de façon transgénérationnelle. L'importance de telles

fenêtres développementales dans la réponse aux changements de l'environnement a été constatée chez de nombreux organismes. Ainsi, des changements abiotiques comme l'augmentation de l'acidification de l'eau affecte la fertilisation, la fixation et l'éclosion chez les invertébrés calcifiés (Kurihara, 2008) et altèrent le comportement et les capacités sensorielles des larves de poissons (Pankhurst & Munday, 2011). Plus une exposition à un environnement salé est faite de manière précoce chez la plante *Sorghum bicolor*, plus celle-ci montrera une résistance au sel au stade adulte (Amzallag et al., 1993) ; ou encore l'augmentation de la température va affecter la survie des œufs de poissons, la taille de ponte mais également le développement et la survie des larves (Pankhurst & Munday, 2011). Des indices environnementaux biotiques vont également jouer un rôle clef pendant les stades de développement, induisant la mise en place de phénotypes particuliers. Les embryons de tritons éclosent plus vite et sont de plus petite taille lorsqu'ils ont été exposés à des molécules chimiques issues de prédateurs mais seulement s'ils ont été exposés dès le premier jour du développement (Lehman & Campbell, 2007) et les punaises *Riptortus pedestris* vont préférentiellement acquérir leur symbiote *Burkholderia* pendant certains stades de développement des nymphes (Kikuchi et al., 2011).

C. Généralités sur le lien entre fenêtre développementale et plasticité phénotypique

Fawcett et Frankenhuis (2015) ont cherché à expliquer le potentiel adaptatif de l'existence de telles fenêtres développementales. Ils ont réalisé une étude de la littérature concernant la sensibilité de différents organismes à l'environnement, au cours de certaines fenêtres développementales. De leur étude émergent différentes explications quant à la sensibilité des stades prénataux et développementaux. Ainsi, les informations transmises de façon héréditaires des parents aux enfants pourraient constituer des indices plus fiables de l'environnement, via un filtre de l'information et une réduction du bruit de fond, que ceux que la descendance expérimentera elle-même (Fawcett & Frankenhuis, 2015). Cela pourrait expliquer la sensibilité aux stimuli environnementaux des cellules germinales et des stades en gestation. D'autre part, la sensibilité aux paramètres environnementaux et le taux d'incertitude au sujet de l'environnement futur, devraient coïncider. Or c'est généralement pendant les étapes précoces de développement, alors que les organismes n'ont pas encore pu pleinement découvrir leur environnement, que cette incertitude est la plus forte (Fawcett & Frankenhuis, 2015). Les espèces vivant dans des environnements très fluctuants ou pour lesquelles les descendants ont tendance à se disperser (exemple des organismes territoriaux), devraient être plus plastiques. Cette théorie est appelée bet-hedging (Villa Martín et al., 2019). Par ailleurs, les fenêtres développementales sont susceptibles de varier en fonction de la nature des indices environnementaux. Un indice concernant la compétition sexuelle devrait avoir un plus fort impact sur les périodes de

reproduction que pendant les stades larvaires (Fawcett & Frankenhuis, 2015). Enfin, la sensibilité des individus aux stimuli environnementaux et leur plasticité phénotypique devrait diminuer avec l'âge, les individus plus âgés ayant plus d'expérience et connaissant les conditions environnementales dans lesquelles ils vivent (Fawcett & Frankenhuis, 2015).

La plasticité phénotypique constitue donc une source potentielle d'adaptation des organismes à leur environnement. C'est un mécanisme de réponse rapide pouvant permettre aux organismes de s'adapter aux environnements fluctuants. Chez une même espèce l'allocation des ressources dans différentes stratégies peut survenir en fonction des coûts et bénéfices que procureront telles ou telles stratégies dans un environnement donné, on parle alors de trade-offs (Kaitala, 1991; Jordan & Snell, 2002).

Réflexions générales

I. L'épigénétique dans l'évolution adaptative des mollusques

Au cours du travail bibliographique, présenté au chapitre 1 de ce manuscrit, trois grandes questions à étudier pour appréhender la nature évolutive et adaptative de l'information épigénétique ont été identifiées. Revenons ici, sur ces trois grandes questions, sur les réponses qui ont été apportées via ce travail de thèse, ainsi que sur les éléments qui nécessitent de plus amples investigations. Voici les trois questions :

- Comment, et à quel point les états chromatinien sont liés à la variabilité phénotypique au cours des générations ?
- Les états chromatinien transmissibles ont-ils une nature adaptative ?
- Les états chromatinien sont-ils véritablement des véhicules d'une partie de l'information héréditaire ?

Pour répondre à la première question, il est nécessaire de tester si un facteur environnemental peut induire à la fois des changements chromatinien et phénotypique transmissibles spécifiques. Puis de tester si la réversibilité du phénotype et des marques épigénétiques suit la même dynamique. Et enfin de tester si le phénotype et les états chromatinien sont transmis de la même façon asymétrique entre mâle et femelle. Au cours de ma thèse, j'ai montré qu'un facteur environnemental peut effectivement induire un changement phénotypique et un changement épigénétique transmissible. Les deux autres points restent à investiguer.

La deuxième question met en avant la nécessité d'étudier la validité de l'indice environnemental comme informatif des conditions environnementales dans lesquelles va évoluer la

descendance et de tester l'effet des changements épigénétiques sur la fitness des individus. Le premier point a été vérifié dans le cadre de l'exposition à la microflore environnementale : la microflore environnementale était issue du milieu naturel et consiste donc en un indice fiable de la composition bactérienne de l'habitat futur des huîtres. Le deuxième point peut être étudié dans cette thèse, il faudrait alors vérifier si les DMRS sont ciblées ou aléatoires.

Pour répondre à la troisième question, il faudrait suivre le cheminement de l'information épigénétique entre les différentes cellules, les différents tissus et les différentes générations pour comprendre comment cette information peut être transmise (directement en échappant à la reprogrammation épigénétique ou indirectement via d'autres protéines, enzymes ou micro ARNs). A l'heure actuelle, aucune étude n'a réalisé cet objectif chez les mollusques. Cette question reste donc une question ouverte. Un des moyens envisageables pour répondre à cette question serait l'utilisation de méthode de type CRISP-cas afin de produire des changements ciblés dans l'information épigénétique et de suivre la transmission de ces changements entre cellules.

II. Importance des effets transgénérationnels dans la réponse aux changements globaux

Les questions théoriques ayant pour base le processus d'évolution sont nombreuses allant des interrogations portant sur l'origine de la vie, à l'évolution de l'espèce humaine en passant par les phénomènes de spéciation. L'étude de l'évolution biologique est également une nécessité au niveau pratique, pour la santé humaine (évolution des interactions hôtes-pathogènes et parasites, évolution des cellules cancéreuses), pour la lutte contre les espèces invasives et les ravageurs de culture en agriculture, mais également dans un cadre de conservation afin de comprendre comment préserver les ressources planétaires et comment les espèces actuelles vont pouvoir répondre aux changements climatiques. Or actuellement, se pose la question de l'entrée dans une nouvelle ère géologique : l'anthropocène (Figure 3). Ceci à cause de l'impact global de l'Homme sur l'écosystème (Vitousek et al., 1997), la première cause de changement environnemental de cette ère étant l'activité humaine (Lewis & Maslin, 2015). De plus, nous faisons face à une nouvelle crise d'extinction : la 6^{ème} crise majeure d'extinction (Ceballos et al., 2010). Celle-ci diffère des autres par sa surprenante rapidité et par le rôle majeur que joue l'espèce humaine dans son déclenchement. En effet, l'influence grandissante de l'Homme sur son environnement a conduit à de profondes modifications dans le fonctionnement de notre planète : émission de gaz à effet de serre et réchauffement climatique, raréfaction des ressources fossiles, relargage de polluants toxiques dans l'environnement, diminution des habitats naturels, surexploitation et appauvrissement des sols ainsi que l'importation d'espèces invasives menaçant les espèces endémiques (Western, 2001; Ceballos et al., 2010) (Figure 4).

Ces changements fragilisent les écosystèmes établis et pourvoient à l'apparition de nouvelles maladies et menaces touchant les populations naturelles, qui sont obligées de s'adapter pour survivre. Les espèces ne parvenant pas à s'adapter rapidement finissent par disparaître. Ainsi l'IPBES, (Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services), organisme relevant de l'ONU et mis en place en 2012 afin de rendre compte des enjeux de la biodiversité, estime à plus d'un million le nombre d'espèces qui va disparaître dans les prochaines années (Dziba et al., 2019).

Cette perte de biodiversité constitue une catastrophe biologique mais elle a également des répercussions majeures sur l'humanité (Díaz et al., 2006). Les espèces sont en interactions complexes les unes avec les autres et la disparition de quelques-unes peut entraîner l'effondrement de l'écosystème dans sa globalité (exemple de la disparition des insectes pollinisateurs) (Chapin et al., 2000). Les espèces vivantes ont donc des rôles variés dans la nature et elles assurent ainsi des services nécessaires à la vie humaine et au développement de nos sociétés (Figure 5) : maintien des sols, sources de nourriture, réserve de ressources pour la santé humaine (50% des médicaments sous ordonnance sont faits à base de plantes, 70% des traitements anti-cancéreux sont naturels ou sont des productions synthétiques inspirées par la nature), pollinisation, régulation du climat. Ainsi ces disparitions d'espèces peuvent avoir des conséquences catastrophiques, sans même parler des pertes culturelles et récréatives liées au rapport qu'entretient l'Homme avec la nature.

Dans ce contexte de changement global, les effets transgénérationnels peuvent prendre une place très importante dans la survie et l'adaptation des espèces. En effet, de nombreux effets transgénérationnels ont été identifiés comme adaptatifs (Galloway & Etterson, 2007; Holeski et al., 2012; Shama & Wegner, 2014; Shama et al., 2014; Calosi et al., 2016; Herman & Sultan, 2016; Ross et al., 2016b; Norouzitallab et al., 2016b; Donelson et al., 2018; Weinhold, 2018; Zhao et al., 2018; Yin et al., 2019; Tariel et al., 2019). Les bases non génétiques de ces changements transgénérationnels sont à étudier afin de comprendre comment ils se mettent en place et sont transmis au cours des générations.

Références bibliographiques

- A.D., F. & Q., A. (2014) Mechanisms and management of functional abdominal pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 107, 347–354.
- ADEMA, C.M., HANINGTON, P.C., LUN, C.M., ROSENBERG, G.H., ARAGON, A.D., STOUT, B.A., ET AL. (2010) Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Molecular Immunology*, 47, 849–860.
- ADEREM, A. (2005) Systems biology: Its practice and challenges. *Cell*, 121, 511–513. Elsevier Inc.
- AFGAN, E., BAKER, D., MARIUS, VAN DEN BEEK DANIEL, B., DAVE, B., MARTIN, Č., JOHN, C., ET AL. (2016) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*.
- AGRAWAL A. A. (1998) Induced Responses to Herbivory and Increased Plant Performance. *Science*, 279, 1201–1202.
- AGRAWAL, A. A, LAFORSCH, C. & TOLLRIAN, R. (1999) Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401, 60–63.
- AKALIN, A., KORMAKSSON, M., LI, S., GARRETT-BAKELMAN, F.E., FIGUEROA, M.E., MELNICK, A. & MASON, C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol*, 13, R87.
- AKCHA, F., BARRANGER, A., BACHERE, E., BERTHELIN, C.H., PIQUEMAL, D., ALONSO, P., ET AL. (2016) Effects of an environmentally relevant concentration of diuron on oyster genitors during gametogenesis: responses of early molecular and cellular markers and physiological impacts. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 8008–8020.
- AKCHA, F., SPAGNOL, C. & ROUXEL, J. (2012) Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106–107, 104–113. Elsevier B.V.
- ALBIG, W., WARTHORST, U., DRABENT, B., PRATS, E., CORNUDELLA, L. & DOENECKE, D. (2003) *Mytilus edulis* core histone genes are organized in two clusters devoid of linker histone genes. *Journal of Molecular Evolution*, 56, 597–606.
- ALEXANDER, J.M. & LOMVARDAS, S. (2014) Nuclear architecture as an epigenetic regulator of neural development and function. *Neuroscience*, 264, 39–50. IBRO.
- ALIAGA, B., BULLA, I., MOUAHID, G., DUVAL, D. & GRUNAU, C. (2019) Universality of the DNA methylation codes in Eucaryotes. *Scientific Reports*, 9, 1–11.
- ALLEN, J., WEINRICH, M., HOPPITT, W. & RENDELL, L. (2013) Network-Based Diffusion Analysis Reveals Cultural Transmission of Lobtail Feeding in Humpback Whales. *Science*, 340, 485–488.
- ALONSO-MAGDALENA, P., RIVERA, F.J. & GUERRERO-BOSAGNA, C. (2016) Bisphenol-A and metabolic diseases: epigenetic, developmental and transgenerational basis. *Environmental Epigenetics*, 2, 1–10.
- AMBROSI, C., MANZO, M. & BAUBEC, T. (2017) Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, 429, 1459–1475. Elsevier Ltd.
- AMZALLAG, G.N., SELIGMANN, H. & LERNER, H.R. (1993) A developmental window for salt-adaptation in *Sorghum bicolor*. *Journal of Experimental Botany*, 44, 645–652.

- ANDERSON, K. V (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current opinion in immunology*, 12, 13–19. Elsevier.
- ANDREWS, S. (2014) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. In <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> p. .
- ANGLES D'AURIAC, M.B., RINDE, E., NORLING, P., LAPEGUE, S., STAALSTRØM, A., HJERMANN, D. & THAULOW, J. (2017) Rapid expansion of the invasive oyster *Crassostrea gigas* at its northern distribution limit in Europe: Naturally dispersed or introduced? *PLoS ONE*, 12, 1–20.
- ARDURA, A., ZAIKO, A., MORAN, P., PLANES, S. & GARCIA-VAZQUEZ, E. (2017) Epigenetic signatures of invasive status in populations of marine invertebrates. *Scientific Reports*, 7, 42193. Nature Publishing Group.
- ARICAN-GOKTAS, H.D., ITTIPRASERT, W., BRIDGER, J.M. & KNIGHT, M. (2014) Differential Spatial Repositioning of Activated Genes in Biomphalaria glabrata Snails Infected with Schistosoma mansoni. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8.
- ARMBRUSTER, G.F.J., BÖHME, M., BERNHARD, D. & SCHLEGEL, M. (2005) The H3/H4 histone gene cluster of land snails (Gastropoda: Stylommatophora): TS/TV Ratio, GC3 drive and signals in stylommatophoran phylogeny. *Journal of Molluscan Studies*, 71, 339–348.
- AUBERT, J.D. & SAUTY, A. (2011) Biologie cellulaire et maladies pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires Actualites*, 3, 2–10.
- AUSIO, J. (1992) Presence of a highly specific histone H1-like protein in the chromatin of the sperm of the bivalve mollusks. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 115, 163–172.
- BACHERE, E., GUEGUEN, Y., GONZALEZ, M., DE LORGERIL, J., GARNIER, J. & ROMESTAND, B. (2004) Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 198, 149–168.
- 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 and Shellfish Immunology*, 46, 50–64.
- BÄCKHED, F., LEY, R.E., SONNENBURG, J.L., PETERSON, D.A. & GORDON, J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915–1920.
- BAI, C., WANG, C., XIA, J., SUN, H., ZHANG, S. & HUANG, J. (2015) Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of invertebrate pathology*, 124, 98–106. Elsevier.
- BAINTNER, K. (2007) Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, 153–161.
- BAL, N., KUMAR, A. & NUGEGODA, D. (2017) Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Journal of Hazardous Materials*, 339, 281–291. Elsevier B.V.
- BANTIGNIES, F. & CAVALLI, G. (2011) Polycomb group proteins: Repression in 3D. *Trends in Genetics*, 27, 454–464.
- BAO, N., LYE, K. & BARTON, M.K. (2004) MicroRNA Binding Sites in Arabidopsis Class III HD-ZIP mRNAs Are Required for Methylation of the Template Chromosome, 7, 653–662.

- 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. Elsevier Inc.
- BARNES, P.J. (1990) Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 235–243.
- BARRANGER, A., AKCHA, F., ROUXEL, J., BRIZARD, R., MAUROUARD, E., PALLUD, M., ET AL. (2014) Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquatic Toxicology*, 146, 93–104. Elsevier B.V.
- BARTH, T.K. & IMHOF, A. (2010) Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 618–626. Elsevier Ltd.
- BARTOLOMEI, M.S. & FERGUSON-SMITH, A.C. (2011) Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1–17.
- BAULCOMBE, D.C. & DEAN, C. (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6.
- BAZZAZ, F.A., CHIARIELLO, N.R., COLEY, P.D. & PITELKA, L.F. (2009) Allocating Resources to Reproduction and Defense. *BioScience*, 37, 58–67.
- BEAMAN, J.E., WHITE, C.R. & SEEBACHER, F. (2016) Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. *Trends in Ecology and Evolution*, 31, 237–249. Elsevier Ltd.
- BEARFIELD, C., DAVENPORT, E.S., SIVAPATHASUNDARAM, V. & ALLAKER, R.P. (2002) Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109, 527–533.
- BEATY, L.E., WORMINGTON, J.D., KENSINGER, B.J., BAYLEY, K.N., GOEPFNER, S.R., GUSTAFSON, K.D. & LUTTBEG, B. (2016) Shaped by the past, acting in the present: transgenerational plasticity of anti-predatory traits. *Oikos*, 125, 1570–1576.
- BEAZ-HIDALGO, R., BALBOA, S., ROMALDE, J.L. & FIGUERAS, M.J. (2010) Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 34–43.
- BELLARD, C., BERTELSMEIER, C., LEADLEY, P., THUILLER, W. & COURCHAMP, F. (2012) Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15, 365–377.
- BENTLEY, G.A., LEWIT-BENTLEY, A., FINCH, J.T., PODJARNY, A.D. & ROTH, M. (1984) Crystal structure of the nucleosome core particle at 16 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 176, 55–75.
- BERTINI, I., MANGANL, S. & VIEZZOLI, M.S. (1998) Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. In *Advances in inorganic chemistry* pp. 127–250. Elsevier.
- BESNARD-COCHENNEC, N. (2001) *Bonamia ostreae*, parasite de l'huître plate, *Ostrea edulis*: sa position taxonomique parmi les parasites du groupe 'microcell', analyses des interactions hôte/parasite chez plusieurs populations d'huîtres plates. Université de La Rochelle.
- BEWICK, A.J., VOGEL, K.J., MOORE, A.J. & SCHMITZ, R.J. (2017) Evolution of DNA methylation across insects. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 654–665.
- BHUTANI, N., BURNS, D.M. & BLAU, H.M. (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell*, 146, 866–872. Elsevier Inc.

- BIGGAR, K.K., KORNFELD, S.F., MAISTROVSKI, Y. & STOREY, K.B. (2012) MicroRNA Regulation in Extreme Environments: Differential Expression of MicroRNAs in the Intertidal Snail *Littorina littorea* During Extended Periods of Freezing and Anoxia. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 10, 302–309. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China.
- BIRD, A.P. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321, 209–211.
- BOITARD, S., KOFLER, R., FRANÇOISE, P., ROBELIN, D., SCHLÖTTERER, C. & FUTSCHIK, A. (2013) Pool-hmm: A Python program for estimating the allele frequency spectrum and detecting selective sweeps from next generation sequencing of pooled samples. *Molecular Ecology Resources*, 13, 337–340.
- BONDURIANSKY, R. (2012) Rethinking heredity, again. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 330–336.
- BONDURIANSKY, R. & DAY, T. (2009) Nongenetic Inheritance and Its Evolutionary Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. .
- BONDURIANSKY, R. & DAY, T. (2018) Extended heredity: a new understanding of inheritance and evolution. Princeton University Press.
- BONHOMME, M., CHEVALET, C., SERVIN, B., BOITARD, S., ABDALLAH, J., BLOTT, S. & SANCRISTOBAL, M. (2010) Detecting selection in population trees: The Lewontin and Krakauer test extended. *Genetics*, 186, 241–262.
- BONNER, J.T. (2018) The evolution of culture in animals. Princeton University Press.
- BORGEL, J., GUIBERT, S., LI, Y., CHIBA, H., SCHÜBELER, D., SASAKI, H., ET AL. (2010) Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics*, 42, 1093–1100. Nature Publishing Group.
- BOUCHUT, A., SAUTIERE, P.E., COUSTAU, C. & MITTA, G. (2006) Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Tropica*, 98, 234–246.
- BOUILLY, K., BONNARD, M., GAGNAIRE, B., RENAULT, T. & LAPEGUE, S. (2007) Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 58–63.
- BOUILLY, K., CHAVES, R., FERNANDES, M. & GUEDES-PINTO, H. (2010) Histone H3 gene in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793: Molecular and cytogenetic characterisations. *Comparative Cytogenetics*, 4, 111–121.
- BOUILLY, K., CHAVES, R., LEITAO, A, BENABDELMOUNA, A & GUEDES-PINTO, H. (2008) Chromosomal organization of simple sequence repeats in chromosome patterns. *Journal of Genetics*, 87, 119–125.
- BOURC'HIS, D. & BESTOR, T.H. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431, 96–99.
- BOUTROS, M., AGAISSE, H. & PERRIMON, N. (2002) Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila* signaling pathways are activated upon microbial infection. In response to gram-positive and fungal infection, Toll triggers a transcriptional response through the. *Developmental Cell*, 3, 711–722.
- BOWMAN, J.C. (1972) GENOTYPE x ENVIRONMENT INTERACTIONS, 1.
- BOYKO, A., BLEVINS, T., YAO, Y., GOLUBOV, A., BILICHAK, A., ILNYTSKYI, Y., ET AL. (2010) Transgenerational

adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of dicer-like proteins. *PLoS ONE*, 5.

BRADSHAW, W.E. & HOLZAPFEL, C.M. (2001) Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 14509–14511.

BRADSHAW, W.E. & HOLZAPFEL, C.M. (2007) Evolution of Animal Photoperiodism. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 1–25.

BRADSHAW, W.E., QUEBODEAUX, M.C. & HOLZAPFEL, C.M. (2003) Circadian rhythmicity and photoperiodism in the pitcher-plant mosquito: Adaptive response to the photic environment or correlated response to the seasonal environment? *American Naturalist*, 161, 735–748.

