



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* en réponse à une infection par le virus OsHV-1

Sandy Picot

► **To cite this version:**

Sandy Picot. Caractérisation de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* en réponse à une infection par le virus OsHV-1. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2019. Français. NNT: 2019LAROS006 . tel-03593397

**HAL Id: tel-03593397**

**<https://theses.hal.science/tel-03593397>**

Submitted on 2 Mar 2022

**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.



UNIVERSITE DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE  
*Euclide*

Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins (Ifremer)

THÈSE  
présentée par :  
Sandy PICOT

soutenue le Vendredi 1<sup>er</sup> Mars 2019  
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Caractérisation de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse  
*Crassostrea gigas* en réponse à une infection par le virus OsHV-1**

---

JURY :

Paco BUSTAMANTE	Professeur, Université de La Rochelle, Président du jury
Mathias FAURE	Professeur, Université de Lyon 1, Rapporteur
Christine PAILLARD	Directrice de recherche CNRS, Université de Bretagne Occidentale, Rapporteur
Audrey ESCLATINE	Professeur, Université Paris Sud, Examineur
Didier BOUCHON	Professeur, Université de Poitiers, Examineur
Tristan RENAULT	Directeur de département, IFREMER Nantes, Directeur de thèse
Benjamin MORGA	Cadre de recherche, IFREMER La Tremblade, Directeur scientifique



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Paco Bustamante pour avoir accepté de présider ce jury de thèse ainsi que le Professeur Mathias Faure et le Docteur Christine Paillard pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également le Professeur Audrey Esclatine et le Professeur Didier Bouchon pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail.*

*Merci à la région Poitou-Charentes ainsi qu'à l'Ifremer pour le financement de cette thèse.*

*Je remercie également Jean Prou et Bénédicte Charrier responsables de la station Ifremer pour m'avoir accueilli sur le site de La Tremblade.*

*Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude à mes directeurs de thèse, le Docteur Isabelle Arzul et le Docteur Tristan Renault. Isabelle, merci pour ton implication dans cette thèse. Nos échanges m'ont toujours poussé à aller de l'avant. Merci également pour toutes tes corrections, tes conseils, et pour avoir toujours pris du temps en plus des nombreuses activités dont tu as la charge. Tristan, merci également pour tes corrections, et nos conversations scientifiques toujours très intéressantes. Tu m'as aidé à développer et affuter mon esprit scientifique.*

*Je remercie chaleureusement le Docteur Benjamin Morga, mon encadrant scientifique. Merci d'avoir cru en moi, de m'avoir accueilli dans ton équipe et accompagné pendant mon stage de Master puis tout au long de ces trois années de thèse. Il est difficile de résumer tout ce que ces quatre années à tes côtés m'ont apportées. Tes corrections, nos discussions scientifiques, tes conseils et ta bienveillance tout au long de cette thèse m'ont guidé et permis de prendre confiance en moi. Avec ton soutien, j'ai pu voyager dans différents pays pour participer à des congrès internationaux mais également pour la mobilité internationale des doctorants. Ces expériences professionnelles mais aussi culturelles resteront inoubliables. Ce fût un réel plaisir de réaliser cette thèse à tes côtés et à ceux de Nicole. Ne plus travailler avec vous me manquera.*

*Un énorme merci à Nicole. Ce n'est pas sans émotion que j'écris ces quelques lignes pour toi. Avec qui aurais je pu mieux « servir la science car c'est notre joie ! » ? Merci pour ton aide et ton expertise en biologie moléculaire, ta patience et ton soutien indéfectible. Merci d'avoir d'avoir toujours pris de ton temps pour m'aider sur le plan matériel et répondu à mes questions. Je n'oublierai pas tous nos rires mais aussi toutes nos discussions scientifiques, philosophiques et plus personnelles.*