BRANDT, C. (2008) Clones, Pure Lines, and Heredity: The Work of Victor Jollos. In *Heredity in the century of the gene (A cultural History of heredity IV)* pp. 139–148.

BRINKMAN, A.B., GU, H., BARTELS, S.J.J., ZHANG, Y., MATARESE, F., SIMMER, F., ET AL. (2012) Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Research*, 22, 1128–1138.

BROGDEN, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238–250.

BRUNK, C.F. & MARTIN, W.F. (2019) Archaeal Histone Contributions to the Origin of Eukaryotes. *Trends in Microbiology*, 27, 703–714. The Author(s).

BRUTO, M., JAMES, A., PETTON, B., LABREUCHE, Y., CHENIVESSE, S., ALUNNO-BRUSCIA, M., ET AL. (2017) *Vibrio crassostreae*, a benign oyster colonizer turned into a pathogen after plasmid acquisition. *ISME Journal*, 11, 1043–1052.

BUDDINGTON, R.K., WILLIAMS, C.H., KOSTEK, B.M., BUDDINGTON, K.K. & KULLEN, M.J. (2010) Maternal-to-infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97, 250–256.

BUHLER, M., VERDEL, A. & MOAZED, D. (2006) Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin- Dependent Gene Silencing. *Cell*, 873–886.

BUISSON, S., BOUCHART, V., GUERLET, E., MALAS, J.P. & COSTIL, K. (2008) Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43, 655–664.

BULET, P., STÖCKLIN, R. & MENIN, L. (2004) Anti-microbial peptides: From invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 169–184.

BURTON, T. & METCALFE, N.B. (2014) Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281.

CALARCO, J.P., BORGES, F., DONOGHUE, M.T.A., VAN EX, F., JULLIEN, P.E., LOPES, T., ET AL. (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell*, 151, 194–205.

CALOSI, P., DE WIT, P., THOR, P. & DUPONT, S. (2016) Will life find a way? Evolution of marine species under global change. *Evolutionary Applications*, 9, 1035–1042.

- CANESI, L., GALLO, G., GAVIOLI, M. & PRUZZO, C. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57, 469–476.
- CANTONE, I. & FISHER, A.G. (2013) Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology*, 20, 282–289. Nature Publishing Group.
- CAO, J. & YAN, Q. (2012) Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in Oncology*, 2, 1–9.
- LE CAO, K.-A., ROHART, F., GONZALEZ, I. & LE CAO, M.K.-A. (2018) Package ‘mixOmics’.
- CAQUET, T., ROUCAUTE, M., MAZZELLA, N., DELMAS, F., MADIGOU, C., FARCY, E., ET AL. (2013) Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 651–666.
- CARSON, W.F., CAVASSANI, K.A., DOU, Y. & KUNKEL, S.L. (2011) Epigenetic regulation of immune cell functions during post-septic immunosuppression. *Epigenetics*, 6, 273–283.
- CEBALLOS, G., GARCIA, A. & EHRlich, P.R. (2010) The Sixth Extinction Crisis Loss of Animal Populations and Species. *Journal of Cosmology*, 8, 1821–1831.
- CEDAR, H. & BERGMAN, Y. (2012) Programming of DNA Methylation Patterns. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 97–117.
- CHAMPAGNE, F.A. (2008) Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 386–397.
- CHAPIN, F.S., ZAVALA, E.S., EVINER, V.T., NAYLOR, R.L., VITOUSEK, P.M., REYNOLDS, H.L., ET AL. (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405, 234–242.
- CHEN, Q.Q., YAN, M., CAO, Z., LI, X., ZHANG, Y.Y., SHI, J., ET AL. (2015) Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science*, 7977.
- CHEN, S., CAI, D., PEARCE, K., SUN, P.Y.W., ROBERTS, A.C. & GLANZMAN, D.L. (2014) Reinstatement of long-term memory following erasure of its behavioral and synaptic expression in *Aplysia*. *eLife*, 3, 1–21.
- CHENG, S.-C., QUINTIN, J., CRAMER, R.A., SHEPARDSON, K.M., SAEED, S., KUMAR, V., ET AL. (2014) mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345, 1250684. American Association for the Advancement of Science.
- CHERRY, J.L. (2018) Methylation-induced hypermutation in natural populations of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 200.
- CHEVIN, L.M. & LANDE, R. (2015) Evolution of environmental cues for phenotypic plasticity. *Evolution*, 69, 2767–2775.
- CHINNUSAMY, V. & ZHU, J.K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 133–139.
- CHUANG, J.C., JONES, P.A., C, M.B.J.C., NORRIS, U.S.C. & CANCER, C. (2007) Epigenetics and MicroRNAs. *PEDIATRIC RESEARCH*, 61, 24–29.
- CIABRELLI, F., COMOGLIO, F., FELLOUS, S., BONEV, B., NINOVA, M., SZABO, Q., ET AL. (2017) Stable Polycomb-dependent transgenerational inheritance of chromatin states in *Drosophila*. *Nature Genetics*, 49, 876–886.

- CLERISSI, C., LORGERIL, J. DE, PETTON, B., LUCASSON, A., ESCOUBAS, J.-M., GUEGUEN, Y., ET AL. (2018) Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *bioRxiv*, 378125.
- COLLADO, M.C., BÄUERL, C. & PEREZ-MARTINEZ, G. (2012) Defining microbiota for developing new probiotics. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 23.
- COLLOTTA, M., BERTAZZI, P.A. & BOLLATI, V. (2013) Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35–41. Elsevier.
- COMPS, M. & DUTHOIT, J.-L. (1976) Infection virale associée à la ‘maladie des branchies’ de l’huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. *Comptes Rendus Académie des Sciences de Paris*, 283, 1595–1597.
- COOPER, D.N. & YOUSSEFIAN, H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics*, 78, 151–155.
- COSSEAU, C., AZZI, A., SMITH, K., FREITAG, M., MITTA, G. & GRUNAU, C. (2009) Native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) and ChIP-Seq of *Schistosoma mansoni*: Critical experimental parameters. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 166, 70–76.
- COSSEAU, C., WOLKENHAUER, O., PADALINO, G., GEYER, K.K., HOFFMANN, K.F. & GRUNAU, C. (2017) (Epi)genetic Inheritance in *Schistosoma mansoni*: A Systems Approach. *Trends in Parasitology*, 33, 285–294.
- COSTELLO, J.F., FRÜHWALD, M.C., SMIRAGLIA, D.J., RUSH, L.J., ROBERTSON, G.P., GAO, X., ET AL. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature Genetics*, 24, 132–138.
- CREAN, A.J. & BONDURIANSKY, R. (2014) What is a paternal effect? Elsevier Ltd. *Trends in Ecology and Evolution*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2014.07.009>.
- CREMER, C., MÜNDEL, C., GRANZOW, M., JAUCH, A., DIETZEL, S., EILS, R., ET AL. (1996) Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 366, 97–116. Elsevier.
- CREMER, T. & CREMER, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature*, 2, 292–303.
- CREMER, T., CREMER, M., DIETZEL, S., MU, S., SOLOVEI, I. & FAKAN, S. (2006) Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Cell Biology*, 307–316.
- DANCHIN, É., CHARMANTIER, A., CHAMPAGNE, F.A., MESOUDI, A., PUJOL, B. & BLANCHET, S. (2011) Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution. *Nature reviews. Genetics*, 12, 475–486.
- DANCHIN, É. & WAGNER, R.H. (2010) Inclusive heritability: Combining genetic and non-genetic information to study animal behavior and culture. *Oikos*, 119, 210–218.
- DANILOVA, A.B. & GRINKEVICH, L.N. (2012) Failure of long-term memory formation in juvenile snails is determined by acetylation status of histone H3 and can be improved by NaB treatment. *PLoS ONE*, 7.
- DANILOVA, A.B., KHARCHENKO, O.A., SHEVCHENKO, K.G. & GRINKEVICH, L.N. (2010) Histone H3 Acetylation is Asymmetrically Induced Upon Learning in Identified Neurons of the Food Aversion Network in the Mollusk *Helix Lucorum*. *Frontiers in Behavioral neuroscience*, 4, 1–7.

- DARNELL, J.E., KERR, I.M. & STARK, G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415–1421.
- DARWIN, C. (1859) On the origins of species by means of natural selection. *London: Murray*, 1–313.
- DAXINGER, L. & WHITELAW, E. (2012) Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics*, 13, 153–162. Nature Publishing Group.
- DAY, T. & BONDURIANSKY, R. (2011) A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance. *The American Naturalist*, 178, 18–36.
- DELANDRE, C. & MARSHALL, O.J. (2019) United colours of chromatin? Developmental genome organisation in flies. *Biochemical Society Transactions*, 47, 691–700.
- DEMARTINO, G., UBOM, R., PROBES, M. & INFORMATION, S. (2002) letters to nature. *Nature*, 419, 407–411.
- 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.
- DIAS, B.G. & RESSLER, K.J. (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature neuroscience*, 17, 89–96.
- DIAZ-FREIJE, E., GESTAL, C., CASTELLANOS-MARTINEZ, S. & MORAN, P. (2014) The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. *Frontiers in Physiology*, 5, 1–7.
- DIAZ, S., FARGIONE, J., CHAPIN, F.S. & TILMAN, D. (2006) Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biology*. .
- DICKINS, T.E. & RAHMAN, Q. (2012) The extended evolutionary synthesis and the role of soft inheritance in evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20120273. The Royal Society.
- DOBIN, A., DAVIS, C.A., SCHLESINGER, F., DRENKOW, J., ZALESKI, C., JHA, S., ET AL. (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29, 15–21.
- DOMAZET-LOSO, T. & TAUTZ, D. (2008) An ancient evolutionary origin of genes associated with human genetic diseases. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 2699–2707.
- 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, 1–10.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2015) Parental effects enhance risk tolerance and performance in offspring. *Ecology*, 96, 2049–2055.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2018) Parental and embryonic experiences with predation risk affect prey offspring behaviour and performance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285.
- DONELAN, S.C. & TRUSSELL, G.C. (2018) Synergistic effects of parental and embryonic exposure to predation risk on prey offspring size at emergence. *Ecology*, 99, 68–78.
- DONELSON, J.M., SALINAS, S., MUNDAY, P.L. & SHAMA, L.N.S. (2018) Transgenerational plasticity and climate change experiments: Where do we go from here? *Global Change Biology*, 24, 13–34.

- DONEY, S.C., RUCKELSHAUS, M., DUFFY, J.E., BARRY, J.P., CHAN, F., ENGLISH, C.A., ET AL. (2012) Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Annu Rev Mar Sci*, 4, 11–37.
- DONOHUE, D.R. & BULTMAN, S.J. (2012) Metaboloepigenetics: Interrelationships between energy metabolism and epigenetic control of gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 227, 3169–3177.
- DÖRING, H.P. & STARLINGER, P. (1984) Barbara McClintock's controlling elements: Now at the DNA level. *Cell*, 39, 253–259.
- DOSKOCIL, J. & ŠORMOVA, Z. (1965) The occurrence of 5-methylcytosine in bacterial deoxyribonucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 95, 513–515.
- DOUDNA, J.A. & CHARPENTIER, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346.
- DRABENT, B., KIM, J.-S., ALBIG, W., PRATS, E., CORNUDELLA, L. & DOENECKE, D. (1999) Mytilus edulis histone gene clusters containing only H1 genes. *J. Mol. Evol.*, 49, 645–655.
- DUGAS, M.B. (2015) Commentary: Parental care and the proximate links between maternal effects and offspring fitness. *Oecologia*, 177, 1089–1092.
- DUNN, D.B. & SMITH, J.D. (1958) The occurrence of 6-methylaminopurine in deoxyribonucleic acids. *Biochemical Journal*, 68, 627–636.
- DUPERTHUY, M., SCHMITT, P., GARZON, E., CARO, A., ROSA, R.D., LE ROUX, F., ET AL. (2011) Use of OmpU porins for attachment and invasion of Crassostrea gigas immune cells by the oyster pathogen Vibrio splendidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2993–2998.
- DZIBA, L., ERPUL, G., FAZEL, A., FISCHER, M. & HERNANDEZ, A.M. (2019) Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services - ADVANCE UNEDITED VERSION – assessment Key messages.
- ECKEL, R.H., GRUNDY, S.M. & ZIMMET, P.Z. (2005) The Metabolic Syndrome. *Genomic and Precision Medicine: Primary Care: Third Edition*, 365, 283–299.
- EHRlich, M., GAMA-SOSA, M.A., CARREIRA, L.H., LJUNGDAHL, L.G., KUO, K.C. & GEHRKE, C.W. (1985) DNA methylation in thermophilic bacteria: N 4 -methylcytosine, 5-methylcytosine, and N 5 methyladenine . *Nucleic Acids Research*, 13, 1399–1412.
- EHRlich, M., WILSON, G.G., KUO, K.C. & GEHRKE, C.W. (1987) N4-Methylcytosine as a Minor Base in Bacterial DNA. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 169, 939–943.
- EIRIN-LOPEZ, J.M. & AUSIO, J. (2009) Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *BioEssays*, 31, 1062–1070.
- EIRIN-LOPEZ, J.M., GONZALEZ-TIZON, A.M., MARTINEZ, A. & MENDEZ, J. (2002) Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (Mytilus spp.): Possible evidence of an 'orphan origin' for H1 histone genes. *Journal of Molecular Evolution*, 55, 272–283.
- EIRIN-LOPEZ, J.M. & PUTNAM, H.M. (2018) Marine Environmental Epigenetics. *Annual Review of Marine Science*, 11, 335–368.
- EIRIN-LOPEZ, J.M., RUIZ, M.F., GONZALEZ-TIZON, A.M., MARTINEZ, A., SANCHEZ, L. & MENDEZ, J. (2004) Molecular Evolutionary Characterization of the Mussel Mytilus Histone Multigene Family: First

- Record of a Tandemly Repeated Unit of Five Histone Genes Containing an H1 Subtype with 'Orphon' Features. *Journal of Molecular Evolution*, 58, 131–144.
- EISENBERG, E. & LEVANON, E.Y. (2003) Human housekeeping genes are compact. *Trends in Genetics*, 19, 362–365.
- ENGLISH, S., PEN, I., SHEA, N. & ULLER, T. (2015) The information value of non-genetic inheritance in plants and animals. *PLoS ONE*, 10.
- ENRIQUEZ-DIAZ, M., POUVREAU, S., CHAVEZ-VILLALBA, J. & LE PENNEC, M. (2009) Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17, 491–506.
- 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, 293–298.
- ESCODIE, F., AUER, L., BERNARD, M., MARIADASSOU, M., CAUQUIL, L., VIDAL, K., ET AL. (2017) FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34, 1287–1294. Oxford University Press.
- EXTAVOUR, C.G. (2003) Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130, 5869–5884.
- FABIOUX, C. (2004) Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : intérêt pour le contrôle de la reproduction en éclosérie. Université de Bretagne occidentale - Brest.
- FABIOUX, C., HUVET, A., LELONG, C., ROBERT, R., POUVREAU, S., DANIEL, J., ET AL. (2004) Oyster vasa -like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 592–598.
- FABIOUX, C., HUVET, A., LE SOUCHU, P., LE PENNEC, M. & POUVREAU, S. (2005) Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250, 458–470.
- FALCKENHAYN, C., BOERJAN, B., RADDATZ, G., FROHME, M., SCHOOF, L. & LYKO, F. (2013) Characterization of genome methylation patterns in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 216, 1423–1429.
- FALLET, M. (2015) Master 2 Recherche – Biodiversité , Ecologie et Evolution 2015 Fallet Manon Species delimitation in the *Anomaloglossus baeobatrachus* (Amphibia : Anura : Dendrobatidae) species complex.
- FARIAS, N.D., DE OLIVEIRA, N.F.P. & DA SILVA, P.M. (2017) Perkinsus infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 76–81. Elsevier.
- FARIELLO, M.I., BOITARD, S., NAYA, H., SANCRISTOBAL, M. & SERVIN, B. (2013) Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics*, 193, 929–941.
- FAULK, C. & DOLINOY, D.C. (2011) Timing is everything The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals, 791–797.
- FAWCETT, T.W. & FRANKENHUIS, W.E. (2015) Adaptive explanations for sensitive windows in development. *Frontiers in Zoology*, 12, 1–14.

- FEDOROFF, N. V. (2012) Transposable elements, epigenetics, and genome evolution. *Science*, 338, 758–767.
- FELLOUS, A., FAVREL, P., GUO, X. & RIVIERE, G. (2014) The Jumonji gene family in *Crassostrea gigas* suggests evolutionary conservation of Jmj-C histone demethylases orthologues in the oyster gametogenesis and development. *Gene*, 538, 164–175. Elsevier B.V.
- FELLOUS, A., FAVREL, P. & RIVIERE, G. (2015) Temperature influences histone methylation and mRNA expression of the Jmj-C histone-demethylase orthologues during the early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics*, 19, 23–30. Elsevier B.V.
- FELLOUS, A., LEFRANC, L., JOUAUX, A., GOUX, D., FAVREL, P. & RIVIERE, G. (2019) Histone Methylation Participates in Gene Expression Control during the Early Development of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Genes*, 10, 695.
- FENG, S., COKUS, S.J., ZHANG, X., CHEN, P.-Y., BOSTICK, M., GOLL, M.G., ET AL. (2010) Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 8689–8694.
- FERREE, P.M., FRYDMAN, H.M., LI, J.M., CAO, J., WIESCHAUS, E. & SULLIVAN, W. (2005) Wolbachia utilizes host microtubules and Dynein for anterior localization in the *Drosophila* Oocyte. *PLoS Pathogens*, 1, 0111–0124.
- FIDDER, B.N., REATEGUI-ZIRENA, E.G., OLSON, A.D. & SALICE, C.J. (2016) Energetic endpoints provide early indicators of life history effects in a freshwater gastropod exposed to the fungicide , pyraclostrobin. *Environmental Pollution*, 211, 183–190.
- FILION, G.J., BEMMEL, J.G. VAN, BRAUNSCHWEIG, U., TALHOUT, W., KIND, J., WARD, L.D., ET AL. (2011) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*, 143, 212–224.
- FITZER, S.C., PHOENIX, V.R., CUSACK, M. & KAMENOS, N.A. (2014) Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation. *Scientific reports*.
- FLORES, K.B., WOLSCHIN, F. & AMDAM, G. V. (2013) The role of methylation of DNA in environmental adaptation. In *Integrative and Comparative Biology* p. .
- FNEICH, S., DHEILLY, N., ADEMA, C., ROGNON, A., REICHEL, M., BULLA, J., ET AL. (2013) 5-methyl-cytosine and 5-hydroxy-methyl-cytosine in the genome of *Biomphalaria glabrata*, a snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Parasites & vectors*, 6, 167.
- FOO, S.A. & BYRNE, M. (2016) Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. In *Advances in Marine Biology* p. , 1st edition. Elsevier Ltd.
- FOOTE, A., VIJAY, N., AVILA-ARCOS, M., BAIRD, R., DURBAN, J., MORIN, P., ET AL. (2016) Genome-culture coevolution promotes rapid divergence in the killer whale. *bioRxiv*, 1–48.
- FORET, S., KUCHARSKI, R. & PELLEGRINI, M. (2012) DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *Proceedings of the ...*, 109, 4968–4973.
- FREEMAN, J.L., PERRY, G.H., FEUK, L., REDON, R., MCCARROLL, S.A., ALTSHULER, D.M., ET AL. (2006) Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16, 949–961.
- FUSCO, G. & MINELLI, A. (2010) Phenotypic plasticity in development and evolution : facts and concepts, 547–556.

- FYODOROV, D. V, ZHOU, B., SKOULTCHI, A.I. & BAI, Y. (2017) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Publishing Group*, 19, 192–206. Nature Publishing Group.
- GAGNAIRE, B., GAY, M., HUVET, A., DANIEL, J.Y., SAULNIER, D. & RENAULT, T. (2007) Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: In vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic Toxicology*, 84, 92–102.
- GAGNAIRE, B., THOMAS-GUYON, H., BURGEOT, T. & RENAULT, T. (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology*, 22, 1–14.
- GALINDO-VILLEGAS, J., GARCIA-MORENO, D., OLIVEIRA, D., MESEGUER, J. & MULERO, V. (2012) Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebra fish development, 109.
- GALINDO, M., RODRIGUEZ, H. & OLIVARES, C. (1992) Sperm basic nuclear proteins in the bivalve mollusc *Mesodesma donacium*: Characterization and comparison with histone-like and protamine-like proteins of other molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 102, 947–952.
- GALLOWAY, L.F. (2004) Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist*, 166, 93–100.
- GALLOWAY, L.F. & ETTERTSON, J.R. (2007) Transgenerational plasticity is adaptive in the wild. *Science (New York, N.Y.)*, 318, 1134–1136.
- GARCIA-FERNANDEZ, P., GARCIA-SOUTO, D., ALMANSA, E., MORAN, P. & GESTAL, C. (2017) Epigenetic DNA Methylation Mediating Octopus vulgaris Early Development: Effect of Essential Fatty Acids Enriched Diet. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–9.
- GARDNER, K.E., ALLIS, C.D. & STRAHL, B.D. (2011) Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *Journal of Molecular Biology*, 409, 36–46. Elsevier Ltd.
- 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, 358–365.
- GAVERY, M.R. & ROBERTS, S.B. (2010) DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics*, 11.
- GAVERY, M.R. & ROBERTS, S.B. (2013) Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ*, 1, e215. PeerJ Inc.
- GAY, M., BERTHE, F.C.J. & LE ROUX, F. (2004) Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59, 49–56.
- GAY, M., RENAULT, T., PONS, A.M. & LE ROUX, F. (2004) Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: Taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62, 65–74.
- GAYDOS, L.J., WANG, W. & STROME, S. (2014) H3K27me and PRC2 transmit a memory of repression across generations and during development, 345, 1515–1518.
- GE, Z.-J., ZHANG, C.-L., SCHATTEN, H. & SUN, Q.-Y. (2014) Maternal diabetes mellitus and the origin of non-

communicable diseases in offspring: the role of epigenetics. *Biology of reproduction*, 90, 139.