*Un grand merci également à l'ensemble des doctorants et post-doctorants que j'ai pu rencontrer au cours de ces quatre années passées au sein de l'Ifremer. La thèse n'aurait pas été la même sans votre présence. Petit Ophélie, merci pour tous les moments que nous avons partagé ensemble, nos discussions, les cafés/thés et tes gâteaux. Miss Leila, merci pour ta joie de vivre, les restaurants, le sport, les moments passés ensemble à La Rochelle. Coralie merci pour ta gentillesse et pour avoir toujours trouvé des petits moments pour discuter et rire avec moi (même avec le décalage horaire !) malgré tes nombreux déplacements. Merci à toutes les trois pour vos oreilles attentives quand cela était nécessaire ! Clément et Nicolas ce fut un plaisir de partager des discussions sur la bioinformatique avec vous. Alice, Claire et Sergio merci pour votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard.*

*Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe de pathologie et de la cellule analytique : Agnès, Cyrielle, Delphine T., Bruno, Céline, Delphine S., Mathilde, Lydie, Coralie, Estelle et Christine. Merci pour vos conseils, votre aide technique, les pauses café et votre bonne humeur permanente. J'ai été ravie de passer ces trois années à vos cotés.*

*Agnès, je te remercie pour tes conseils et les échanges scientifiques toujours très intéressants que nous avons eu. Merci pour l'intérêt que tu as porté à mes travaux de thèse.*

*Merci à Camille, ma stagiaire, pour ton aide, ton enthousiasme et ta motivation pendant ton stage qui ont permis de faire avancer mon travail de thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes études.*

*Merci également à toutes les personnes de l'équipe de génétique : Sylvie, Serge, Florence, Jean-Baptiste, Christophe, Abdellah, Lionel, Elise.*

*Pour avoir pris soin continuellement de mes huîtres, je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe éclosion : Frédéric, Jean-Pierre, Jean-Pascal et Pascal P.*

*Sans oublier mes collègues du LERPC, que je remercie sincèrement.*

*I sincerely thank the Dr Colleen Burge for her welcome at the IMET. Thank you also for the time you gave to me during this trip at work but also for all the activities we did outside and for all the things you make me visited. Thanks to Amanda, Nathalie and Morgan for their help during my experiment. I was also delighted to meet other students and other people of the IMET. Particularly Elena, Daniella, Ana, Taylor, Sam and, Lauren for their benevolence welcome and to have made me discovered the American culture (It was the most incredible Halloween I have ever done!).*

*Martine, Florence et Véronique, merci pour votre aide sur les taches administratives.*

*Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'être initiée à l'utilisation de Galaxy et au traitement des données RNAseq sous R par Laure Quintric et Fanny Marquer. Merci à vous deux pour cette parenthèse Brestoïse et pour le temps que vous m'avez consacré.*

*Je remercie également ma famille. Merci à mes parents pour votre soutien tout au long de ces nombreuses années d'études. Benjamin, merci d'avoir été présent pendant cette dernière année de thèse. Un grand merci à ma belle famille pour votre présence et vos paroles d'encouragements.*

*Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement mon mari, Geoffrey. Merci pour ton soutien indéfectible depuis tant d'années. Tu m'as toujours accompagné et poussé à réaliser les petits et grands projets qui me tenaient à cœur. Pendant ces trois années de thèse, tu m'as apporté du soutien et de la stabilité. Merci pour ta patience durant les mois de rédaction de ce manuscrit, pour tes relectures et tes conseils.*



*« Sans la curiosité de l'esprit, que serions nous ?  
Telle est bien la beauté et la noblesse de la science :  
désir sans fin de repousser les frontières du savoir,  
de traquer les secrets de la matière et de la vie sans  
idée préconçue des conséquences éventuelles. »*