- GENDREL, A.V., LIPPMAN, Z., YORDAN, C., COLOT, V. & MARTIENSSEN, R.A. (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science*, 297, 1871–1873.
- GERET, F., BURGEOT, T., HAURE, J., GAGNAIRE, B., RENAULT, T., COMMUNAL, P.Y. & SAMAIN, J.F. (2011) Effects of Low-Dose Exposure to Pesticide Mixture on Physiological Responses of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology*, 26, 146–152.
- GEYER, K.K., NIAZI, U.H., DUVAL, D., COSSEAU, C., TOMLINSON, C., CHALMERS, I.W., ET AL. (2017) The *Biomphalaria glabrata* DNA methylation machinery displays spatial tissue expression, is differentially active in distinct snail populations and is modulated by interactions with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11, 1–29.
- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., GASPARINI, M., SERRANO, D., DEL PIERO, D., THORNE, A.W., ET AL. (1983) Proteins from the sperm of the bivalve mollusc *Ensis minor* Co-existence of histones and a protamine-like protein. *European Journal of Biochemistry*, 136, 509–516.
- GIENAPP, P., TEPLITSKY, C., ALHO, J.S., MILLS, J.A. & MERILÄ, J. (2008) Climate change and evolution : disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology*, 17, 167–178.
- GILBERT, S.F. (2005) Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: ecological aspects of animal development. *Journal of biosciences*, 30, 65–74.
- GLOBISCH, D., MÜNDEL, M., MÜLLER, M., MICHALAKIS, S., WAGNER, M., KOCH, S., ET AL. (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE*, 5, 1–9.
- GODFREY-SMITH, P. (2009) Darwinian populations and natural selection. Oxford University Press.
- GOECKS, J., NEKRUTENKO, A., TAYLOR, J., AFGAN, E., ANANDA, G., BAKER, D., ET AL. (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biology*, 11.
- GOMEZ-GIL, B., ROQUE, A., ROTLLANT, G., PEINADO, L., ROMALDE, J.L., DOCE, A., ET AL. (2011) *Photobacterium swingsii* sp. nov., isolated from marine organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 315–319.
- GONZALEZ-CASTILLO, A., BALBOA, S., ROMALDE, J. & GOMEZ-GIL, B. (2014) *Vibrio crosaei* sp. nov., isolated from a cultured oyster *Crassostrea gigas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- GONZALEZ-ROMERO, R., RIVERA-CASAS, C., FERNANDEZ-TAJES, J., AUSIO, J., MENDEZ, J. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2012) Chromatin specialization in bivalve molluscs: A leap forward for the evaluation of Okadaic Acid genotoxicity in the marine environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 155, 175–181.
- GONZALEZ-ROMERO, R., SUAREZ-ULLOA, V., RODRIGUEZ-CASARIEGO, J., GARCIA-SOUTO, D., DIAZ, G., SMITH, A., ET AL. (2017) Effects of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Aquatic Toxicology*, 186, 196–204. Elsevier B.V.
- GONZALEZ, M., ROMESTAND, B., FIEVET, J., HUVET, A., LEBART, M.C., GUEGUEN, Y. & BACHERE, E. (2005) Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 1089–1097.

- GOODRICH, J., WATERS, J., POOLE, A., SUTTER, J., KOREN, O., BLEKHMANN, R., ET AL. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159, 789–799.
- 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, 21–40.
- GRANT, B.R. & GRANT, P.R. (1996) Cultural Inheritance of Song and Its Role in the Evolution of Darwin's Finches. *Evolution*, 50, 2471.
- GRAY, Y.H.M. (2000) It takes two transposons to tango transposable-element-mediated chromosomal rearrangements, 9525, 571–573.
- GREEN, T.J., HELBIG, K., SPECK, P. & RAFTOS, D.A. (2016) Primed for success : Oyster parents treated with poly (I : C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology*, 78, 113–120. Elsevier Ltd.
- GREEN, T.J., HELBIG, K., SPECK, P. & RAFTOS, D.A. (2016) Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Molecular Immunology*, 78, 113–120. Elsevier Ltd.
- 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 μ var). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 382–388.
- 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 and Shellfish Immunology*, 36, 151–157.
- GREEN, T.J., RAFTOS, D., SPECK, P. & MONTAGNANI, C. (2015) Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology*, 96, 2471–2482.
- 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. Elsevier B.V.
- GREER, E.L., BLANCO, M.A., GU, L., SENDINC, E., LIU, J., ARISTIZABAL-CORRALES, D., ET AL. (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161, 868–878.
- GRENTZINGER, T., ARMENISE, C., BRUN, C., MUGAT, B., SERRANO, V., PELISSON, A. & CHAMBEYRON, S. (2012) PiRNA-mediated transgenerational inheritance of an acquired trait. *Genome Research*, 22, 1877–1888.
- GRIFFITH, A.W. & GOBLER, C.J. (2017) Transgenerational exposure of North Atlantic bivalves to ocean acidification renders offspring more vulnerable to low pH and additional stressors. *Scientific Reports*, 1–11. Springer US.
- GRINKEVICH, L.N. (2014) Studies of histone H3 methylation during the formation of long-term memory. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 44, 571–575.
- GRIZEL, H. & HERAL, M. (1991) Introduction into france of the japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science*, 47, 388–403.
- GU, T.P., GUO, F., YANG, H., WU, H.P., XU, G.F., LIU, W., ET AL. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477, 606–612.
- GUAN, Z., GIUSTETTO, M., LOMVARDAS, S., KIM, J.H., MINIACI, M.C., SCHWARTZ, J.H., ET AL. (2002) Integration

of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*, 111, 483–493.

GUARALDI, F. & SALVATORI, G. (2012) Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 1–4.

GUETG, C. & SANTORO, R. (2012) Formation of nuclear heterochromatin Claudio. *Epigenetics*, 7:8, 811–814.

GUO, S. & KEMPHUES, K.J. (1995) par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes a Putative Ser / Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed, 61.

GUO, X., HE, Y., ZHANG, L., LELONG, C. & JOUAUX, A. (2015) Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish and Shellfish Immunology*, 46, 107–119. Elsevier Ltd.

GURDON, J. (2009) Nuclear reprogramming in eggs. *Nature Medicine*, 15, 1141–1144.

GURDON, J.B., LASKEY, R.A. & REEVES, O.R. (1975) The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34, 93–112.

GUT, P. & VERDIN, E. (2013) The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*, 502, 489–498.

HADA, H.S., WEST, P.A. & LEE, J. V. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 1–4.

HADLEY WICKHAM, R.F., HENRY, L. & MÜLLER, K. (2017) dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.7. 4.

HAIG, D. (2007) Weismann Rules! OK? Epigenetics and the Lamarckian temptation. *Biology and Philosophy*, 22, 415–428.

HALDANE, J.B.S. (1946) THE INTERACTION OF NATURE AND NURTURE.

HAMMILL, E., ROGERS, A. & BECKERMAN, A.P. (2008) Costs, benefits and the evolution of inducible defences: A case study with *Daphnia pulex*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 705–715.

HAN, Y.W., REDLINE, R.W., LI, M., YIN, L., HILL, G.B. & MCCORMICK, T.S. (2004) *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection and immunity*, 72, 2272–2279. Am Soc Microbiol.

HARLEY, H. & RITTER, E. (2002) Structuring the bundle: a universal morphosyntactic feature geometry. In *Pronouns - Grammar and Representation* pp. 23–39.

HART, A.K., FIORAVANTE, D., LIU, R.-Y., PHARES, G.A., CLEARY, L.J. & BYRNE, J.H. (2011) Serotonin-Mediated Synapsin Expression Is Necessary for Long-Term Facilitation of the *Aplysia* Sensorimotor Synapse. *Journal of Neuroscience*, 31, 18401–18411.

HEAD, J.A. (2014) Patterns of DNA methylation in animals: An ecotoxicological perspective. *Integrative and Comparative Biology*, 54, 77–86.

HEARD, E. & MARTIENSSSEN, R.A. (2014) Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell*, 157, 95–109. Elsevier Inc.

HEINTZMAN, N.D., STUART, R.K., HON, G., FU, Y., CHING, C.W., HAWKINS, R.D., ET AL. (2007) Neurogenesis and

- angiogenesis inhibitors Targeted arthritis therapy ? Reawakening the gatekeepers Predicting genomic enhancers, 25, 2007.
- HENSON, S.A., BEAULIEU, C., ILYINA, T., JOHN, J.G., LONG, M., SEFERIAN, R., ET AL. (2017) Rapid emergence of climate change in environmental drivers of marine ecosystems. *Nature Communications*, 8, 14682.
- HERB, B.R., WOLSCHIN, F., HANSEN, K.D., ARYEE, M.J., LANGMEAD, B., IRIZARRY, R., ET AL. (2012) Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. *Nature neuroscience*, 15, 1371. Nature Publishing Group.
- HERMAN, J.J. & SULTAN, S.E. (2016) DNA methylation mediates genetic variation for adaptive transgenerational plasticity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283, 20160988.
- HEWITT, J.E., ELLIS, J.I. & THRUSH, S.F. (2016) Multiple stressors, nonlinear effects and the implications of climate change impacts on marine coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 22, 2665–2675.
- HINE, P., WESNEY, B. & HAY, B. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 135–142.
- HOEGH-GULDBERG, O. & BRUNO, J.F. (2010) The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science*, 328, 467–484.
- VAN HOLDE, K.E. (1988) Chromatin. In *Springer Series in Molecular Biology* (ed A. Rich), p. 491.
- HOLESKI, L.M., JANDER, G. & AGRAWAL, A.A. (2012) Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 618–626. Elsevier Ltd.
- HOLLIDAY, R. (1991) Mutations and epimutations in mammalian cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 250, 351–363.
- HOLLIDAY, R. & PUGH, J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, 187, 226–232.
- HOLLIDAY, R. & PUGH, J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226–232.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D.R. & MACPHERSON, A.J. (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268–1273.
- HORNER, V., PROCTOR, D., BONNIE, K.E., WHITEN, A. & DE WAAL, F.B.M. (2010) Prestige affects cultural learning in chimpanzees. *PLoS ONE*, 5, 1–5.
- HOSOKAWA, T., HIRONAKA, M., MUKAI, H., INADOMI, K., SUZUKI, N. & FUKATSU, T. (2012) Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. *Animal Behaviour*, 83, 293–300.
- HUGHES, V. (2014) Epigenetics: The sins of the father. *Nature*, 507, 22–24.
- HUOVINEN, M., LOIKKANEN, J., NAARALA, J. & VÄHÄKANGAS, K. (2015) Toxicity of diuron in human cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 29, 1577–1586. Elsevier Ltd.
- HUVET, A., HERPIN, A., DEGREMONT, L., LABREUCHE, Y., SAMAIN, J.F. & CUNNINGHAM, C. (2004) The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343, 211–220.

- HUXLEY, J. (1942) Evolution -The Modern Synthesis. In *George Allen & Unwin* p. . London: George Alien & Unwin Ltd.
- IFRIM, D.C., QUINTIN, J., JOOSTEN, L.A.B., JACOBS, C., JANSEN, T., JACOBS, L., ET AL. (2014) Trained immunity or tolerance: Opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21, 534–545.
- ITTIPRASERT, W., MILLER, A., KNIGHT, M., TUCKER, M. & HSIEH, M.H. (2015) Evaluation of cytosine DNA methylation of the *Biomphalaria glabrata* at shock protein 70 locus after biological and physiological stresses. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 7, 182–193.
- IYER, L.M., ZHANG, D. & ARAVIND, L. (2015) Adenine methylation in eukaryotes: Apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays*, 27–40.
- JABLONKA, E., LACHMANN, M. & LAMB, M.J. (1992) Evidence, mechanisms and models for the inheritance of acquired characters. *Journal of Theoretical Biology*, 158, 245–268.
- JABLONKA, E. & LAMB, M. (2011) Changing thought styles: the concept of soft inheritance in the 20th century. *Collegium Helveticum*, 12, 119–156.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (1998) Epigenetic inheritance in evolution, 11, 159–183.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (1998) Epigenetic inheritance in evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, 11, 159–183.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (2008) Soft inheritance: Challenging the modern synthesis. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 389–395.
- JABLONKA, E. & LAMB, M.J. (2014) Evolution in four dimensions, revised edition: Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. MIT press.
- JABLONKA, E. & NOBLE, D. (2019) Systemic integration of different inheritance systems. Elsevier Ltd. *Current Opinion in Systems Biology*. .
- JEFFRIES, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29, 201–226.
- JELTSCH, A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*, 3, 274–293.
- JENKINS, C., HICK, P., GABOR, M., SPIERS, Z., FELL, S.A., GU, X., ET AL. (2013) Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OshV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 109–126.
- Ji, C., LU, Z., XU, L., LI, F., CONG, M., SHAN, X. & WU, H. (2019) Evaluation of mitochondrial toxicity of cadmium in clam *Ruditapes philippinarum* using iTRAQ-based proteomics. *Environmental Pollution*, 251, 802–810. Elsevier Ltd.
- JIA, Z., SHI, Y., ZHANG, L., REN, Y., WANG, T., XING, L., ET AL. (2018) DNA methylome profiling at single-base resolution through bisulfite sequencing of 5mC-immunoprecipitated DNA. *BMC Biotechnology*, 18, 1–15. BMC Biotechnology.
- JIANG, L., ZHANG, J., WANG, J.-J., WANG, L., ZHANG, L., LI, G., ET AL. (2013) Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153, 773–784. Elsevier.

- JIMENEZ, E., MARIN, M.L., MARTIN, R., ODRIUZOLA, J.M., OLIVARES, M., XAUS, J., ET AL. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159, 187–193.
- JOE, M. (2013) The Epigenetic Effect of Trematode Infection on the Snail Host *Zeacumantus subcarinatus*. University of Otago, New Zealand.
- JOHANNSSEN, W.L. (1909) Elemente der Exakten Erblchkeitslehre [The elements of an exact theory of heredity]. *Jena: Gustav Fischer*.
- JOHNSON, C.W. (2006) What are emergent properties and how do they affect the engineering of complex systems? *Reliability Engineering and System Safety*, 91, 1475–1481.
- JONES, P.A. & TAKAI, D. (2001) The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics, 293, 1068–1070.
- JONES, P.A. & TAKAI, D. (2002) The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, 293, 1068–1070.
- JORDAN, M.A. & SNELL, H.L. (2002) Life history trade-offs and phenotypic plasticity in the reproduction of Galápagos lava lizards (*Microlophus delanonis*). *Oecologia*, 130, 44–52.
- JOUAUX, A., LAFONT, M., BLIN, J.L., HOUSSIN, M., MATHIEU, M. & LELONG, C. (2013) Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics*, 14, 1–14.
- JULIANO, C., WANG, J. & LIN, H. (2013) Uniting Germline and Stem Cells: the Function of Piwi Proteins and the piRNA Pathway in Diverse Organisms. *Annual review of genetics*, 45.
- KACHROO, A. & ROBIN, G.P. (2013) Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 527–533. Elsevier Ltd.
- KAITALA, A. (1991) Phenotypic Plasticity in Reproductive Behaviour of Waterstriders: Trade-Offs Between Reproduction and Longevity During Food Stress. *Functional Ecology*, 5, 12.
- KALTENPOTH, M., GÖTTLER, W., HERZNER, G. & STROHM, E. (2005) Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Current Biology*, 15, 475–479. Elsevier.
- KARAMANOY, M., POULAKOU-REBELAKOU, E., TZETIS, M. & ANDROUTSOS, G. (2010) Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): Father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Revista Argentina de Microbiologia*, 42, 311–314.
- KEELING, P.J. & PALMER, J.D. (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9, 605–618.
- KEELING, S.E., BROSNAHAN, C.L., WILLIAMS, R., GIAS, E., HANNAH, M., BUENO, R., ET AL. (2014) New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1 an opportunistic longitudinal study. *Diseases of aquatic organisms*, 109, 231–239.
- KELLY, M.W., DEBIASSE, M.B., VILLELA, V.A., ROBERTS, H.L. & CECOLA, C.F. (2016) Adaptation to climate change: trade-offs among responses to multiple stressors in an intertidal crustacean. *Evolutionary Applications*, 9, 1147–1155.
- KEUNG, A.J., JOUNG, J.K., KHALIL, A.S. & COLLINS, J.J. (2015) Chromatin regulation at the frontier of synthetic biology. *Nature Reviews Genetics*, 16, 159–171.
- KIKUCHI, Y., HOSOKAWA, T. & FUKATSU, T. (2011) Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4075–4081.

- KIMBERLY, D.A. & SALICE, C.J. (2014) If you could turn back time : Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. *Environmental Pollution*, 184, 419–425. Elsevier Ltd.
- 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. Elsevier Ltd.
- KING, W.L., SIBONI, N., WILLIAMS, N.L.R., KAHLKE, T., NGUYEN, K.V., JENKINS, C., ET AL. (2019) Variability in the composition of pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility to OsHV-1 μ var disease. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12.
- KIRKPATRICK, M. & LANDE, R. (1989) The Evolution of Maternal Characters. *Evolution*, 43, 485–503. [Society for the Study of Evolution, Wiley].
- KLINDWORTH, A., PRUESSE, E., SCHWEER, T., PEPLIES, J., QUAST, C., HORN, M. & GLÖCKNER, F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41, 1–11.
- KNIGHT, M., ITTIPRASERTA, W., ODOEMELAM, E.C., ADEMA, C.M., MILLER, A., RAGHAVAN, N. & BRIDGER, J.M. (2010) Non-random organization of the *Biomphalaria glabrata* genome in interphase Bge cells and the spatial repositioning of activated genes in cells co-cultured with *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, 29, 61–70.
- KONG, N., LIU, X., LI, J., MU, W., LIAN, J., XUE, Y. & LI, Q. (2017) Effects of temperature and salinity on survival, growth and DNA methylation of juvenile Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35, 1248–1258.
- KORNBERG, R.D. (1974) Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*, 184, 3–6.
- KORNBERG, R.D. (1977) Structure of Chromatin. *Annual Review of Biochemistry*, 46, 931–954. Annual Reviews.
- KORTHAUER, K., CHAKRABORTY, S., BENJAMINI, Y. & IRIZARRY, R.A. (2018) Detection and accurate false discovery rate control of differentially methylated regions from whole genome bisulfite sequencing. *Biostatistics*, 20, 367–383.
- KOUZARIDES, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693–705.
- KRIAUCIONIS, S. & HEINTZ, N. (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in purkinje neurons and the brain. *Science*, 324, 929–930.
- KRUEGER, D.M., GUSTAFSON, R.G. & CAVANAUGH, C.M. (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biological Bulletin*, 190, 195–202.
- KRUEGER, F. & ANDREWS, S.R. (2011) Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27, 1571–1572.
- KRÜTZEN, M., MANN, J., HEITHAUS, M.R., CONNOR, R.C., BEJDER, L. & SHERWIN, W.B. (2005) Cultural transmission of tool use in bottlenose dolphins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8939–8943.
- KU, M., KOCHER, R.P., RHEINBAY, E., MENDENHALL, E.M., ENDOH, M., MIKKELSEN, T.S., ET AL. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains.

PLoS Genetics, 4.

- KURIHARA, H. (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 275–284.
- KURTZ, J. & FRANZ, K. (2003) Evidence for memory in invertebrate immunity. *Nature*, 425, 37–38.
- KURTZ, K., MARTINEZ-SOLER, F., AUSIO, J. & CHIVA, M. (2007) Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 1432–1441.
- KURZ, A., LAMPEL, S., NICKOLENKO, E., BRADL, J., BERMER, A., ORGANISATION, A., ET AL. (1996) Active and Inactive Genes Localize Preferentially in the Periphery of Chromosome Territories, 135, 1195–1205.
- LAFONT, M. (2017) Mécanismes et spécificité du priming immunitaire antiviral chez un Lophotrochozoaire, l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- 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 and Comparative Immunology*, 91, 17–25. Elsevier Ltd.
- 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, 13143.
- LAFORSCH, C. & TOLLRIAN, R. (2004) Embryological aspects of inducible morphological defenses in *Daphnia*. *Journal of Morphology*, 262, 701–707.
- LAHMY, S., PONTIER, D., BIES-ETHEVE, N., LAUDIE, M., FENG, S., JOBET, E., ET AL. (2016) Evidence for ARGONAUTE4–DNA interactions in RNA-directed DNA methylation in plants. *Genes and Development*, 30, 2565–2570.
- LALAND, K., ULLER, T., FELDMAN, M., STERELNY, K., MÜLLER, G.B., MOCZEK, A., ET AL. (2014) Does evolutionary theory need a rethink? *Nature*, 514, 161.
- LALAND, K.N. & HOPPITT, W. (2003) Do Animals Have Culture? *Evolutionary Anthropology*, 12, 150–159.
- LALAND, K.N., ULLER, T., FELDMAN, M.W., STERELNY, K., MÜLLER, G.B., MOCZEK, A., ET AL. (2015) The extended evolutionary synthesis: its structure, assumptions and predictions. *Proc. R. Soc. B*, 282, 20151019.
- DE LAMARCK, J.-B. DE M. (1809) Philosophie zoologique, ou Exposition des considérations relatives à l’histoire naturelle des animaux... Dentu.
- 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 and Shellfish Immunology*, 15, 225–240.
- LANCTOT, C., CHEUTIN, T., CREMER, M., CAVALLI, G. & CREMER, T. (2007) Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics*.
- LANE, N., DEAN, W., ERHARDT, S., HAJKOVA, P., SURANI, A., WALTER, J. & REIK, W. (2003) Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*, 35, 88–93.
- LANGMEAD, B. & SALZBERG, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9,

357. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.

- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. & SALZBERG, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10.
- LAUKENS, D., BRINKMAN, B.M., RAES, J., DE VOS, M. & VANDENABEELE, P. (2015a) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 117–132.
- LAUKENS, D., BRINKMAN, B.M., RAES, J., DE VOS, M. & VANDENABEELE, P. (2015b) Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 117–132.
- LAVIN, Y., WINTER, D., BLECHER-GONEN, R., DAVID, E., KERENSHAUL, H., MERAD, M., ET AL. (2014) Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment. *Cell*, 159, 1312–1326.
- LAW, J.A. & JACOBSEN, S.E. (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11, 204–220. Nature Publishing Group.
- LEADBEATER, E. & CHITTKA, L. (2007) Social Learning in Insects - From Miniature Brains to Consensus Building. *Current Biology*, 17, 703–713.
- LEHMAN, E.M. & CAMPBELL, C.D. (2007) Developmental window of response to predator chemical cues in rough-skinned newt embryos. *Functional Ecology*, 21, 880–885.
- LEWIN, B. (1999) Gènes VI⁶ème. Paris, Bruxelles.
- LEWIS, S.L. & MASLIN, M.A. (2015) Defining the Anthropocene. *Nature*, 519, 171–180. Nature Publishing Group.
- LI, C., SONG, L., ZHAO, J., ZHU, L., ZOU, H., ZHANG, H., ET AL. (2007) Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 22, 663–672.
- LI, C., SONG, L., ZHAO, J., ZOU, H., SU, J. & ZHANG, H. (2006) Genomic organization, nucleotide sequence analysis of the core histone genes cluster in *Chlamys farreri* and molecular evolution assessment of the H2A and H2B. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 17, 440–451.
- LI, E., BEARD, C. & JAENISCH, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362. Nature Publishing Group.
- LI, E., BEARD, C. & JAENISCH, R. (1994) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366, 362–365.
- LI, H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27, 2987–2993.
- LI, H., HANDSAKER, B., WYSOKER, A., FENNEL, T., RUAN, J., HOMER, N., ET AL. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.
- LI, X., ITO, M., ZHOU, F., YOUNGSON, N., ZUO, X., LEDER, P. & FERGUSON-SMITH, A.C. (2008) A Maternal-Zygotic Effect Gene, *Zfp57*, Maintains Both Maternal and Paternal Imprints. *Developmental Cell*, 15, 547–557. Elsevier Inc.

- LI, Y., GUAN, Y., LI, Q. & HE, M. (2014) Analysis of DNA methylation in tissues and development stages of pearl oyster *Pinctada fucata*. *Genes Genom*, 263–270.
- LI, Y., HUANG, X., GUAN, Y., SHI, Y., ZHANG, H. & HE, M. (2015) DNA methylation is associated with expression level changes of galectin gene in mantle wound healing process of pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 912–918. Elsevier Ltd.
- LI, Y., SONG, X., WANG, W., WANG, L., YI, Q., JIANG, S., ET AL. (2017) The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 71, 59–69. Elsevier Ltd.
- LI, Y., ZHANG, L., LI, Y., LI, W., GUO, Z., LI, R., ET AL. (2019) Dynamics of DNA Methylation and DNMT Expression During Gametogenesis and Early Development of Scallop *Patinopecten yessoensis*. *Marine Biotechnology*, 21, 196–205. Marine Biotechnology.
- LIAN, S., HE, Y., LI, X., ZHAO, B., HOU, R., HU, X., ET AL. (2015) Changes in global DNA methylation intensity and DNMT1 transcription during the aging process of scallop *Chlamys farreri*. *Journal of Ocean University of China*, 14, 685–690.
- LIENERT, F., WIRBELAUER, C., SOM, I., DEAN, A., MOHN, F. & SCHÜBELER, D. (2011) Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*, 43, 1091–1097. Nature Publishing Group.
- LIM, M.Y., YOU, H.J., YOON, H.S., KWON, B., LEE, J.Y., LEE, S., ET AL. (2016) The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome, 1–8.
- LIPPMAN, Z., GENDREL, A.V., BLACK, M., VAUGHN, M.W., DEDHIA, N., MCCOMBIE, W.R., ET AL. (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430, 471–476.
- LIU, C., ZHANG, T., WANG, L., WANG, M., WANG, W., JIA, Z., ET AL. (2016) The modulation of extracellular superoxide dismutase in the specifically enhanced cellular immune response against secondary challenge of *Vibrio splendidus* in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Developmental and Comparative Immunology*, 63, 163–170. Elsevier Ltd.
- LIU, X.S., WU, H., JI, X., DADON, D., YOUNG, R.A., LIU, X.S., ET AL. (2016) Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell*, 167, 233–247. Elsevier Inc.
- LIU, Z., ZHOU, Z., WANG, L., SONG, X., CHEN, H., WANG, W., ET AL. (2015) The enkephalinergic nervous system and its immunomodulation on the developing immune system during the ontogenesis of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 250–259. Elsevier Ltd.
- LLOYD, M.M., MAKUKHOV, A.D. & PESPENI, M.H. (2016) Loss of genetic diversity as a consequence of selection in response to high pCO₂. *Evolutionary Applications*, 9, 1124–1132.
- LOKMER, A., KUENZEL, S., BAINES, J.F. & WEGNER, K.M. (2016) The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. *Environmental Microbiology*, 18, 970–987.
- LOKMER, A. & WEGNER, K.M. (2015) Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9, 670–682. Nature Publishing Group.
- DE LORGERIL, J., LUCASSON, A., PETTON, B., TOULZA, E., MONTAGNANI, C., CLERISSI, C., ET AL. (2018) Immune-suppression by OshV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters.
- LOVE, M.I., HUBER, W. & ANDERS, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-

- seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 1–21.
- LUCHTEL, D. (1972) Gonadal Development and Sex Determination in Pulmonate Molluscs. *Z. Zellforsch*, 301, 279–280.
- LUGER, K., DECHASSA, M.L. & TREMETHICK, D.J. (2013) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 436–447.
- LUNA-ACOSTA, A., RENAULT, T., THOMAS-GUYON, H., FAURY, N., SAULNIER, D., BUDZINSKI, H., ET AL. (2012) Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87, 1335–1340.
- LUNA, E. & TON, J. (2012) The epigenetic machinery controlling transgenerational systemic acquired resistance. *Plant Signaling and Behavior*, 7, 615–618.
- LUQUET, E. & TARIEL, J. (2016) Offspring reaction norms shaped by parental environment : interaction between within- and trans-generational plasticity of inducible defenses. *BMC Evolutionary Biology*, 1–10. *BMC Evolutionary Biology*.
- LUTEIJN, M.J. & KETTING, R.F. (2013) PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature Publishing Group*, 14, 523–534. *Nature Publishing Group*.
- DI LUZIO, N.R. & WILLIAMS, D.L. (1978) Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice. *Infection and Immunity*, 20, 804–810.
- LV, Z., LI, C., ZHANG, P., WANG, Z., ZHANG, W. & JIN, C.H. (2015) miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45, 431–436. Elsevier Ltd.
- MA, T., CHEN, Y., ZHANG, F., YANG, C.Y., WANG, S. & YU, X. (2013) RNF111-Dependent Neddylation Activates DNA Damage-Induced Ubiquitination. *Molecular Cell*, 49, 897–907. Elsevier Inc.
- MAHE, F., ROGNES, T., QUINCE, C., DE VARGAS, C. & DUNTHORN, M. (2014) Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593.
- MAHER, B. (2008) The case of the missing heritability. *Nature*, 456, 18–21.
- MAI, H., MORIN, B., PARDON, P., GONZALEZ, P., BUDZINSKI, H. & CACHOT, J. (2013) Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research*, 89, 1–8. Elsevier.
- MARAKALALA, M.J., WILLIAMS, D.L., HOVING, J.C., ENGSTAD, R., NETEA, M.G. & BROWN, G.D. (2013) Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of β -glucan-rich ligands in vivo. *Microbes and Infection*, 15, 511–515. Elsevier Masson SAS.
- MARINUS, M.G. (2010) DNA Methylation and Mutator Genes in *Escherichia coli* K-12. *Mutation research*, 705, 71–76.
- MARTENOT, C., ODEN, E., TRAVAILLE, 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, 25–31. Elsevier B.V.
- MARTENS, J.H.A., O’SULLIVAN, R.J., BRAUNSCHWEIG, U., OPRAVIL, S., RADOLF, M., STEINLEIN, P. & JENUWEIN, T. (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse

- epigenome. *EMBO Journal*, 24, 800–812.
- MARTIN, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBNET journal*, 17, 10–12.
- MARTIN, R., NAUTA, A.J., BEN AMOR, K., KNIPPELS, L.M.J., KNOL, J. & GARSSEN, J. (2010) Early life: Gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes*, 1, 367–382.
- MARTINEZ-ZAMUDIO, R. & HA, H.C. (2012) Histone ADP-Ribosylation Facilitates Gene Transcription by Directly Remodeling Nucleosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2490–2502.
- MARTINEZ ARBIZU, P. (2019) pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. *R package version 0.3*.
- MARTINEZ CRUZ, P., IBAÑEZ, A.L., MONROY HERMOSILLO, O.A. & RAMIREZ SAAD, H.C. (2012) Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 916845. International Scholarly Research Network.
- MASLOWSKI, K.M. & MACKAY, C.R. (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature Immunology*, 12, 5–9. Nature Publishing Group.
- MATILAINEN, O., QUIROS, P.M. & AUWERX, J. (2017) Mitochondria and Epigenetics – Crosstalk in Homeostasis and Stress. *Trends in Cell Biology*, 27, 453–463. Elsevier Ltd.
- MATZKE, M., KANNO, T., HUETTEL, B., DAXINGER, L. & MATZKE, A.J.M. (2007) Targets of RNA-directed DNA methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 512–519.
- MAYNARD SMITH, J. (1990) Models of a dual inheritance system. *Journal of Theoretical Biology*, 143, 41–53.
- MAYR, E. (1982) The growth of biological thought: Diversity, evolution, and inheritance. Harvard University Press.
- MAYR, E. (1993) Darwin et la pensée moderne de l'évolution.
- MCCLINTOCK, B. (1948) Mutable loci in maize. *Carnegie Inst Wash Year Book*, 47, 155–169.
- MCDONALD, J.I., CELIK, H., ROIS, L.E., FISHBERGER, G., FOWLER, T., REES, R., ET AL. (2016) Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biology Open*, 5, 866–874.
- MC FALL-NGAI, M., HADFIELD, M.G., BOSCH, T.C.G., CAREY, H. V., DOMAZET-LOSO, T., DOUGLAS, A.E., ET AL. (2013) Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 3229–3236.
- MCGHEE, K.E. & BELL, A.M. (2014) Paternal care in a fish: epigenetics and fitness enhancing effects on offspring anxiety. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281, 20141146.
- MCMURDIE, P.J. & HOLMES, S. (2013) Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8.
- MEABURN, K.J. & MISTELI, T. (2014) Chromosome territories.
- MECHIN, M.C., NACHAT, R., COUDANE, F., ADOUE, V., ARNAUD, J., SERRE, G. & SIMON, M. (2011) La désimination ou citrullination Une modification post-traductionnelle aux multiples facettes. *Medecine/Sciences*, 27, 49–54.
- VAN DER MEER, J.W.M., JOOSTEN, L.A.B., RIKSEN, N. & NETEA, M.G. (2015) Trained immunity: A smart way

- to enhance innate immune defence. *Molecular Immunology*, 68, 40–44. Elsevier Ltd.
- MELILLO, D., MARINO, R., ITALIANI, P. & BORASCHI, D. (2018) Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans : A Critical Appraisal, 9.
- MELLO, C.C. & CONTE JR, D. (2004) Revealing the world of RNA interference, 431.
- MENNELLA, M.R.F., FARINA, B., IRACE, M.V., DI CRISTO, C. & DI COSMO, A. (2002) Histone H1-like protein and a testis-specific variant in the reproductive tracts of *Octopus vulgaris*. *Molecular Reproduction and Development*, 63, 355–365.
- MERCER, T.R., DINGER, M.E. & MATTICK, J.S. (2009) Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, 10, 155–159.
- MERCER, T.R. & MATTICK, J.S. (2013) Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20, 300–307.
- MESSNER, S. & HOTTIGER, M.O. (2011) Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 21, 534–542. Elsevier Ltd.
- METZGER, D.C.H. & SCHULTE, P.M. (2016) Epigenomics in marine fishes. *Marine Genomics*, 30, 43–54. Elsevier B.V.
- MIGICOVSKY, Z. & KOVALCHUK, I. (2011) Epigenetic memory in mammals. *Frontiers in Genetics*, 2, 1–7.
- MILUTINOVIC, B. & KURTZ, J. (2016) Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology*, 28, 328–342.
- MIRBAHAI, L. & CHIPMAN, J.K. (2014) Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 10–17. Elsevier B.V.
- MIRO-BLANCH, J. & YANES, O. (2019) Epigenetic Regulation at the Interplay Between Gut Microbiota and Host Metabolism. *Frontiers in Genetics*, 10, 1–9.
- MITRA, A., LUO, J., ZHANG, H., CUI, K., ZHAO, K. & SONG, J. (2012) Marek's disease virus infection induces widespread differential chromatin marks in inbred chicken lines. *BMC genomics*, 13, 557.
- MOELLER, A.H., SUZUKI, T.A., PHIFER-RIXEY, M. & NACHMAN, M.W. (2018) Transmission modes of the mammalian gut microbiota. *Science*, 362, 453–457.
- MOGENSEN, T.H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 240–273.
- MONTAGNANI, C., KAPPLER, C., REICHHART, J.M. & ESCOUBAS, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters*, 561, 75–82.
- MONTAGNANI, C., LABREUCHE, Y. & ESCOUBAS, J.M. (2008) Cg-I κ B, a new member of the I κ B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 182–190.
- MORET, Y. & SIVA-JOTHY, M.T. (2003) Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 2475–2480.
- MORGAN, H.D., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W. & REIK, W. (2005) Epigenetic reprogramming in mammals.

Human Molecular Genetics, 14, 47–58.

- MORGAN, H.D., SUTHERLAND, H.G., MARTIN, D.I. & WHITELAW, E. (1999) Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature genetics*, 23, 314–318.
- MOROZ, L.L. & KOHN, A.B. (2013) Single-Neuron Transcriptome and Methylome Sequencing for Epigenomic Analysis of Aging.
- MOUSSEAU, T.A. & FOX, C.W. (1998) The adaptive significance of maternal effects. *TREE*, 13, 403–407.
- MULDER, I.E., SCHMIDT, B., STOKES, C.R., LEWIS, M., BAILEY, M., AMINOV, R.I., ET AL. (2009) Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7, 1–20.
- MÜLLER, R., CHARAF, S., SCHERER, C., OPPOLD, A., OEHLMANN, J. & WAGNER, M. (2016a) Phenotypic and epigenetic effects of vinclozolin in the gastropod *Physella acuta*. *Journal of Molluscan Studies*, 82, 320–327.
- MÜLLER, R., CHARAF, S., SCHERER, C., OPPOLD, A., OEHLMANN, J. & WAGNER, M. (2016b) Phenotypic and epigenetic effects of vinclozolin in the gastropod *Physella acuta*. *Journal of Molluscan Studies*, 82, 320–327.
- MUNDAY, P.L. (2014) Transgenerational acclimation of fishes to climate change and ocean acidification. *F1000Prime Reports*, 6, 1–7.
- NAGATA, R., NAGANO, H., OGISHIMA, D., NAKAMURA, Y., HIRUMA, M. & SUGITA, T. (2012) Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. *Pediatrics International*, 54, 350–355.
- NAGY, C. & TURECKI, G. (2012) Sensitive periods in epigenetics: Bringing us closer to complex behavioral phenotypes. *Epigenomics*, 4, 445–457.
- NETEA, M.G., JOOSTEN, L.A.B., LATZ, E., MILLS, K.H.G., NATOLI, G., STUNNENBERG, H.G., ET AL. (2016) Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098–aaf1098.
- NETEA, M.G., LATZ, E., KINGSTON, H.G., MILLS, L.A. & NEILL, J.O.' (2015) Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nature Immunology*, 16, 675–679. Nature Publishing Group.
- NETEA, M.G. & MEER, J.W.M. VAN DER (2017) Commentary Trained Immunity : An Ancient Way of Remembering. *Cell Host and Microbe*, 21, 297–300. Elsevier Inc.
- NETEA, M.G., QUINTIN, J. & VAN DER MEER, J.W.M. (2011) Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host and Microbe*, 9, 355–361. Elsevier Inc.
- NEUWIRTH, E. & BREWER, R.C. (2014) ColorBrewer palettes. *R package version*, 1.
- NEWTON, I.L.G., SAVYTSKY, O. & SHEEHAN, K.B. (2015) *Wolbachia* Utilize Host Actin for Efficient Maternal Transmission in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 11, 1–19.
- NICA, D., POPESCU, C., DRAGHICI, G., PRIVISTIRESCU, I., SUCIU, M. & STÖGER, R. (2017) Effect of cadmium on cytosine hydroxymethylation in gastropod hepatopancreas. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 15187–15195. Environmental Science and Pollution Research.
- NICA, D. V., POPESCU, C., DRAGHICI, G.A., ANDRICA, F.M., PRIVISTIRESCU, I.A., GERGEN, I.I. & STÖGER, R. (2017)

High-level dietary cadmium exposure is associated with global DNA hypermethylation in the gastropod hepatopancreas. *PLoS ONE*, 12, 1–15.

NICOGLIOU, A. & MERLIN, F. (2017) Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 1–10.

NILSSON, E.E. & SKINNER, M.K. (2015) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Translational Research*, 165, 12–17.

NOROUZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016a) Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, 21166. Nature Publishing Group.

NOROUZITALLAB, P., BARUAH, K., BISWAS, P., VANROMPAY, D. & BOSSIER, P. (2016b) Probing the phenomenon of trained immunity in invertebrates during a transgenerational study, using brine shrimp *Artemia* as a model system. *Scientific Reports*, 6, 21166. Nature Publishing Group.

NOVAKOVIC, B., HABIBI, E., WANG, S.Y., ARTS, R.J.W., DAVAR, R., MEGCHELENBRINK, W., ET AL. (2016) β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell*, 167, 1354–1368.e14. Elsevier.

NOWAK, R. (1994) Mining Treasures From 'Junk DNA'. *SCIENCE*, 263.

O'CONNOR, T. (2015) Emergent Properties. *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences: Second Edition*, 31, 433–437.

ODLING-SMEE, F.J., LALAND, K.N. & FELDMAN, M.W. (1996) Niche construction. *The American Naturalist*, 147, 641–648. University of Chicago Press.

ODLING-SMEE, F.J., LALAND, K.N. & FELDMAN, M.W. (2013) Niche construction: the neglected process in evolution (MPB-37). Princeton university press.

ODLING-SMEE, J. (2007) Niche inheritance: a possible basis for classifying multiple inheritance systems in evolution. *Biological Theory*, 2, 276–289. Springer.

OKSANEN, J.F., BLANCHET, G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., ET AL. (2019) vegan: Community Ecology Package.

OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014) Indication of family-specific DNA methylation patterns in developing oysters *Claire*. *Igarss 2014*, 1–5.

OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014a) Indication of family-specific DNA methylation patterns in developing oysters. *BioRxiv*.

OLSON, C.E. & ROBERTS, S.B. (2014b) Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in *Crassostrea gigas* male gametes. *Frontiers in Physiology*, 5, 224. Frontiers Media S.A.

OTTAVIANI, E., ACCORSI, A., RIGILLO, G., MALAGOLI, D., BLOM, J.M.C. & TASCEDDA, F. (2013) Epigenetic modification in neurons of the mollusc *Pomacea canaliculata* after immune challenge. *Brain Research*, 1537, 18–26. Elsevier.

OTURAN, N., TRAJKOVSKA, S., OTURAN, M.A., COUDERCHET, M. & AARON, J.-J. (2008) Study of the toxicity of diuron and its metabolites formed in aqueous medium during application of the electrochemical advanced oxidation process "electro-Fenton". *Chemosphere*, 73, 1550–1556. Elsevier.

- PAN, W.H., SOMMER, F., FALK-PAULSEN, M., ULAS, T., BEST, P., FAZIO, A., ET AL. (2018) Exposure to the gut microbiota drives distinct methylome and transcriptome changes in intestinal epithelial cells during postnatal development. *Genome Medicine*, 10, 1–15. *Genome Medicine*.
- PANKHURST, N.W. & MUNDAY, P.L. (2011) Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research*, 62, 1015–1026.
- PARKER, L.M., COLEMAN, R.A., O’CONNOR, W.A., DOVE, M., BYRNE, M., GIBBS, M., ET AL. (2017) Adult exposure to ocean acidification is maladaptive for larvae of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* in the presence of multiple stressors. *Biology Letters*, 13.
- PARKER, L.M., O’CONNOR, W.A., RAFTOS, D.A., PÖRTNER, H.O. & ROSS, P.M. (2015) Persistence of positive carryover effects in the oyster, *Saccostrea glomerata*, following transgenerational exposure to ocean acidification. *PLoS ONE*, 10, 1–19.
- PARKER, L.M., ROSS, P.M., O’CONNOR, W.A., BORYSKO, L., RAFTOS, D.A. & PÖRTNER, H.O. (2012) Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. *Global Change Biology*, 18, 82–92.
- PASTOR, W., PAPE, U.J., HUANG, Y., HENDERSON, H.R., LISTER, R., KO, M., ET AL. (2011) Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, 473, 394–397.
- PEARSON, R.G. & DAWSON, T.P. (2003) Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: Are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12, 361–371.
- PEIRSON, B.R. (2013) Wilhelm Johannsen’s Genotype-Phenotype Distinction. *Embryo Project Encyclopedia*. Arizona State University. School of Life Sciences. Center for Biology and
- PENKOV, S., MITROULIS, I., HAJISHENGALLIS, G. & CHAVAKIS, T. (2019) Immunometabolic Crosstalk: An Ancestral Principle of Trained Immunity? *Trends in Immunology*, 40, 1–11. Elsevier Ltd.
- PEREZ, P.F., DORE, J., LECLERC, M., LEVENEZ, F., BENYACOU, J., SERRANT, P., ET AL. (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119.
- PERNET, F., LUPO, C., BACHER, C. & WHITTINGTON, R.J. (2016) Infectious diseases in oyster aquaculture require a new integrated approach. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*.
- PETRASEK, D. (2008) Systems biology: The case for a systems science approach to diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2, 131–134.
- PETROVIC, V., PEREZ-GARCIA, C., PASANTES, J.J., ATOVIC, E., PRATS, E. & PLOHL, M. (2009) A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: A dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research*, 124, 63–71.
- PETTON, B., BOUDRY, P., ALUNNO-BRUSCIA, M. & PERNET, F. (2015) Factors influencing disease-induced mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 6, 205–222.
- PETTON, B., DE LORGERIL, J., MITTA, G., DAIGLE, G., PERNET, F. & ALUNNO-BRUSCIA, M. (2019) Fine-scale temporal dynamics of herpes virus and vibrios in seawater during a polymicrobial infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, 135, 97–106.
- PETTON, B., PERNET, F., ROBERT, R. & BOUDRY, P. (2013) Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environment interactions*, 3, 257–273.
- PHAM, L.N., DIONNE, M.S., SHIRASU-HIZA, M. & SCHNEIDER, D.S. (2007) A specific primed immune response

- in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3.
- PIGLIUCCI, M. (2007) Do we need an extended evolutionary synthesis? *Evolution*. .
- PIGLIUCCI, M. & MULLER, G. (2010) Evolution—the extended synthesis.
- PINAUD, S., PORTELA, J., DUVAL, D., NOWACKI, F.C., OLIVE, M.-A., ALLIENNE, J.-F., ET AL. (2016) A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. *PLOS Pathogens*, 12, e1005361.
- PLAISTOW, S.J., LAPSLEY, C.T. & BENTON, T.G. (2006) Context-Dependent Intergenerational Effects : The Interaction between Past and Present Environments and Its. *The American Naturalist*, 167, 206–215.
- PLAUTZ, S.C., GUEST, T., FUNKHOUSER, M.A. & SALICE, C.J. (2013) Transgenerational cross-tolerance to stress: Parental exposure to predators increases offspring contaminant tolerance. *Ecotoxicology*, 22, 854–861.
- PLAUTZ, S.C. & SALICE, C.J. (2013) Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: Developmental cadmium exposure trumps parental effects. *Ecotoxicology*, 22, 847–853.
- POIRIER, A.C., SCHMITT, P., ROSA, R.D., VANHOVE, A.S., KIEFFER-JAQUINOD, S., RUBIO, T.P., ET AL. (2014) Antimicrobial histones and DNA traps in invertebrate immunity: Evidences in *Crassostrea gigas*. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 24821–24831.
- PORTELA, J., DUVAL, D., ROGNON, A., GALINIER, R., BOISSIER, J., COUSTAU, C., ET AL. (2013) Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *biomphalaria glabrata* snail. *Journal of Innate Immunity*, 5, 261–276.
- VAN DER POST, D.J. & HOGEWEG, P. (2009) Cultural inheritance and diversification of diet in variable environments. *Animal Behaviour*, 78, 155–166.
- POTOK, M.E., NIX, D.A., PARNELL, T.J. & CAIRNS, B.R. (2013) Reprogramming the Maternal Zebrafish Genome after Fertilization to Match the Paternal Methylation Pattern. *Bone*, 23, 1–7.
- PRADEU, T. & PASQUIER, L. DU (2018) Immunological memory : What ' s in a name ?, 283, 7–20.
- PRADO-ALVAREZ, M., DARMODY, G., HUTTON, S., O'REILLY, A., LYNCH, S.A. & CULLOTY, S.C. (2016) Occurrence of OsHV-1 in *Crassostrea gigas* cultured in Ireland during an exceptionally warm summer. Selection of less susceptible oysters. *Frontiers in Physiology*, 7, 1–14.
- PU, C. & ZHAN, A. (2017) Epigenetic divergence of key genes associated with water temperature and salinity in a highly invasive model ascidian. *Biological Invasions*, 19, 1–14. Springer International Publishing.
- PUTNAM, H.M., DAVIDSON, J.M. & GATES, R.D. (2016) Ocean acidification influences host DNA methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evolutionary Applications*, 9, 1165–1178.
- QU, T., ZHANG, L., WANG, W., HUANG, B., LI, Y., ZHU, Q., ET AL. (2015) Characterization of an inhibitor of apoptosis protein in *Crassostrea gigas* clarifies its role in apoptosis and immune defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 51, 74–78.
- QUINTIN, J., SAEED, S., MARTENS, J.H.A., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J., IFRIM, D.C., LOGIE, C., ET AL. (2012) *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host and Microbe*, 12, 223–232.

- R CORE TEAM (2013) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Au.
- RAJASETHUPATHY, P., ANTONOV, I., SHERIDAN, R., FREY, S., SANDER, C., TUSCHL, T. & KANDEL, E.R. (2012) A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*, 149, 693–707. Elsevier Inc.
- RAJEWSKY, N. (2006) microRNA target predictions in animals. *Nature Genetics*, 38, 8–13.
- RANDALL, R.E. & GOODBOURN, S. (2008) Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*, 89, 1–47.
- RANDO, O.J. & VERSTREPEN, K.J. (2007) Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*, 128, 655–668.
- RAVEN, P., JOHNSON, G.B., MASON, K., LOSOS, J. & SINGER, S. (2012) Biologie, 2e edition. de boeck, Bruxelles.
- RAWLINGS, J.S., ROSLER, K.M. & HARRISON, D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117, 1281–1283.
- READER, S.M. (2016) Animal social learning: associations and adaptations. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-2120. F1000Research, London, UK.
- REATEGUI-ZIRENA, E., FIDDER, B.N., OLSON, A.D., DAWSON, D.E., BILBO, T.R. & SALICE, C.J. (2017) Transgenerational endpoints provide increased sensitivity and insight into multigenerational responses of *Lymnaea stagnalis* exposed to. *Environmental Pollution*, 224, 572–580.
- REMY, J. (2010) Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20, 877–878.
- RENAULT, T., MOREAU, P., FAURY, N., PEPIN, J.-F., SEGARRA, A. & WEBB, S. (2012) Analysis of Clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) Specimens by Sequencing Amplified Fragments from Three Virus Genome Areas. *Journal of Virology*, 86, 5942–5947.
- RICHARDS, C.L., SCHREY, A.W. & PIGLIUCCI, M. (2012) Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. *Ecology Letters*, 15, 1016–1025.
- RICHTER-BOIX, A., ORIZAOLA, G. & LAURILA, A. (2014) Transgenerational phenotypic plasticity links breeding phenology with offspring life-history. *Ecological Society of America*, 95, 2815–2825.
- RIGGS, A.D. (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, 14, 9–25. Karger Publishers.
- RIVERA-CASAS, C., GONZALEZ-ROMERO, R., GARDUÑO, R.A., CHEEMA, M.S., AUSIO, J. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2017) Molecular and biochemical methods useful for the epigenetic characterization of chromatin-associated proteins in bivalve molluscs. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–14.
- RIVERA-CASAS, C., GONZALEZ-ROMERO, R., VIZOSO-VAZQUEZ, Á., CHEEMA, M.S., CERDAN, M.E., MENDEZ, J., ET AL. (2016) Characterization of mussel H2A.Z.2: a new H2A.Z variant preferentially expressed in germinal tissues from *Mytilus*. *Biochemistry and Cell Biology*, 94, 480–490.
- RIVIERE, G., HE, Y., TECCHIO, S., CROWELL, E., GRAS, M., SOURDAINE, P., ET AL. (2017) Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development. *PLoS Genetics*, 13, 1–16.
- RIVIERE, G., WU, G.C., FELLOUS, A., GOUX, D., SOURDAINE, P. & FAVREL, P. (2013) DNA Methylation Is Crucial

- for the Early Development in the Oyster *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, 15, 739–753.
- ROCHELEAU, C.E., DOWNS, W.D., LIN, R., WITTMANN, C., BEI, Y., CHA, Y., ET AL. (1997) Wnt Signaling and an APC-Related Gene Specify Endoderm in Early *C. elegans* Embryos, 90, 707–716.
- RODRIGUES, J., BRAYNER, F.A., ALVES, L.C., DIXIT, R. & BARILLAS-MURY, C. (2010) Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*, 329, 1353–1356.
- RODRIGUES, L.C., BERGH, J.C.J.M. VAN DEN, MASSA, F., THEODOROU, J.A., ZIVERI, P. & GAZEAU, F. (2015) Sensitivity of Mediterranean Bivalve Mollusc Aquaculture to Climate Change, Ocean Acidification, and Other Environmental Pressures: Findings from a Producer Survey. *Journal of Shellfish Research*, 34, 1161–1176.
- RODRIGUEZ-ROMERO, A., JARROLD, M.D., MASSAMBA-N’SIALA, G., SPICER, J.I. & CALOSI, P. (2016) Multi-generational responses of a marine polychaete to a rapid change in seawater pCO₂. *Evolutionary Applications*, 9, 1082–1095.
- ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C. & MAHE, F. (2016) VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- ROHART, F., GAUTIER, B., SINGH, A. & LE CAO, K.-A. (2017) mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS computational biology*, 13, e1005752. Public Library of Science.
- ROMALDE, J.L., DIEGUEZ, A.L., LASA, A. & BALBOA, S. (2014) New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: A review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–11.
- RONDON, R., GRUNAU, C., FALLET, M., CHARLEMAGNE, N., SUSSARELLU, R., CHAPARRO, C., ET AL. (2017a) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environmental Epigenetics*, 3, 1–13.
- RONDON, R., GRUNAU, C., FALLET, M., CHARLEMAGNE, N., SUSSARELLU, R., CHAPARRO, C., ET AL. (2017b) Effects of a parental exposure to diuron on Pacific oyster spat methylome. *Environmental Epigenetics*, 3.
- ROOT, T., PRICE, J., HALL, K. & SCHNEIDER, S. (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57–60.
- ROQUE, A., CARRASCO, N., ANDREE, K.B., LACUESTA, B., ELANDALOUSSI, L., GAIRIN, I., ET AL. (2012) First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*, 324–325, 303–306. Elsevier B.V.
- ROQUIS, D., ROGNON, A., CHAPARRO, C., BOISSIER, J., ARANCIBIA, N., COSSEAU, C., ET AL. (2016) Frequency and mitotic heritability of epimutations in *Schistosoma mansoni*. *Molecular Ecology*, 25, 1741–1758.
- ROSA, R.D., DE LORGERIL, J., TAILLIEZ, P., BRUNO, R., PIQUEMAL, D. & BACHERE, E. (2012) A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. *BMC Genomics*, 13.
- ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R. & ZILBER-ROSENBERG, I. (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 355–362.
- ROSS, P.M., PARKER, L. & BYRNE, M. (2016a) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions Pauline. *ICES J. Mar. Sci.*, 73, 537–549.
- ROSS, P.M., PARKER, L. & BYRNE, M. (2016b) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms

- to changing ocean conditions. *ICES Journal of Marine Science*, 73, 537–549.
- ROTH, O., BEEMELMANN, A., BARRIBEAU, S.M., SADD, B.M. & ROTH, O. (2018) Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution.
- ROTH, S.Y., DENU, J.M. & ALLIS, C.D. (2001) Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 81–120. Annual Reviews.
- ROTHSCHILD, D., WEISSBROD, O., BARKAN, E., KURILSHIKOV, A., KOREM, T., ZEEVI, D., ET AL. (2018) Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555, 210–215. Nature Publishing Group.
- ROUX, F., COLOME-TATCHE, M., EDELIST, C., WARDENAAR, R., GUERCHE, P., HOSPITAL, F., ET AL. (2011) Genome-wide epigenetic perturbation jump-starts patterns of heritable variation found in nature. *Genetics*, 188, 1015–1017.
- LE ROUX, F., GOUBET, A., THOMPSON, F.L., FAURY, N., GAY, M., SWINGS, J. & SAULNIER, D. (2005) *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2251–2255.
- LE ROUX, F., WEGNER, K.M. & POLZ, M.F. (2016) Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals. *Trends in Microbiology*, 24, 568–580. Elsevier Ltd.
- ROYET, J., GUPTA, D. & DZIARSKI, R. (2011) Peptidoglycan recognition proteins: Modulators of the microbiome and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 837–851. Nature Publishing Group.
- SADD, B.M., KLEINLOGEL, Y., SCHMID-HEMPEL, R. & SCHMID-HEMPEL, P. (2005) Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters*, 1, 386–388.
- SADD, B.M. & SCHMID-HEMPEL, P. (2006) Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, 16, 1206–1210.
- SAEED, S., QUINTIN, J., KERSTENS, H.H.D., RAO, N.A., MATARESE, F., CHENG, S., ET AL. (2014) Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345, 1–26.
- SAINT-CARLIER, E. & RIVIERE, G. (2015) Regulation of Hox orthologues in the oyster *Crassostrea gigas* evidences a functional role for promoter DNA methylation in an invertebrate. *FEBS Letters*, 589, 1459–1466. Federation of European Biochemical Societies.
- SALEM, H., FLOREZ, L., GERARDO, N. & KALTENPOTH, M. (2015) An out-of-body experience: The extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282.
- SALINAS, S., BROWN, S.C., MANGEL, M. & MUNCH, S.B. (2013) Non-genetic inheritance and changing environments. *Non-Genetic Inheritance*, 38–50.
- SANCHEZ-ARGÜELLO, P., APARICIO, N., GUEVARA, M.A., DIAZ, L., CERVERA, M.T. & FERNANDEZ, C. (2016) Effects on reproduction, genotoxicity and DNA methylation pattern after chronic exposure of the freshwater snail *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) to vinclozolin. *Austin Journal of Environmental Toxicology*, 2, 1008.
- SANDER, K. (1992) Shaking a concept: Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 201, 265–267.

- SANDERS, M.E. (2008) Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46, S58–S61.
- SANTAGUIDA, S. & MUSACCHIO, A. (2009) The life and miracles of kinetochores. *EMBO Journal*, 28, 2511–2531.
- SARDA, S., ZENG, J., HUNT, B.G. & YI, S. V. (2012) The evolution of invertebrate gene body methylation. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1907–1916.
- SARKER, G. & PELEG-RAIBSTEIN, D. (2019) Maternal overnutrition induces long-term cognitive deficits across several generations. *Nutrients*, 11.
- SASAKI, H. & MATSUI, Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 9, 129–140.
- SCHAEFER, M. (2010) Lack of evidence for DNA methylation of Invader4 retroelements in *Drosophila* and implications for Dnmt2-mediated epigenetic regulation, 42, 3–5.
- SCHLICHTING, C.D. & WUND, M.A. (2014) Phenotypic plasticity and epigenetic marking: An assessment of evidence for genetic accommodation. *Evolution*, 68, 656–672.
- SCHMITT, P., DUPERTHUY, M., MONTAGNANI, CAROLINE BACHERE, EVELYNE DESTOUMIEUX-GARZON, D. & ECOLOGY (2011) Immune responses in the pacific oyster *Crassostrea gigas*: an overview with focus on summer mortalities. In *Seminars in Oncology Nursing* p. .
- SCHMITT, P., DUPERTHUY, M., MONTAGNANI, C., BACHERE, E. & DESTOUMIEUX-GARZON, D. (2012) Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: An overview with focus on summer mortalities. In *Oysters: Physiology, Ecological Distribution and Mortality* p. .
- SCHRADER, L. & SCHMITZ, J. (2019) The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Molecular Ecology*, 28, 1537–1549.
- SCHÜBELER, D. (2015) Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517, 321–326.
- SCHUETTENGROBER, B., CHOURROUT, D., VERVOORT, M., LEBLANC, B. & CAVALLI, G. (2007) Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*, 128, 735–745.
- SCHULZ, L.C. (2010) The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 16757–16758.
- SCHWAB, D.B., RIGGS, H.E., NEWTON, I.L.G. & MOCZEK, A.P. (2016) Developmental and ecological benefits of the maternally transmitted microbiota in a dung beetle. *American Naturalist*, 188, 679–692.
- SCHWARTZ, S., FRIEDBERG, I., IVANOV, I. V., DAVIDSON, L.A., GOLDSBY, J.S., DAHL, D.B., ET AL. (2012) A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response. *Genome Biology*, 13.
- SCHWINDT, A.R. (2015) Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there evidence of transgenerational inheritance? *General and Comparative Endocrinology*, 219, 152–164. Elsevier Inc.
- SCOTTI, P.D., DEARING, S.C. & GREENWOOD, D.R. (2007) Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 41, 91–101.
- SEELEY, J.J., BAKER, R.G., MOHAMED, G., BRUNS, T., HAYDEN, M.S., DESHMUKH, S.D., ET AL. (2018) Induction of

- innate immune memory via microRNA targeting of chromatin remodelling factors. *Nature*, 559, 114. Nature Publishing Group.
- 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, 30–32.
- SEGARRA, A., MAUDUIT, F., FAURY, N., TRANCART, S., DEGREMONT, L., TOURBIEZ, D., ET AL. (2014) Dual transcriptomics of virus-host interactions: Comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics*, 15, 1–13.
- 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 Research*, 153, 92–99.
- SEXTON, T., YAFFE, E., KENIGSBURG, E., BANTIGNIES, F., LEBLANC, B., HOICHMAN, M., ET AL. (2012) Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell*, 148, 458–472.
- SHAMA, L.N.S., STROBEL, A., MARK, F.C. & WEGNER, K.M. (2014) Transgenerational plasticity in marine sticklebacks: maternal effects mediate impacts of a warming ocean. *Functional Ecology*, 28, 1482–1493.
- SHAMA, L.N.S. & WEGNER, K.M. (2014) Grandparental effects in marine sticklebacks: Transgenerational plasticity across multiple generations. *Journal of Evolutionary Biology*, 27, 2297–2307.
- SHEN, H. & LAIRD, P.W. (2013) Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, 153, 38–55. Elsevier Inc.
- SHIIO, Y. & EISENMAN, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13225–13230.
- SHIMAHARA, Y., KURITA, J., KIRYU, I., NISHIOKA, T., YUASA, K., KAWANA, M., ET AL. (2012) Surveillance of type 1 ostreid herpesvirus (OshV-1) variants in Japan. *Fish Pathology*, 47, 129–136. The Japanese Society of Fish Pathology.
- SIJEN, T. & PLASTERK, R.H.A. (2003) Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature*, 426, 310–314.
- SIMMEN, M.W., LEITGEB, S., CHARLTON, J., JONES, S.J.M., HARRIS, B.R., CLARK, V.H. & BIRD, A. (1999) Nonmethylated Transposable Elements and Methylated Genes in a Chordate Genome. *Science*, 283, 1164–1168.
- SIMONE, C. & PESERICO, A. (2011) Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- SKINNER, M.K. (2008) What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reproductive Toxicology*, 25, 2–6.
- SKINNER, M.K. (2016) Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. *Nature Reviews Endocrinology*, 12, 68. Nature Publishing Group.
- SKINNER, M.K., GURRERRO-BOSAGNA, C., HAQUE, M.M., NILSSON, E.E., KOOP, J.A.H., KNUTIE, S.A. & CLAYTON, D.H. (2014) Epigenetics and the evolution of Darwin's Finches. *Genome biology and evolution*, 6,

1972–1989.

- SLOTKIN, R.K. & MARTIENSSSEN, R. (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8, 272–285.
- SMALL, C. & NICHOLLS, R.J. (2003) A global analysis of human settlement in coastal zones. *Journal of Coastal Research*, 19, 584–599.
- SMISETH, P.T., KÖLLIKER, M. & ROYLE, N.J. (2012) What is parental care? In *The Evolution of Parental Care* (ed and M.K. Nick J. Royle, Per T. Smiseth), pp. 1–17 First Edit. Oxford University Press.
- SMISETH, P.T., SCOTT, M.P. & ANDREWS, C. (2011) Hormonal regulation of offspring begging and mediation of parent–offspring conflict. *Animal Behaviour*, 81, 507–517.
- SONG, K., LI, L. & ZHANG, G. (2017) The association between DNA methylation and exon expression in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 12, 1–12.
- SPEMANN, H. & MANGOLD, H. (1924) Induction of Embryonic Primordia by Implantation of Organizers from a Different Species. *Archiv*.
- VAN SPEYBROECK, L., WAELE, D. & VIJVER, G. (2006) Theories in Early Embryology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 981, 7–49.
- STANDEN, B.T., RAWLING, M.D., DAVIES, S.J., CASTEX, M., FOEY, A., GIOACCHINI, G., ET AL. (2013) Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1097–1104.
- STAREGA-ROSLAN, J., KROL, J., KOSCIANSKA, E., KOZŁOWSKI, P., SZLACHCIC, W.J., SOB CZAK, K. & KRZYZOSIAK, W.J. (2011) Structural basis of microRNA length variety, 39, 257–268.
- VAN STEENSEL, B. (2011) Chromatin: Constructing the big picture. *EMBO Journal*, 30, 1885–1895. Nature Publishing Group.
- STENDER, J.D. & GLASS, C.K. (2013) Epigenomic control of the innate immune response. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 582–587. Elsevier Ltd.
- STOREY, J.D. & TIBSHIRANI, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 9440–9445.
- STRAHL, B. & ALLIS, C. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41–5.
- SUAREZ-ULLOA, V., GONZALEZ-ROMERO, R. & EIRIN-LOPEZ, J.M. (2015) Environmental epigenetics: A promising venue for developing next-generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 98, 5–13. Elsevier Ltd.
- SUAREZ-ULLOA, V., RIVERA-CASAS, C. & MICHEL, M. (2019) Seasonal DNA Methylation Variation in the Flat Tree Oyster *Isognomon Alatus* from a Mangrove Ecosystem in North Biscayne Bay, Florida. *Journal of Shellfish Research*, 38, 79.
- SUKA, N., NAKASHIMA, E., SHINMYOZU, K., HIDAKA, M. & JINGAMI, H. (2006) The WD40-repeat protein Pwp1p associates in vivo with 25S ribosomal chromatin in a histone H4 tail-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 34, 3555–3567.
- SUN, J.C., UGOLINI, S. & VIVIER, E. (2014) Immunological memory within the innate immune system. *EMBO Journal*, 33, 1295–1303.