*Marie Curie*






## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS



### Publications présentées dans le manuscrit





-  **Picot S.**, Morga B., Faury N., Chollet B., Dégremont L., Travers M-A., Renault T., Arzul I. A study of autophagy in haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. (Autophagy, accepté en Octobre 2018)
-  **Picot S.**, Faury N., Arzul I., Chollet B., Renault T., Morga B. First identification and functional characterization of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, *Crassostrea gigas*. (Pour soumission dans Fish and Shellfish Immunology)
-  **Picot S.**, Faury N., Arzul I., Pelletier C., Chollet B., Dégremont L., Renault T., Morga B. Monitoring autophagy in *Crassostrea gigas* during an experimental Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection. (En préparation)

### Publication non présentée dans le manuscrit

-  Morga B., **Picot S.**, Faury N., Dégremont L., Renault T., Lupo C., Travers M-A. Does first barrier passage shunt matter in disease reproduction? Update from OsHV-1 infection in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. (En préparation)

### Communications orales et affichées

-  **Picot S.**, Morga B., Faury N., Dégremont L., Arzul I., Renault T. (2016). Monitoring of the autophagy pathway in *C. gigas* haemocytes during an experimental OsHV-1 infection at a cellular and molecular levels. SIP - 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrates Pathology. 24-28 Juillet 2016, Tours, France. (communication orale)
-  **Picot S.**, Morga B., Faury N., Pelletier C., Dégremont L., Arzul I., Renault T. (2017). Monitoring of the autophagy pathway in *C. gigas* haemocytes during an experimental OsHV-1 infection . EAFFP - 18<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 4-8 September 2017, Belfast, UK. (communication orale)

-  Morga B., **Picot S.**, Faury N., Dégremont L., Renault T., Lupo C., Travers M-A. (2017). Does first barrier passage shunt matter in disease reproduction? Update from OsHV-1 infection in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* . EAFP - 18<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 4-8 September 2017, Belfast, UK. (communication orale)
-  **Picot S.**, Morga B., Faury N., Pelletier C., Degremont L., Arzul I., Renault T. (2017). Monitoring of the autophagy pathway in *C. gigas* haemocytes during an experimental OsHV-1 infection. PCSGA - 71<sup>st</sup> Annual Shellfish Growers Conference and Tradeshow. 19-21 September 2017, Welch, USA. (communication orale)
-  **Picot S.**, Arzul I., Faury N., Pelletier C., Dégremont L., Renault T., Morga B. (2017). Caractérisation de la voie de l'autophagie chez *C. gigas* en réponse à une infection par OsHV-1. WP2. Tâche 2.1.3 Analyse des voies moléculaires. Journées internes du projet européen Vivaldi. 6-7 Décembre 2017, Bouin, France. (communication orale)
-  **Picot S.**, Arzul I., Faury N., Chollet B., Dégremont L., Travers M-A., Renault T., Morga B. (2018). Multi-structural approach to decipher macroautophagy in haemocytes of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. NSA - 110<sup>th</sup> Annual Meeting of the National Shellfisheries Association. 18-22 Mars 2018, Seattle, USA. (communication affichée) (Annexe A)

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A</b>		<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>DD</b>	Death domain
<b>AMP</b>	Antimicrobial peptides	<b>DENV</b>	Virus de la Dengue
<b>AMBRA1</b>	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	<b>DFCP1</b>	Double FYVE domain-containing protein1
<b>ARNdb</b>	ARN double brin	<b>dpe</b>	Day post exposure
<b>ARNi</b>	ARN interférence	<b>E</b>	
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger	<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>ATG</b>	Autophagy related genes	<b>EF</b>	Elongation factor
<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate	<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>AVi</b>	Early autophagic vacuole	<b>F</b>	
<b>AVd</b>	Late autophagic vacuole	<b>FADD</b>	Fas-associated protein with death domain
<b>ASW</b>	Artificial sea water	<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>B</b>		<b>FIP</b>	Focal adhesion kinase family interacting protein
<b>Bcl 2</b>	B-cell CLL/lymphoma 2	<b>FREPs</b>	Fibrinogen-related proteins
<b>BECN1</b>	Beclin 1	<b>FSC</b>	Forward scatter
<b>β</b>	β-1,3-Glucan	<b>G</b>	
<b>βGBP</b>	β-1,3-Glucan-Binding Protein	<b>G</b>	Guanine
<b>Bif-1</b>	Bax-interacting factor 1	<b>GABARAP</b>	GABAA receptor-associated protein
<b>BSA</b>	Bovin serum albumin	<b>GPCR</b>	G-protein-coupled receptor
<b>C</b>		<b>H</b>	
<b>C</b>	Cytosine	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>Cas9</b>	CRISPR-Associated Protein 9	<b>Hpi</b>	Heure post infection
<b>cDNA</b>	Complementary DNA	<b>HSP</b>	Heat shock proteins
<b>CGL-1</b>	<i>Crassostrea gigas</i> lysosome-1	<b>HSV</b>	Herpes Simplex Virus
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	<b>I</b>	
<b>Cvt</b>	Cytoplasm to vacuole targeting	<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>D</b>			