- SUN, Y., HOU, R., FU, X., SUN, C., WANG, S., WANG, C., ET AL. (2014) Genome-wide analysis of DNA methylation in five tissues of Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *PLoS ONE*, 9.
- SUSKI, J.G., SALICE, C.J. & PATINOS, R. (2012) Species-specific and transgenerational responses to increasing salinity in sympatric freshwater gastropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31.
- SUSSARELLU, R., LEBRETON, M., ROUXEL, J., AKCHA, F. & RIVIERE, G. (2018) Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 196, 70–78. Elsevier.
- SYLVAIN, F.É. & DEROME, N. (2017) Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific Reports*, 7, 1–14.
- SZCZERBAL, I., FOSTER, H.A. & BRIDGER, J.M. (2009) The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system, 647–663.
- SZULWACH, K.E., LI, X., LI, Y., SONG, C.X., HAN, J.W., KIM, S.S., ET AL. (2011) Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genetics*, 7.
- SZYF, M. (2015) Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. *Trends in Molecular Medicine*.
- TABARA, H., SARKISSIAN, M., KELLY, W.G., FLEENOR, J., GRISHOK, A., TIMMONS, L., ET AL. (1999) The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99, 123–132.
- TAHILIANI, M., KOH, K.P., SHEN, Y., PASTOR, W.A., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., ET AL. (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324, 930–935.
- TANAY, A., O'DONNELL, A.H., DAMELIN, M. & BESTOR, T.H. (2007) Hyperconserved CpG domains underlie Polycomb-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5521–5526.
- TANGUY, A., BOUTET, I., LAROCHE, J. & MORAGA, D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal*, 272, 390–403.
- TARIEL, J., PLENET, S. & LUQUET, É. (2019) Transgenerational plasticity of inducible defenses: combined effects of grand-parental, parental and current environments. *bioRxiv*, 1–17.
- THERNEAU, T. (2015) A Package for Survival Analysis in S. version 2.38.
- THOMAS, C.D., CAMERON, A., GREEN, R.E., BAKKENES, M., BEAUMONT, L.J., COLLINGHAM, Y.C., ET AL. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, 427, 145–148.
- THOMAS, F., LEFÈVRE, T. & RAYMOND, M. (2016) Biologie évolutive de boeck. Louvain-la-Neuve.
- THOMAS, J.O. & KORNBERG, R.D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 2626–2630.
- THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., HOSTE, B., VANDEMEULEBROECKE, K., GULLIAN, M. & SWINGS, J. (2003) *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine

- environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1495–1501.
- THOMSON, J.M. (1959) The naturalization of the pacific oyster in Australia. *Marine and Freshwater Research*, 10, 144–149.
- THOMSON, J.P. & MEEHAN, R.R. (2017) The application of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine studies in cancer research. *Epigenomics*, 9, 77–91.
- THORSON, J.L.M., SMITHSON, M., BECK, D., SADLER-RIGGLEMAN, I., NILSSON, E., DYBDAHL, M. & SKINNER, M.K. (2017) Epigenetics and adaptive phenotypic variation between habitats in an asexual snail. *Scientific Reports*, 7, 1–11. Springer US.
- THORVALDSDOTTIR, H., ROBINSON, J.T. & MESIROV, J.P. (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14, 178–192.
- TIRAPE, A., BACQUE, C., BRIZARD, R., VANDENBULCKE, F. & BOULO, V. (2007) Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 31, 859–873.
- TRABAL FERNANDEZ, N., MAZON-SUASTEGUI, J.M., VAZQUEZ-JUAREZ, 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, 69–83.
- TRABAL, N., MAZON-SUASTEGUI, J.M., VAZQUEZ-JUAREZ, R., ASCENCIO-VALLE, F., MORALES-BOJORQUEZ, E. & ROMERO, J. (2012) Molecular Analysis of Bacterial Microbiota Associated with Oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in Different Growth Phases at Two Cultivation Sites. *Microbial Ecology*, 64, 555–569.
- TRAN, T.K.A., MACFARLANE, G.R., KONG, R.Y.C., O’CONNOR, W.A. & YU, R.M.K. (2016) Potential mechanisms underlying estrogen-induced expression of the molluscan estrogen receptor (ER) gene. *Aquatic Toxicology*, 179, 82–94. Elsevier B.V.
- TREROTOLA, M., RELI, V., SIMEONE, P. & ALBERTI, S. (2009) Epigenetic inheritance and the missing heritability problem. *Genetics*, 182, 845–850. Human Genomics.
- TUDDENHAM, L., WHEELER, G., NTOUNIA-FOUSARA, S., WATERS, J., HAJIHOSEINI, M.K., CLARK, I. & DALMAY, T. (2006) The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells, 580, 4214–4217.
- TUNHOLI-ALVES, V.M., TUNHOLI, V.M., AMARAL, L.S., DA SILVA GARCIA, J., LIMA, M.G., DAMATTA, R.A. & PINHEIRO, J. (2019) Alterations in the Mitochondrial Physiology of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) After Experimental Infection by *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). *Acta Parasitologica*. Springer International Publishing.
- TWEEDIE, S., CHARLTON, J. & CLARK, V. (1997) Methylation of Genomes and Genes at the Invertebrate-Vertebrate Boundary, 17, 1469–1475.
- UBEDA, C. & PAMER, E.G. (2012) Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends immunology*, 33, 459–466.
- UEDA, K. & HAYAISHI, O. (1985) ADP-ribosylation. *Annual review of biochemistry*, 54, 73–100. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.

- VANDEGEHUCHTE, M.B. & JANSSEN, C.R. (2014) Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764–765, 36–45. Elsevier B.V.
- DE VANSAY, A., BOUGE, A.L., BOVIN, A., HERMANT, C., TEYSSET, L., DELMARRE, V., ET AL. (2012) Paramutation in *Drosophila* linked to emergence of a piRNA-producing locus. *Nature*, 490, 112–115.
- VAQUERO, A., LOYOLA, A. & REINBERG, D. (2003) The Constantly Changing Face of Chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2003.
- VASCONCELOS, G.J. & LEE, J.S. (1972) Microbial flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) subjected to ultraviolet-irradiated seawater. *Applied microbiology*, 23, 11–16.
- VEENENDAAL, M.V.E., PAINTER, R.C., DE ROOIJ, S.R., BOSSUYT, P.M.M., VAN DER POST, J.A.M., GLUCKMAN, P.D., ET AL. (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 120, 548–553.
- VERDEL, A., VAVASSEUR, A., GORREC, M.L.E. & TOUAT-TODESCHINI, L. (2009) Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways, 257, 245–257.
- VIGNAL, A., BOITARD, S., THEBAULT, N., DAYO, G.K., YAPI-GNAORE, V., YOUSAO ABDOU KARIM, I., ET AL. (2019) A guinea fowl genome assembly provides new evidence on evolution following domestication and selection in galliformes. *Molecular Ecology Resources*, 19, 997–1014.
- VILLA MARTIN, P., MUÑOZ, M.A. & PIGOLOTTI, S. (2019) Bet-hedging strategies in expanding populations. *PLoS computational biology*, 15, e1006529.
- VITOUSEK, P.M., MOONEY, H. A, LUBCHENCO, J. & MELILLO, J.M. (1997) Human Domination of Earth ' s Ecosystems. *Science*, 277, 494–499.
- VOLKER, M., BACKSTROM, N., SKINNER, B.M., LANGLEY, E.J., BUNZEY, S.K., ELLEGREN, H. & GRIFFIN, D.K. (2010) Copy number variation, chromosome rearrangement, and their association with recombination during avian evolution. *Genome Research*, 20, 503–511.
- WADDINGTON, C.H. (1942) The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18–20.
- WADDINGTON, C.H. (1953) Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution*, 7, 118.
- WALSH, M.R., IV, F.C., BILES, K. & MUNCH, S.B. (2014) Predator-induced phenotypic plasticity a challenge for theory? *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 1–9.
- WANG, L., SONG, X. & SONG, L. (2018) The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 99–118. Elsevier Ltd.
- WANG, T., HUANG, X., JIANG, X., HU, M., HUANG, W. & WANG, Y. (2019) Differential in vivo hemocyte responses to nano titanium dioxide in mussels: Effects of particle size. *Aquatic Toxicology*, 28–36. Elsevier B.V.
- WANG, W., ZHANG, T., WANG, L., XU, J., LI, M., ZHANG, A., ET AL. (2016) A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 65, 182–190. Elsevier Ltd.
- WANG, X., LI, Q., LIAN, J., LI, L., JIN, L., CAI, H., ET AL. (2014) Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation. *BMC Genomics*, 15.
- WANG, Y., LI, M., STADLER, S., CORRELL, S., LI, P., WANG, D., ET AL. (2009) Histone hypercitrullination

- mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184, 205–213.
- WANG, Y. & ROZEN, D.E. (2017) Gut Microbiota Colonization and *Nicrophorus vespilloides* throughout Development, 83, 1–13.
- WATANABE, T., TAKEDA, A., TSUKIYAMA, T., MISE, K., OKUNO, T., SASAKI, H., ET AL. (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: Retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes and Development*, 20, 1732–1743.
- WATKINS, A.J., LUCAS, E.S. & FLEMING, T.P. (2010) Impact of the periconceptual environment on the programming of adult disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1, 87–95.
- WEI, L., XU, F., WANG, Y., CAI, Z., YU, W., HE, C., ET AL. (2018) The Molecular Differentiation of Anatomically Paired Left and Right Mantles of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 20, 425–435. *Marine Biotechnology*.
- WEINHOLD, A. (2018) Transgenerational stress-adaption : an opportunity for ecological epigenetics. *Plant Cell Reports*, 37, 3–9. Springer Berlin Heidelberg.
- WEINHOUSE, C. (2017) Mitochondrial-epigenetic crosstalk in environmental toxicology. *Toxicology*, 391, 5–17. Elsevier Ireland Ltd.
- WEISS, K.M. (2018) Evolution. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*. <https://doi.org/10.1002/9781118584538.ieba0167>.
- WEITERER, S., UHLE, F., LICHTENSTERN, C., SIEGLER, B.H., BHUJU, S., JAREK, M., ET AL. (2015) Sepsis induces specific changes in histone modification patterns in human monocytes. *PLoS ONE*, 10, 1–13.
- WENG, M. & WALKER, W.A. (2013) The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease*, 71, 233–236.
- WESTERN, D. (2001) Human-modified ecosystems and future evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 5458–5465.
- WHITEN, A., HORNER, V. & DE WAAL, F.B.M. (2005) Conformity to cultural norms of tool use in chimpanzees. *Nature*, 437, 737–740.
- WICKHAM, H. (2016) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.
- WICKHAM, H. & HENRY, L. (2017) Tidy: Easily tidy data with 'spread ()' and 'gather ()' functions. *R package version 0.6*, 1.
- WINTHER, R.G. (2001) August Weismann on germ-plasm variation. *Journal of the History of Biology*, 34, 517–555.
- WOODCOCK, D.M., LAWLER, C.B., LINSSENMEYER, M.E., DOHERTY, J.P. & WARREN, W.D. (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7810–7816.
- WRIGHT, S.L., THOMPSON, R.C. & GALLOWAY, T.S. (2013) The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, 483–492. Elsevier Ltd.
- WU, H.J. & WU, E. (2012) The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, 3.

- YAMAMOTO, Y. & GAYNOR, R. (2005) Role of the NF- κ B Pathway in the Pathogenesis of Human Disease States. *Current Molecular Medicine*, 1, 287–296.
- YANG, N. & KAZAZIAN, H.H. (2006) L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13, 763–771.
- YIN, J., LEAVENWORTH, J.W., LI, Y., LUO, Q., XIE, H., LIU, X., ET AL. (2015) Ezh2 regulates differentiation and function of natural killer cells through histone methyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201521740.
- YIN, J., ZHOU, M., LIN, Z., LI, Q.Q. & ZHANG, Y. (2019) Transgenerational effects benefit offspring across diverse environments: a meta-analysis in plants and animals. *Ecology Letters*, 1976–1986.
- YU, H., ZHAO, X. & LI, Q. (2016) Genome-wide identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster. *Scientific Reports*, 6, 20796.
- ZEMACH, A., MCDANIEL, I.E., SILVA, P. & ZILBERMAN, D. (2010) Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 328, 916–919.
- ZHANG, G., FANG, X., GUO, X., LI, L., LUO, R., XU, F., ET AL. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49–54.
- ZHANG, G., HUANG, H., LIU, D., CHENG, Y., LIU, X., ZHANG, W., ET AL. (2015) N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell*, 161, 893–906. Elsevier Inc.
- ZHANG, H. & ZHU, J.-K. (2011) RNA-directed DNA Methylation. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 142–147.
- 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, 1–11.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. (2011a) A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 653–660.
- ZHANG, L., LI, L. & ZHANG, G. (2011b) Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental and Comparative Immunology*, 35, 603–610.
- ZHANG, T., QIU, L., SUN, Z., WANG, L., ZHOU, Z., LIU, R., ET AL. (2014) The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 45, 141–150.
- 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, 1–15.
- ZHANG, Y. & REINBERG, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15, 2343–2360.
- ZHAO, L., SCHÖNE, B.R., MERTZ-KRAUS, R. & YANG, F. (2017) Sodium provides unique insights into transgenerational effects of ocean acidification on bivalve shell formation. *Science of the Total Environment*, 577, 360–366. Elsevier B.V.
- ZHAO, L., YANG, F., MILANO, S., HAN, T., WALLISER, E.O. & SCHÖNE, B.R. (2018) Transgenerational acclimation

to seawater acidification in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*: Preferential uptake of metabolic carbon. *Science of the Total Environment*, 627, 95–103. Elsevier B.V.

- ZHAO, X., YU, H., KONG, L., LIU, S. & LI, Q. (2016) High throughput sequencing of small RNAs transcriptomes in two *Crassostrea* oysters identifies microRNAs involved in osmotic stress response. *Scientific Reports*, 6, 1–11.
- ZHOU, V.W., GOREN, A. & BERNSTEIN, B.E. (2011) Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics*, 12, 7–18.
- ZHOU, Z., WANG, L., SONG, L., LIU, R., ZHANG, H., HUANG, M. & CHEN, H. (2014) The identification and characteristics of immune-related MicroRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 9, 1–9.
- ZIEGLER, C., RICHTER, J., MAHR, M., GAJEWSKA, A., SCHIELE, M.A., GEHRMANN, A., ET AL. (2016) MAOA gene hypomethylation in panic disorder - Reversibility of an epigenetic risk pattern by psychotherapy. *Translational Psychiatry*, 6, 1–8. Nature Publishing Group.
- 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, 723–735.
- ZIMMER, C. (2012) Introduction à l'évolution Ce merveilleux bricolage de boeck.
- DE ZOYSA, M., NIKAPITIYA, C., WHANG, I., LEE, J.S. & LEE, J. (2009) Abhisin: A potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 27, 639–646. Elsevier Ltd.

Annexes

Etude des modifications d'histones chez *C. gigas*

La corrélation entre méthylation de l'ADN et expression des gènes n'est à l'heure actuelle pas clairement établie chez les mollusques, laissant planer l'hypothèse que d'autres mécanismes rentrent en jeu dans cette interaction, notamment les marques d'histones qui n'ont encore jamais été étudiées par CHIP-Seq chez l'huître. De plus, la question de la mémoire immunitaire innée chez les mollusques est un axe majeur au laboratoire IHPE et de nombreuses études ont montré l'implication de marques d'histone dans cette immunité innée chez des organismes modèles (Stender & Glass, 2013). C'est pourquoi nous avons choisi au début de ma thèse d'étudier les marques d'histones chez *C. gigas*. Ceci n'a encore, à notre connaissance, jamais été réalisé sur l'huître. C'est pourquoi une partie de ma thèse a consisté en la mise au point de la méthode d'immuno précipitation de la chromatine, méthode permettant d'identifier des modifications d'histones spécifiques. Ces travaux ont abouti à des résultats surprenants mais retrouvés chez d'autres espèces de mollusques : l'huître perlière (Pierre-Louis Stenger, communication personnelle et l'escargot *Biomphalaria glabrata*, Chrystelle Lassica, communication personnelle). A l'heure actuelle, les travaux présentés dans cette annexe de ma thèse n'ont pas fait l'objet d'une publication scientifique mais feront partie d'un article sur la technique du CHIP-seq chez les mollusques dont l'écriture conjointe avec Pierre-Louis Stenger et Chrystelle Lassica est prévue prochainement.

1- Présentation et mise au point du CHIP-seq

La méthode de Chip-Seq (Immunoprécipitation de la chromatine suivie par un séquençage massif) permet d'étudier les structures chromatinienne. Le CHIP-Seq se décompose en différentes étapes (Figure 10). Tout d'abord la chromatine est extraite des tissus par broyage manuel en utilisant un dounce et un pellet. Ensuite, elle est fragmentée afin de séparer les nucléosomes. Les nucléosomes individualisés sont ensuite mis en contact avec des anticorps spécifiques des marques d'histones que nous souhaitons étudier. Les nucléosomes sur lesquels sont fixés les anticorps sont alors immunoprécipités puis élués afin d'obtenir les fragments d'ADN correspondant aux histones portant les marques ciblées. Ces fragments sont ensuite séquencés en séquençage massif.

Enfin il était nécessaire de s'assurer que les anticorps utilisés soient bien spécifiques de la marque d'histone ciblée. Ainsi afin de tester la spécificité de ces anticorps nous avons effectué des analyses par western-blot, suivies de CHIP sur lesquels nous avons réalisé des titrations par qPCR.

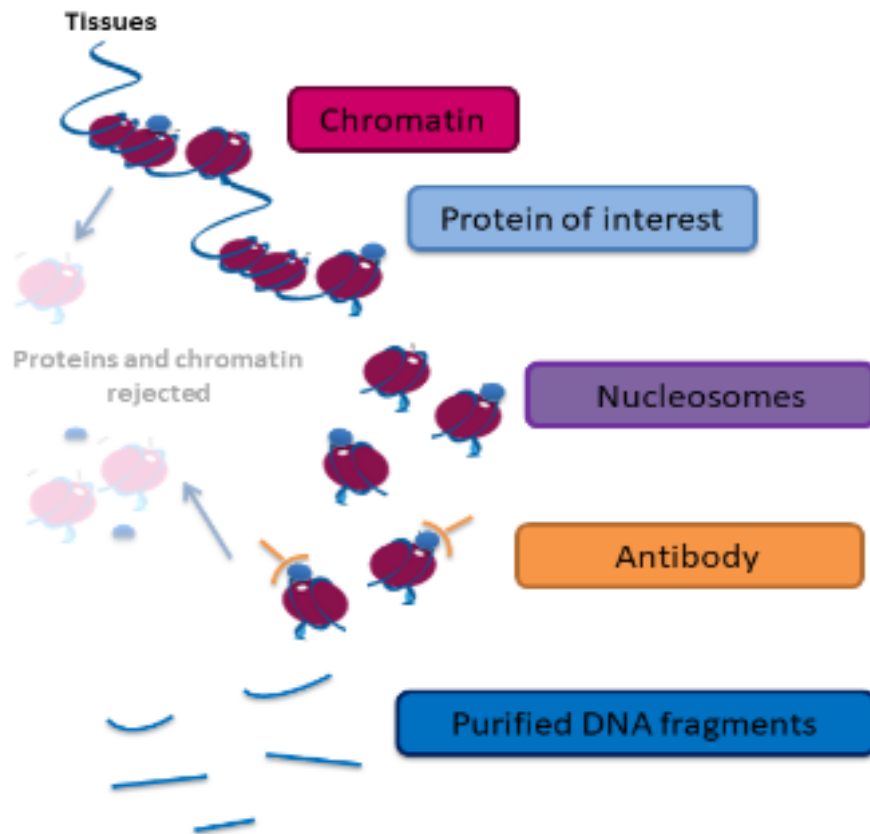


Figure 1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'ImmunoPrécipitation de la Chromatine (ChIP)

1- Extraction et digestion de la chromatine :

a- Natif ChIP

En ChIP natif, la fragmentation de la chromatine est réalisée par digestion à la micrococcale nucléase. Le ChIP natif a bien fonctionné au laboratoire sur *Schistosoma mansoni* (Cosseau et al., 2009), nous avons donc utilisé le même protocole mais l'avons adapté à l'huître. Tout d'abord il a fallu optimiser l'extraction de la chromatine, pour cela nous avons testé plusieurs tissus d'huîtres et différents stades de développement. Afin de s'assurer d'une digestion optimale nous avons testé différents temps de digestion.

Différents tissus d'huître ont été testés (larves, manteau, branchies, petites huîtres entières âgées d'une cinquantaine de jours). Ces tissus ont été broyés à l'aide d'un dounce dans de la glace pendant 7 min. Par ailleurs, pour des larves âgées de 58 jours (avec un début de coquille), nous avons réalisé un pré-broyage suivi d'une brève centrifugation afin de limiter les débris de coquille. Des tissus frais ou congelés à -80°C ont été testés. Les noyaux ont ensuite été extraits comme indiqué dans le protocole (<http://www.methdb.net/>). Ensuite, une digestion de la chromatine à l'aide d'une micrococcale nucléase a été effectuée. Plusieurs temps de digestion ont été testés. Cette digestion est effectuée à 37°C .

Nous observons bien une échelle pour le temps de digestion de 4 minutes et ceci pour chacun des tissus testés (Figure 12). C'est donc cette durée de digestion qui a été retenue pour les manipulations finales. Ce test a également été effectué sur des tissus de pied congelés de *B. glabrata* pour d'éventuelles futures expériences, le temps de 4 minutes a également été retenu.

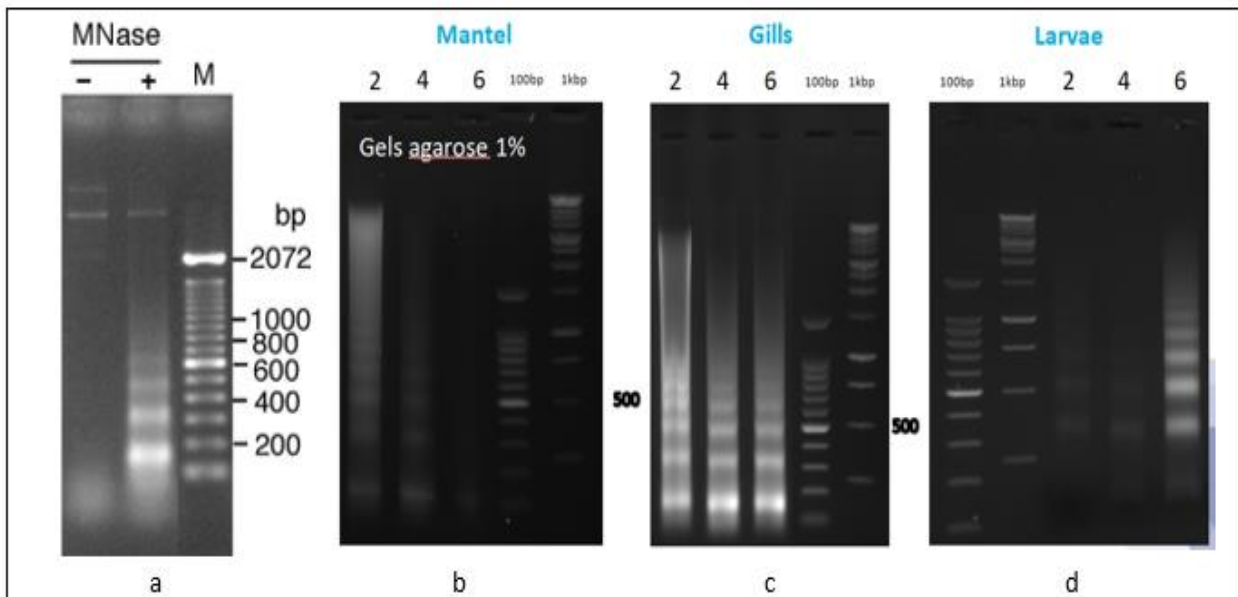


Figure 2 : Digestion à la micrococcale nucléase. a) Echelle attendue suite à une digestion à la micrococcale nucléase, les bandes blanches représentent les mononucléosomes, les dinucléosomes... Plus la micrococcale nucléase agit longtemps plus l'ADN est dégradé et donc plus on obtient de mononucléosomes. Si la digestion n'est pas totale, nous observons différentes bandes correspondant à des mono, des di, des tri... nucléosomes. Pour le bon fonctionnement du CHIP nous devons avoir différentes taille de nucléosomes et donc observer un motif « en échelle » après la migration à l'électrophorèse. Figure tirée de (Suka et al., 2006) b) c) et d) Nos résultats de digestion pour différents tissus d'huitre (b : manteau, c : branchies, d : larves) les chiffres en haut représentent les temps de digestion en minutes (2, 4 et 6 min). 100bp et 1Kp représentent les marqueurs de tailles

b- X-ChIP

Les résultats concernant le ChIP natif étant surprenants, nous avons également mis au point le ChIP crosslink (X-ChIP) sur l'huitre creuse. En ChIP crosslink, la chromatine n'est pas digérée avec la micrococcale nucléase comme en natif mais elle est fragmentée par sonication.

La chromatine a été extraite en suivant le protocole Auto iDeal ChIP-seq kit for Histones de Diagenode (<https://www.diagenode.com>). La durée de sonication a été optimisée via des tests (Figure 13). L'apparition d'une bande blanche continue permet de visualiser la dégradation de la chromatine. Ici nous obtenons une belle bande après 3 cycles de sonication, un cycle correspondant à 5 min avec une alternance de 5 fois 30s on et 5 fois 30s off.

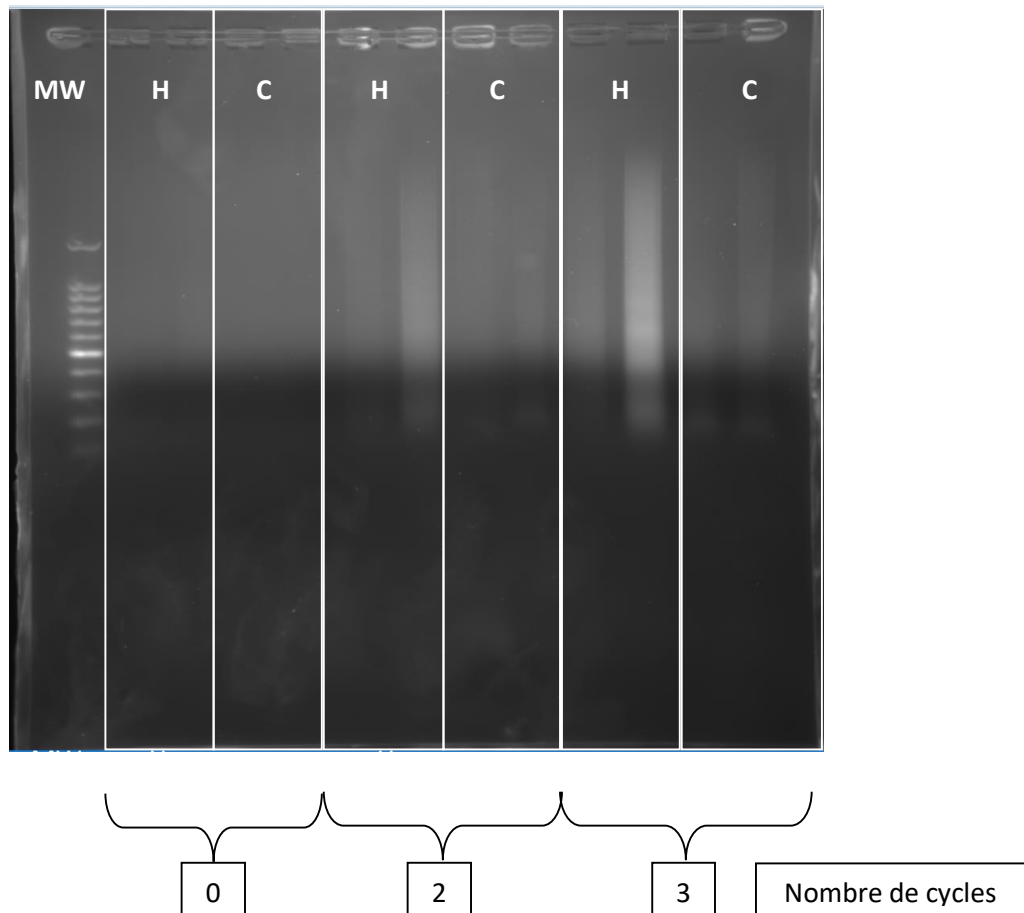


Figure 3 : Migration sur gel d'agarose à 1%. MW = Marqueur de taille, H = Branchie d'Huitre, C = Cerveau de Hamster

2- Utilisation des anticorps

a- Choix des anticorps testés

Nous avons choisi d'étudier les marques d'histones les plus citées dans la littérature comme pouvant être modifiées en réponse à différents stress. Les marques H3K4me3 et H3K9ac diminuent lors d'une septicémie chez l'Homme tandis que la marque H3K27me3 augmente (Weiterer et al., 2015). La marque H3K4me3 montre également une telle diminution en réponse à une septicémie chez la souris (Carson et al., 2011). Chez le poulet, des modifications de H3K4me3 et H3K27me3 ont été montrées comme impliquées dans les propriétés antivirale, la suppression de la réponse immunitaire, l'augmentation des cellules tumorales et le développement et la progression de cancers dans des organes variés, l'activité intrinsèque des histones acétyltransférases, la répression transcriptionnelle, l'activation et la différenciation des lymphocytes (Mitra et al., 2012). H3K4me3 intervient encore dans la différenciation des monocytes en macrophages chez l'Homme (Saeed et al., 2014) et chez la souris où intervient également H3K27ac (Lavin et al., 2014). Toujours chez la souris, H3K27me3 est liée à l'augmentation de la production de cellules NK et l'efficacité de l'immunité innée (Yin et al., 2015). Ces

marques sont également impliquées dans la « trained immunity » (Netea et al., 2016; Novakovic et al., 2016), immunité qui a été mise en évidence chez le mollusque *B. glabrata* (Pinaud et al., 2016).

b- Spécificité des anticorps

La spécificité des anticorps a été testée via Western-Blot, nous avons utilisé du cerveau de hamster comme contrôle positif. Après la migration sur le gel, si nous observons une seule bande à la taille d'une histone (16 Da), alors l'anticorps est considéré comme spécifique. Ensuite pour vérification, nous avons effectué une titration du ChIP. Cette expérience consiste à faire plusieurs chip avec une quantité croissante d'anticorps. Si un anticorps est spécifique de la marque d'histone ciblée, alors la quantité d'ADN immunoprécipité va augmenter jusqu'à atteindre une valeur seuil où l'enrichissement va stagner car toutes les marques seront « occupées ». A l'inverse si l'anticorps n'est pas spécifique, l'enrichissement n'atteindra pas cette valeur seuil et il va augmenter jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'anticorps en solution (Figure 14). L'enrichissement de la fraction immunoprécipitée se mesure par une approche ciblée par qPCR. Nous avons réalisé cette approche sur 3 gènes cibles : actine, 40S et alpa-tubuline. Le taux d'enrichissement de la fraction immunoprécipitée est calculé par rapport à un input (fraction non immunoprécipitée) tout en vérifiant que le bruit de fond (fraction immunoprécipitée sans anticorps) est négligeable.

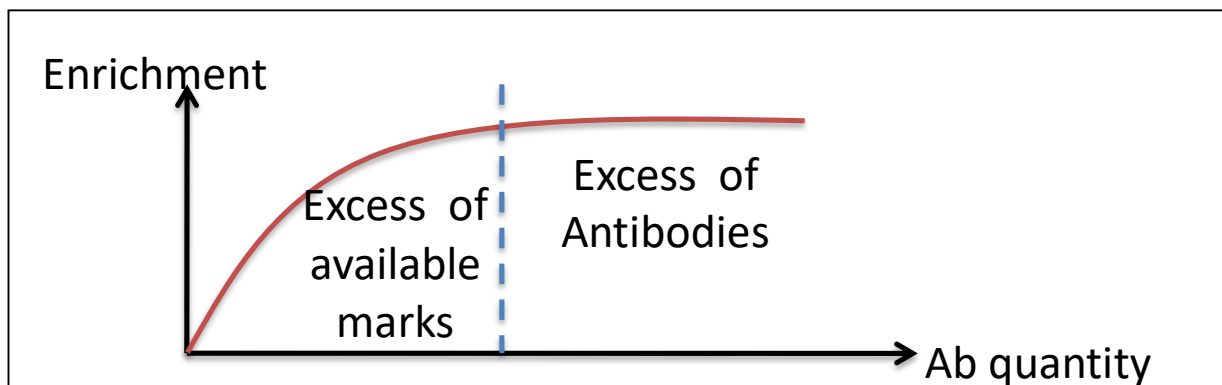


Figure 4 : Courbe attendue en cas de spécificité d'un anticorps. Au départ il y a plus de marques d'histone cibles que d'anticorps, l'enrichissement augmente donc de façon exponentielle. A un moment les deux sont à l'équilibre, puis les anticorps sont en excès, toutes les marques cibles sont occupées. On atteint alors un plateau et l'enrichissement se stabilise.

Les anticorps testés sont des anticorps commerciaux commandés chez différents fournisseurs : Abcam, Diagenode, Millipore et Actif Motif. Il est rare qu'un anticorps, même commercial soit spécifique d'une marque d'histone donnée chez toutes les espèces. Nous avons donc testé différents anticorps (par Western et ChIP) avant d'en trouver des convenables pour notre ChIP-seq. Nous avons également testé des anticorps sur *B. glabrata* en vue d'expériences futures.

La figure 15 montre les résultats obtenus en Western comme en CHIP dans le cas d'un anticorps non spécifique : en Western Blot pour l'huitre nous observons deux bandes et non pas une seule et l'enrichissement lors de la titration par qPCR n'atteint pas de valeur seuil.

La figure 16 montre les résultats obtenus en Western comme en CHIP dans le cas d'un anticorps spécifique : en Western Blot pour l'huitre nous observons une seule bande et l'enrichissement lors de la titration par qPCR atteint une valeur seuil. Cet anticorps est donc utilisable en CHIP-Seq.

c- Conclusion sur la spécificité des anticorps :

Pour *C. gigas*, nous avons trouvé 3 anticorps bien spécifiques, il s'agit de l'anticorps anti-H3K4me3 d'Abcam, l'anticorps anti-H3K27me3 de Diagenode et l'anticorps anti-H3K27ac d'Acam (Tableau 5).

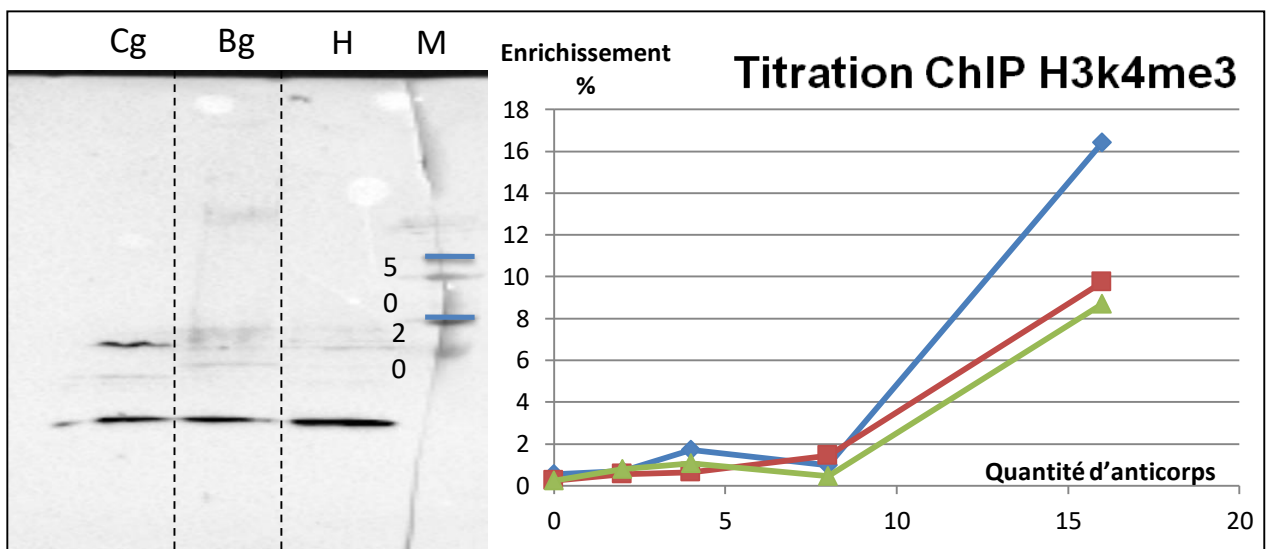


Figure 5 : Exemple d'anticorps non spécifique pour l'huitre : l'anticorps ciblant H3K4me3 de Diagenode. A gauche le Western Blot : Cg correspond à *C. gigas*, Bg correspond à *B. glabrata* et H correspond à du hamster (contrôle positif). MW = marqueur de taille. On observe deux bandes distinctes sur le Western-Blot pour Cg. A droite la titration par qPCR : l'enrichissement n'atteint pas la valeur seuil.

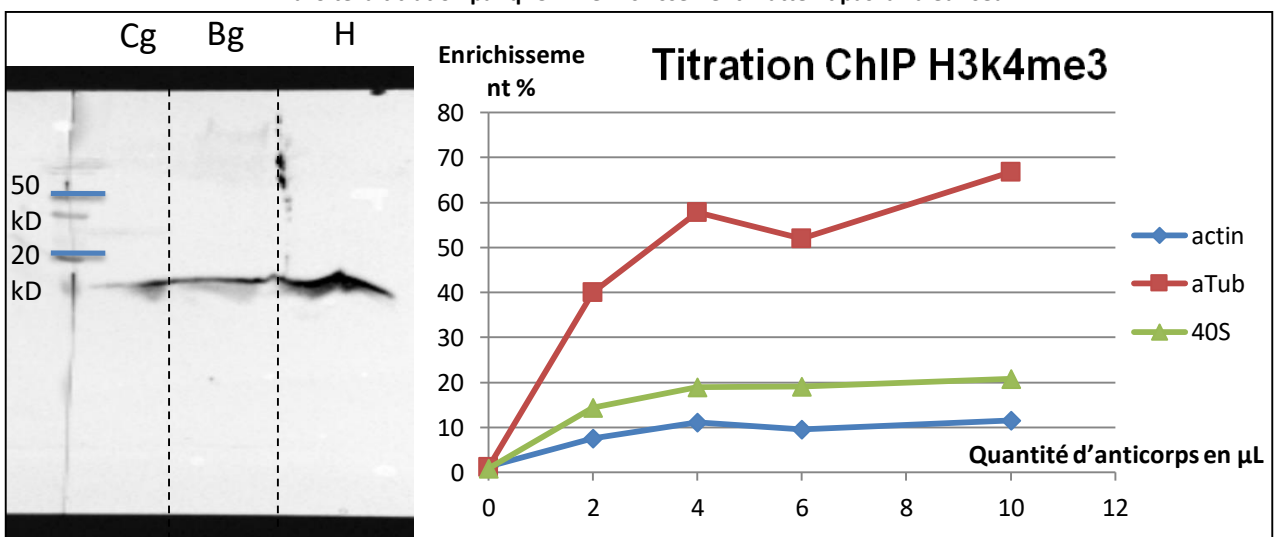


Figure 6 : Exemple d'anticorps spécifique pour l'huitre : l'anticorps ciblant H3K4me3 d'Abcam. Cg correspond à *C. gigas*, Bg correspond à *B. glabrata* et H correspond à du hamster (contrôle positif). MW = marqueur de taille. Nous observons une bande unique sur le Western-Blot pour Cg et la titration atteint un seuil.

Pour *B. glabrata*, un seul anticorps a fonctionné à la fois en Western et en CHIP (H3K9ac d'Abcam) mais de nombreuses expériences restent à faire (Tableau 6). A noter que les résultats entre *C. gigas* et *B. glabrata* ne sont pas identiques, certains anticorps fonctionnent bien chez un organisme mais pas chez l'autre ce qui montre bien la complexité à trouver des anticorps spécifiques pour une espèce donnée.

Tableau 1 : Résultats obtenus sur les différents anticorps testés sur *C. gigas*. En vert les résultats positifs et en magenta les résultats négatifs. En blanc, les expériences qui restent à faire. WB = Western Blot, Ac = anticorps.



	H3K4me3	H3K27me3	H3K27ac	H3K9ac	H3K9me3
Abcam	WB OK	WB no signal	WB OK	WB à tester	WB à tester
	ChIP OK	ChIP no enrichment	ChIP OK	ChIP à tester	ChIP à tester
Diagenode	WB OK	WB OK	WB à tester	WB à tester	WB à tester
	Ac non specific	ChIP OK	ChIP à tester	ChIP à tester	ChIP à tester
Millipore	WB OK	WB à tester	WB à tester	WB OK	WB OK
	Ac non specific	ChIP a tester	ChIP à tester	ChIP a tester	ChIP à tester
Active Motif	No Ac	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester

Tableau 2 : Résultats obtenus sur les différents anticorps testés sur *B. glabrata*. En vert les résultats positifs et en magenta les résultats négatifs. En blanc, les expériences qui restent à faire. WB = Western Blot, Ac = anticorps.



	H3K4me3	H3K27me3	H3K27ac	H3K9ac	H3K9me3
Abcam	WB OK	WB no signal	WB no signal	WB OK	WB à tester
	ChIP OK	ChIP no enrichment	ChIP à tester	ChIP OK	ChIP à tester
Diagenode	WB OK	WB OK	WB à tester	WB à tester	WB à tester
	Ac non specific	ChIP OK	ChIP à tester	ChIP à tester	ChIP à tester
Millipore	WB OK	WB à tester	WB à tester	WB OK	WB OK
	Ac non specific	ChIP a tester	ChIP à tester	ChIP a tester	ChIP à tester
Active Motif	No Ac	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester	WB à tester ChIP à tester

2- Résultats

Le développement des naissains dans un environnement riche en microorganismes permet donc d'améliorer leur taux de survie. Afin de regarder si cette adaptation est soumise à des régulations épigénétiques nous avons réalisé des CHIP sur les individus F1 prélevés à 2, 10 et 58 jours au cours de la production du matériel biologique. Nous avons réalisé 3 répliquas par condition et par famille. La

majorité des expériences a fonctionné mais la plupart avec un bruit de fond très fort (fraction contrôle sans anticorps). On a donc un enrichissement malgré le non ajout d'anticorps dans cette fraction. Ceci est un résultat inhabituel pour un CHIP, il est possible qu'une trop grande quantité d'ADN soit extraite au départ provoquant ce fort bruit de fond.

Parmi les expériences présentant un faible bruit de fond (<1%), nous avons envoyé à séquencer un échantillon. Les résultats de séquençage obtenus (cf exemples Figure 15 et 16) sont quasiment similaires entre les trois marques étudiées et la fraction d'ADN non liée. Ceci est surprenant, la fraction non liée ne devrait pas ou presque pas présenter de pics ce qui n'est pas le cas ici. De plus, les différentes marques devraient présenter des patterns différents. De façon surprenante, les portions du génome enrichies en marque d'histone correspondent à des zones fortement méthylées. De plus, certaines portions du génome sont fortement enrichies en marques d'histone dans les zones promotrices des gènes codants (Figure 16). Il est possible que chez l'huitre, l'ADN soit très compact et que les signaux que nous avons réussi à obtenir soient une empreinte de l'activité de la microccocale nucléase, nous aurions donc des signaux seulement aux endroits où celle-ci a pu digérer l'ADN.

L'ensemble de ces résultats a amené une nouvelle réflexion quant à la cohérence biologique et/ou à l'efficacité de la méthode utilisée. C'est pourquoi nous avons mis au point le X-CHIP afin de savoir si nos résultats surprenants provenaient d'un problème avec la microccocale nucléase, le X-CHIP permettant de s'en affranchir.



Figure 7 : Résultats du CHIP-Seq pour un échantillon sur le scaffold 296. En bleu, la marque H3K4me3, en rouge H3K27ac, en vert H3K27me3 et en gris UB- = la fraction non liée. Les pics représentent les zones enrichies du gène ou les histones possèdent les différentes marques. La hauteur des pics représente la couverture en reads. La cinquième piste correspond à la méthylation du gène, chaque barre est une cytosine méthylée, la hauteur des barres correspond au pourcentage de méthylation. En bas, le transcriptome de *C. gigas* a été rajouté.



Figure 8 : Résultats du ChIP-Seq pour un échantillon sur le scaffold 556. En bleu, la marque H3K4me3, en rouge H3K27ac, en vert H3K27me3 et en gris UB- = la fraction non liée. Les pics représentent les zones enrichies du gène ou les histones possèdent les différentes marques. La hauteur des pics représente la couverture en reads. La cinquième piste correspond à la méthylation du gène, chaque barre est une cytosine méthylée, la hauteur des barres correspond au pourcentage de méthylation. En bas, le transcriptome de *C. gigas* a été rajouté.