<b>ICP 34.5</b>	Infected cell protein 34.5	<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>IFI44</b>	Interferon-induced protein 44	<b>mTOR</b>	mammalian target of rapamycin
<b>IFN</b>	Interférons	<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation factor 88
<b>IFREMER</b>	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer		
		<b>N</b>	
<b>Ig</b>	Immunoglobulin	<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>IHC</b>	Immunohistochemistry	<b>NBR1</b>	Neighbor of Breast cancer type 1 gene 1
<b>IL-17R</b>	Interleukine-17 receptor	<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology information
<b>IMET</b>	Institute of Marine and Environmental Technology	<b>Nef</b>	Negative regulatory factor
<b>IP</b>	Iodure de propidium	<b>NFκB</b>	Nuclear factor kappa B
<b>IPT</b>	Immunoglobulin-like fold, plexins, transcription factors	<b>NGS</b>	Next-generation sequencing
<b>IRF</b>	Interferon regulating factor	<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Chlorure d'ammonium
<b>ISG</b>	Interferon stimulated gene	<b>NO•</b>	Oxyde nitrique
<b>IP3</b>	Myo-inositol-1.4.5-triphosphate	<b>NS4</b>	Nonstructural protein 4
		<b>O</b>	
	<b>J</b>		
<b>JAK</b>	Janus kinase	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
	<b>K</b>	<b>ORF</b>	Open reading frame
<b>KSHV</b>	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	<b>OsHV-1</b>	Ostreid herpesvirus 1
	<b>L</b>	<b>P</b>	
<b>LGBP</b>	Lipopolysaccharides and β-1,3-Glucan-Pinding Protein	<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides	<b>Pb</b>	Paire de bases
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat	<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
	<b>M</b>	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>M2</b>	Matrix-2	<b>PCD</b>	Programmed cell death
<b>MAP1LC3</b>	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3	<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamine
<b>MAT</b>	Mepripin and TRAF-C homology domain	<b>PIK3R4</b>	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4
<b>MCA</b>	Multiple correspondence analysis	<b>PI3KC3</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3
<b>MDA5</b>	Melanoma differentiation-associated gene 5	<b>PI3P</b>	Phosphatidyl-inositol 3 phosphatase
		<b>PIV3</b>	Parainfluenza virus type 3
		<b>PKc</b>	Protein kinase