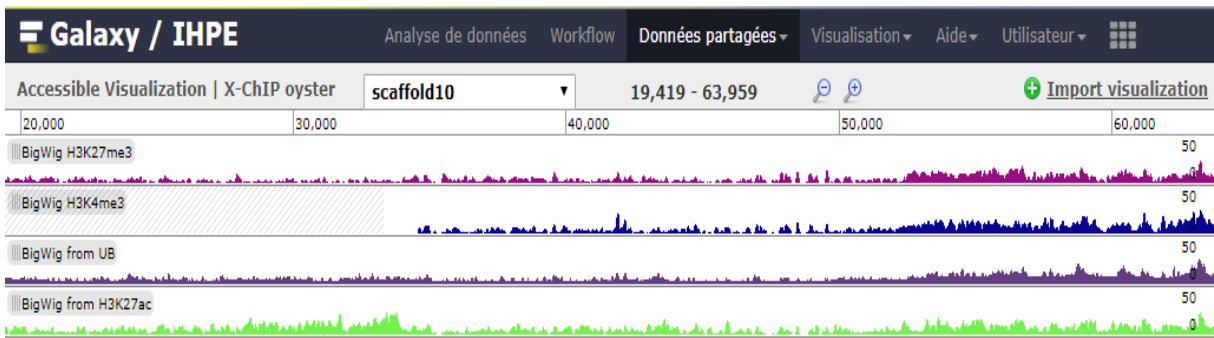


Figure 9 : Résultats du X-ChIP-Seq pour un échantillon sur le scaffold 10. En bleu, la marque H3K4me3, en magenta H3K27ac, en vert H3K27me3 et en violet UB = la fraction totale. Les pics représentent les zones enrichies du gène ou les histones possèdent les différentes marques. La hauteur des pics représente la couverture en reads.

Nous avons envoyé à séquencer un échantillon X-ChIP en séquençage paired-end 2 x 75 pb. Les résultats issus du X-ChIP restent semblables à ceux obtenus en natif ChIP (Figure 17). Les discussions concernant le ChIP sur l’huitre creuse sont donc toujours en cours.

Conclusion :

Beaucoup de travail a été effectué pour mettre au point le ChIP sur l’huitre creuse. Mais un fort bruit de fond, observé surtout suite au séquençage massif, ressort. La technique du ChIP sur *C. gigas* n’est donc pas utilisable pour le moment.

Glossaire

A

Abiotique : « Se dit d'un facteur lié au milieu, indépendant des êtres vivants » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Acétophénone : Composé organique de type cétone dont la formule est la suivante : $C_6H_5COCH_3$.

Acétylation : « Substitution dans une molécule d'un atome d'hydrogène par un radical acétyle. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Acétyltransférase : Enzyme qui transfère un groupement acétyle de l'acétyl CoA (thioester formé par l'association entre le coenzyme A et un groupe acétyle), à la lysine (Roth et al., 2001).

Acides lipotechoïques : Acide téichoïque (polymère de glycérol et de ribitol relié à des groupes phosphate) lié à un diglycéride par une liaison ester. C'est un constituant de la paroi des bactéries Gram +.

Adaptation : « Changement survenu chez un individu animal ou végétal, à une lignée ou à une espèce, et qui augmente leurs chances de survie et de reproduction dans le milieu où ils vivent. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Adénine : Une des bases constitutives des acides nucléiques.

ADP ribosylation : Modifications post-traductionnelles des protéines consistant en l'ajout d'unités ADP-ribose (Ueda & Hayaishi, 1985).

Aneuploïdie : « Etat d'une cellule ou d'un individu dont le lot chromosomique est caractérisé par la présence ou la perte d'un ou de plusieurs chromosomes entiers. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Angiogenèse : Processus de mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins.

Animalculisme : Théorie biologique qui avance que l'embryon est un développement du spermatozoïde (<https://www.universalis.fr>).

Anticorps : « Protéine du sérum sanguin sécrétée par les lymphocytes B en réaction à l'introduction d'une substance étrangère dans l'organisme. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Apoptose : Mécanisme de mort cellulaire programmée.

Arginine : Un des acides aminés constituant les protéines.

B

Benthique : Relatif au fond des mers, océans et eaux douces.

Biodiversité : « Nombre d'espèces présentes sur une surface donnée, avec leur niveau d'adaptation comportementale, écologique, physiologique et autres » (Raven et al., 2012).

Biotique : « Se dit des facteurs liés à l'activité des êtres vivants » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Blastomères : « Cellules résultant des divisions successives de l'œuf fécondé chez les animaux » (Dictionnaire Larousse, 2019).

C

Caryotype : « Ensemble des chromosomes d'un individu » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Cavortin : Protéine présente dans l'hémolymphe des huîtres du genre *Crassostrea* (Scotti et al., 2007).

Cellules germinales : « cellules qui sont destinées à produire les gamètes » (Raven et al., 2012).

Cellules T : Egalement appelées lymphocytes T, ce sont des globules blancs impliqués dans la réponse immunitaire adaptative chez les vertébrés.

Citrullination : conversion de l'arginine en citrulline (Méchin et al., 2011).

Co-facteurs : Substance inorganique requise pour déclencher une réaction catalytique.

Cytokine : « substance peptidique ou protéique synthétisée par une cellule du système immunitaire et agissant sur d'autres cellules immunitaires pour en réguler l'activité » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Cytosine : « Composé basique dérivé de la pyrimidine et constituant essentiel des acides nucléiques » (Dictionnaire Larousse, 2019).

D

Daphnie : « minuscule crustacé des étangs et des mares » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Défensines : peptides cationiques antimicrobiens impliqués dans la réponse immunitaire (Aubert & Sauty, 2011).

Dérive génétique : « Modification aléatoire des fréquences alléliques dans une population du fait de phénomènes stochastiques. L'importance de la dérive comme force évolutive dans une population sera d'autant plus importante que la taille efficace de cette population est petite » (Thomas et al., 2016).

Diploïde : « se dit d'une cellule ou d'un être vivant dont les chromosomes, semblables deux à deux, peuvent être associés par paires homologues » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Drépanocytose : « maladie héréditaire due à la présence dans les hématies d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

E

Ecosystème : Système complexe incluant les organismes, leurs interactions et leur environnement inanimé (modifié d'après Raven et al, 2012).

Enzyme : « Protéine capable d'accélérer des réactions chimiques spécifiques en abaissant l'énergie d'activation requise » (Raven et al., 2012).

Éléments transposables : Ségments d'ADN capables de changer de se déplacer et de se multiplier de manière autonome dans un génome. On parle aussi de transposons ou d'éléments génétiques mobiles (Raven et al., 2012; Thomas et al., 2016). Les retrotransposons sont des transposons nécessitant l'intermédiaire d'un ARN.

Épigénétique : l'étude des changements d'expression de gènes, réversibles et héréditaires mitotiquement et ou méiotiquement via les parents ou des ancêtres plus anciens, sans modification dans la séquence d'ADN des gènes (d'après Holliday & Pugh, 1975)

Épimutation : Changement héréditable du phénotype qui n'est pas dû à une altération de la séquence d'ADN mais à une modification épigénétique (Modifiée d'après Holliday, 1991).

Épithélium : « Chez les animaux, type de tissu couvrant une surface exposée ou tapissant un canal ou une cavité » (Raven et al., 2012).

Espèces réactives de l'oxygène : cellules impliquées dans la réponse inflammatoire comprenant les radicaux libres dérivés de l'oxygène, ions oxygénés et peroxide (Barnes, 1990; Donaghy et al., 2012).

Eucaryotes : « Se dit d'un organisme dont le noyau cellulaire est séparé du cytoplasme par une membrane. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Exons : Fragment codant de la séquence ADN d'un gène, transcrit en ARN et traduit en protéine (Raven et al., 2012; Thomas et al., 2016).

F

Facteurs de transcription : « Protéines nécessaires à la fixation de l'ARN polymérase à une région promotrice eucaryote, à sa stabilisation et au déclenchement du processus de transcription » (Raven et al., 2012).

Fonctions de ménage (housekeeping genes) : gènes constitutifs dont l'expression est nécessaire pour le maintien du fonctionnement cellulaire de base, ils sont exprimés de façon basale dans toutes les cellules des organismes (Eisenberg & Levanon, 2003).

G

Génétique : « Relatif à l'hérédité, aux gènes » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Génotype : « Ensemble des caractères génétique d'un être vivant, qu'ils se traduisent ou non dans son phénotype. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Glycoprotéine : « Substance formée d'une protéine liée à un glucide. » (Dictionnaire Larousse, 2019)

Glycosylation : réaction enzymatique consistant en la liaison entre un glucide et une autre molécule.

H

Hémocytes : Cellules sanguines circulantes immunocompétentes contenus dans l'hémolymphe mais aussi capables d'infiltrer les cavités, tissus et l'épithélium des huîtres (Bachere et al., 2004; Bachère et al., 2015).

Hémolymphe : « Sang (liquide circulant) des invertébrés, généralement incolore » (Thomas et al., 2016).

Hémoglobine : « Pigment protéique des globules rouges du sang, assurant le transport de l'oxygène entre l'appareil respiratoire et les cellules de l'organisme. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Hérédité : le pattern de ressemblance parent-enfant.

Héritabilité : proportion de la variabilité phénotypique due à des changements de facteurs héréditaire.

Héritabilité écologique : impact d'un organisme sur l'environnement futur de ses descendants.

Histone : Protéine associée à l'ADN des chromosomes (Dictionnaire Larousse, 2019).

Holobionte : Association d'un organisme et des symbiotes et pathogènes qu'il contient (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Hologénome : Ensemble regroupant le génome du microbiote et celui de l'hôte, formant une nouvelle unité évolutive (Rosenberg et al., 2007).

Homoncule : « Au 18^{ème} siècle, nom donné par les scientifiques spermatises au petit homme qu'ils croyaient discerner au microscope dans le spermatozoïde. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Hormones : « substance sécrétée par une glande endocrine, libérée dans la circulation sanguine et destinée à agir de manière spécifique sur un ou plusieurs organes cibles afin d'en modifier le fonctionnement. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Humoral : « relatif au sang ou au sérum. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Hydroxyméthylation : Ajout d'un groupement hydroxyle sur un groupement méthyle.

I

Ilots CpGs : régions du génome comportant une forte concentration en dinucléotides CG.

Immunité systémique : réponse immunitaire à l'échelle globale d'un organisme.

Intérférence par l'ARN : « type de blocage d'un gène dans lequel la transcription du transcrit d'ARNm est empêchée par une interférence avec un ARN » (Raven et al., 2012).

Interféron : « protéine produite dans les cellules infectées par un virus et inhibant la multiplication de ce virus » (Raven et al., 2012)

Introns : « Fraction d'ADN présente dans un gène, intercalée entre les exons, dépourvue d'information relative à la synthèse d'une protéine. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

K

Kinétochore : assemblages protéiques situés au niveau des centromères des chromosomes intervenant dans la division cellulaire (Santaguida & Musacchio, 2009).

L

Larve véligère : Stade de développement larvaire des mollusques.

Lipopolysaccharides ou lipoglycanes : constituants de la paroi bactérienne des bactéries Gram -.

Locus : « Emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Lymphocytes : « cellule du système immunitaire, responsable des réactions de défense de l'organisme contre les substances qu'il considère comme étrangères. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Lysine : Acide aminé essentiel, présent dans les extrémités N-terminales des histones, pouvant porter différentes modifications chimiques.

M

Méiose : « Double division de la cellule aboutissant à la réduction de moitié du nombre des chromosomes, et qui se produit au moment de la formation des cellules reproductrices, ou gamètes. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Métabolisme : « Ensemble des processus complexes et incessants de transformation de matière et d'énergie par la cellule ou l'organisme, au cours des phénomènes d'édification et de dégradation organique. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Méthylation : « Substitution, dans une molécule, d'un radical méthyle à un atome d'hydrogène » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Microbiote : L'ensemble des micro-organismes colonisateurs présents chez un hôte (Collado et al., 2012).

Mitose : « Mode de division de la cellule, caractérisé par la duplication de tous ses éléments et par leur répartition égale dans les deux cellules filles. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Mutation : Apparition d'un changement dans la séquence d'ADN ou sur un des porteurs de l'information épigénétique.

N

Naissain : « Ensemble de jeunes mollusques (huîtres ou moules) qui viennent d'éclore. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Neddylation : Modification d'une protéine via une cascade de réactions enzymatiques et impliquant la protéine NEDD8 de type ubiquitine (<https://www.sciencedirect.com>).

Norme de réaction : représentation graphique l'expression d'un génotype selon l'environnement.

Nucléosome : octamères protéiques composés d'histones : deux copies de H2A, H2B, H3 et H4 autour desquelles sont enroulées entre 145 et 147 paires de base d'ADN (Kornberg, 1974).

Nucléotide : « Molécule biologique résultant de l'union d'un nucléoside avec l'acide phosphorique, intervenant dans le métabolisme de la cellule et entrant dans la composition des acides nucléiques. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

O

Ontogénèse : « Développement d'un organisme depuis sa conception jusqu'à sa mort » (Thomas et al., 2016).

Ose : « Nom générique des glucides ne comportant qu'une seule chaîne carbonée sans ramification. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

P

Peptides antimicrobiens : peptides impliqués dans la réponse immunitaire intervenant durant la phagocytose et dans la lutte contre les cellules pathogènes (Bulet et al., 2004; Brogden, 2005).

Phénotype : l'ensemble des caractéristiques observables d'un individu.

Phosphorylation : « Mécanisme aboutissant à la fixation d'une molécule d'acide phosphorique sur une autre molécule, le plus souvent un ose » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Plasticité phénotypique : gamme de variabilité des phénotypes que peut prendre un génotype donné sous les effets de l'environnement (Fusco & Minelli, 2010; Thomas et al., 2016).

Probiotiques : « Se dit d'un micro-organisme vivant (bactérie ou levure) qui, ingéré en quantité suffisante, a un effet bénéfique sur la santé » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Procaryotes : « Micro-organisme généralement unicellulaire dont la cellule, très petite, est dépourvue d'organites et de noyau. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Promoteur : « Séquence d'ADN servant de site de reconnaissance et de fixation à l'ARN polymérase pour entamer la transcription de l'ARNm à partir d'un gène ; il se trouve en amont du site de départ de la transcription » (Raven et al., 2012).

Protandre : Type d'hermaphrodisme successif, où l'individu est d'abord mâle puis devient femelle.

Protéine : « Macromolécule constituée par l'association d'acides aminés unis entre eux par une liaison peptidique. » (Dictionnaire Larousse, 2019)

Pseudogènes : « Segment d'ADN dérivant d'un gène ancestral fonctionnel, mais ayant perdu la capacité à exprimer un produit (ARN ou protéine) fonctionnel. » (Thomas et al., 2016).

Peptidoglycane : composant de la paroi bactérienne.

Priming immunitaire : La mémorisation, par les cellules de l'immunité innée, des événements infectieux passés, ce qui permettra la mise en place d'une meilleure réponse immunitaire lors d'une seconde rencontre avec un pathogène (Netea & Meer, 2017; Penkov et al., 2019).

Pyrimidique : Relatif à ce qui comprend de la pyrimidine, « le plus petit des deux types principaux de bases nucléotidiques de l'ADN et de l'ARN ; base azotée avec une structure en anneau unique, comme la cytosine, la thymine et l'uracile. » (Raven et al., 2012).

S

Sélection naturelle : « désigne la survie et la reproduction différentielles des organismes, suite à des différences dans les caractéristiques qui affectent leur capacité à utiliser les ressources environnementales. » (Thomas et al., 2016).

Sumoylation : liaison de protéines SUMO (protéines de type ubiquitine) sur une lysine.

Superoxyde dismutase : enzyme intervenant dans la catalyse des anions superoxyde en oxygène et en peroxyde d'oxygène. (Bertini et al., 1998)

Syndrome métabolique : trouble métabolique caractérisé par une intolérance au glucose ou une résistance à l'insuline, entraînant une augmentation de l'obésité et/ou de l'hypertension (Eckel et al., 2005).

T

Toxines : « Substance toxique élaborée par un micro-organisme et responsable de la capacité de celui-ci à provoquer une maladie. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Traduction : « Assemblage d'une protéine sur les ribosomes, utilisant l'ARNm pour déterminer l'ordre des acides aminés » (Raven et al., 2012).

Traits d'histoire de vie (life history trait) : « Trait caractérisant le cycle de vie d'une espèce. On considère généralement les traits d'histoire de vie comme des traits dont la variation va fortement modifier la valeur sélective d'un individu (e.g : l'âge et la taille à maturité, fécondité, qualité des jeunes produits, survie, longévité) » (Thomas et al., 2016).

Transcription : « Assemblage, catalysé par des enzymes, d'une molécule d'ARN complémentaire d'un brin d'ADN » (Thomas et al., 2016).

Transformisme : « Doctrine suivant laquelle les espèces animales et végétales se transforment et dérivent les unes des autres par voie de filiation. » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Thymine : Base pyrimidique C₅H₆N₂O₂, qui est un des constituants des acides désoxyribonucléiques (Dictionnaire Larousse, 2019).

U

Ubiquitination : fixation de protéines d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines.

V

Valeur sélective (*fitness*) : « Espérance de la contribution relative aux générations ultérieures d'une classe (allèle, génotype, classe phénotypique d'individus). Elle est estimée, suivant les situations, par une ou plusieurs composantes (survie, fertilité, nombre de descendants à la génération suivante, etc.) associées à la classe considérée. » (Thomas et al., 2016).

Voie JAK/STAT : voie de transduction du signal impliquée dans le développement, l'homéostasie et l'immunité (Rawlings et al., 2004).

Voie NF-κB : voie de transduction du signal qui intervient dans la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire (Yamamoto & Gaynor, 2005).

Voie Toll : voie de transduction du signal qui intervient dans la réponse immunitaire innée (Anderson, 2000).

X

Xenobiotiques : « se dit d'une molécule étrangère à un organisme vivant et considérée comme toxique » (Dictionnaire Larousse, 2019).

Résumé

L'histoire de vie d'un individu influence son phénotype mais aussi potentiellement celui de sa descendance. Les différentes composantes du système d'héritabilité incluant l'héritabilité génétique et l'héritabilité non génétique et leurs interactions mutuelles, sont importantes pour générer ces phénotypes héréditaires. Cela peut permettre aux parents de transmettre à leurs progénitures une meilleure capacité d'adaptation aux changements rapides de l'environnement local. L'huitre creuse *Crassostrea gigas* est un organisme marin d'intérêt économique majeur en tant que principale espèce d'huitre produite dans le monde. L'incapacité des huitres adultes et juvéniles à se mouvoir et leur condition d'organismes filtreurs les rendent très sensibles aux pressions environnementales auxquelles elles ne peuvent pas se soustraire. Ainsi la présence de polluants et d'organismes pathogènes dans l'environnement aquatique peut avoir des conséquences néfastes pour les huitres et leur descendance, allant jusqu'à induire des mortalités massives. Les objectifs de ma thèse ont été d'appréhender la part de différents mécanismes d'héritabilité (génétique, épigénétique et microbiote) dans la réponse environnementale des huitres à deux stress environnementaux et d'améliorer les connaissances des mécanismes de transmission de l'information épigénétique chez les mollusques. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi (i) réalisé une étude bibliographique afin d'identifier les facteurs épigénétiques principalement étudiés dans la réponse environnementale chez des espèces de mollusques, ainsi que leur aspect transgénérationnel ; (ii) étudié l'influence de deux types de stress environnementaux sur les huitres et/ou leur descendance via : (1) la participation à une expérience d'exposition parentale à un pesticide polluant, le diuron, sur le méthylome et l'expression des gènes des descendants de la génération suivante et (2) la caractérisation des impacts génétique, épigénétique, transcriptomique et microbiotique d'une exposition microbienne précoce sur la résistance des huitres au Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS) induisant des mortalités massives sur les juvéniles, ceci sur trois générations successives. Les principaux résultats de ma thèse ont permis de mettre en évidence l'influence de stress environnementaux sur le phénotype via des modifications du méthylome des huitres et de leur descendance. Dans le cadre de la réponse au POMS, l'exposition microbienne a permis d'améliorer la résistance des huitres et de former un phénotype adaptatif illustrant le rôle potentiel des mécanismes épigénétiques dans l'évolution adaptative.

Abstract

The life history of individuals influences their phenotype but potentially also the phenotype of their offspring. The different components of the inheritance system including genetic and non-genetic components and their mutual interactions are key mechanisms to generate these heritable phenotypes. It can allow parents to transmit a better adaptive capacity in response to rapid local environmental changes to their offspring. The pacific oyster *Crassostrea gigas* is a marine organism of economic interest as the main cultivating oysters worldwide. Adults and juveniles oysters are sessile and filtering organisms which made them very sensitive to environmental pressures that they cannot evade. Thus, the presence of pollutants and pathogens in the aquatic environment can have harmful consequences on oysters potentially leading to oysters' death. The main objectives of my thesis were to decipher the relative weights of different inheritance mechanisms (genetic, epigenetic and microbiota) in the environmental response of oysters to two environmental stresses and to improve our knowledge about epigenetic transmission information in molluscs. During my PhD, I (i) realized a bibliographic study to identify main epigenetic factors implied in environmental response and inheritance in molluscs ; (ii) studied the influence of two types of environmental stress on oysters and/or their offspring through: (1) the participation to an experiment of parental exposure to a pesticide, the diuron, on the methylome and the gene expression of offspring and (2) the characterization of the genetic, epigenetic, transcriptomic and microbiotic impacts of an precocious microbial exposure on the survival capacity of pacific oyster when faced to Pacific Oysters Mortality Syndrome, a disease, inducing massive mortalities in oysters' juveniles, thus on three generation. The main results of my PhD allow to highlight the influence of environmental stresses on phenotype by methylome modifications of oysters and their offspring. In the case of the response to POMS, the microbial exposure has allowed to improve the oysters' resistance and to form an adaptive phenotype illustrating the potential role of epigenetic mechanisms in adaptive evolution.