<b>PKR</b>	Protein kinase R		
<b>PRGPs</b>	Peptidoglycan recognition proteins,	<b>TBS</b>	Tris-buffered saline
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptor	<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis related apoptosis inducing ligand
<b>PtdIns 3K</b>	Class III phosphatidylinositol 3-kinase	<b>TIR</b>	Toll interleukin-1 receptor
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene difluoride	<b>TLR</b>	Toll-like receptor
	<b>R</b>	<b>TM</b>	Transmembrane
<b>RACE PCR</b>	Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction	<b>TMV</b>	Tobacco mosaic virus
<b>REPAMO</b>	Réseau de surveillance des pathologies des mollusques	<b>TNF</b>	Tissue necrosis factor
<b>RHD</b>	rel homology domain	<b>TNFR</b>	Tumor necrosis factors receptor
<b>RIG</b>	Retinoic acid-inducible gene	<b>TRAF</b>	Tissue necrosis factor receptor associated factor
<b>RING</b>	Really interesting new gene	<b>TRIS</b>	Trishydroxyméthylaminométhane
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex		<b>U</b>
<b>RLRs</b>	Retinoic acid-inducible gene-1 like receptors	<b>UBL-TBK1-like</b>	Ubiquitin-like domain of human Tbk1
<b>RNS</b>	Espèces réactives azotées	<b>ULK</b>	Unc-51-like kinase
<b>ROS</b>	Espèces réactives de l'oxygène	<b>UNIPROT</b>	Universal protein resource
<b>RUBICON</b>	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	<b>USD</b>	US dollars
	<b>S</b>	<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate	<b>UVRAG</b>	UV radiation resistance associated gene
<b>siRNA</b>	Petits ARN interférents		<b>V</b>
<b>SIN</b>	Sindbis virus	<b>VIH</b>	virus de l'immunodéficience humaine
<b>SNAP</b>	Synaptosomal-associated protein	<b>VPS</b>	Vacuolar protein sorting
<b>SNARE</b>	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors	<b>VSV</b>	Vesicular Stomatitis Virus
<b>SQSTM1</b>	Sequestosome 1	<b>VZV</b>	Varicella Zoster Virus
<b>SR</b>	Scavenger receptor		<b>W</b>
<b>SSC</b>	Side-scatter	<b>WIPI</b>	WD repeat domain phosphoinositide interacting protein 1
<b>STAT</b>	Signal transducers and activators of transcription	<b>WoRMS</b>	World register of marine species
<b>Stx</b>	Syntaxin		<b>Z</b>
		<b>zf-TRAF</b>	Tissue necrosis factor receptor associated factor type zinc f



# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I ETAT DE L'ART .....</b>	<b>9</b>
<b>1. L'HUITRE CREUSE, <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> .....</b>	<b>11</b>
1.1. PRODUCTION OSTREICOLE .....	11
1.2. BIOLOGIE ET CYCLE DE VIE DE <i>C. GIGAS</i> .....	12
1.3. GENOME DE L'HUITRE CREUSE .....	15
1.4. EPISODES DE MORTALITES MASSIVES CHEZ <i>C. GIGAS</i> .....	16
<b>2. LE VIRUS OSTREID HERPESVIRUS 1 (OsHV-1) .....</b>	<b>17</b>
2.1. ORIGINE ET STRUCTURE DU VIRUS OSHV-1 .....	17
2.2. DIVERSITE ET EVOLUTION DU VIRUS OSHV-1 .....	19
2.3. ARCHITECTURE GENOMIQUE DU VIRUS OSHV-1 .....	21
2.4. CYCLE DE REPLICATION DU VIRUS OSHV-1 .....	22
2.5. REPLICATION ET LOCALISATION DU VIRUS OSHV-1 CHEZ SON HOTE .....	24
2.6. INFECTION VIRALE ET FACTEURS DE RISQUES.....	25
2.7. TRANSMISSION DU VIRUS OSHV-1 .....	27
<b>3. LE SYSTEME IMMUNITAIRE CHEZ LES BIVALVES.....</b>	<b>28</b>
3.1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE <i>C. GIGAS</i> .....	28
3.1.1. <i>Les hémocytes, cellules clés du système immunitaire</i> .....	28
3.1.2. <i>Les facteurs de reconnaissances immunitaires</i> .....	29
3.1.3. <i>La défense cellulaire</i> .....	32
3.1.4. <i>La defense humorale</i> .....	35
3.1.5. <i>Le priming immunitaire</i> .....	37
3.2. L'IMMUNITE ANTIVIRALE CHEZ <i>C. GIGAS</i> : LE CAS D'OSHV-1 .....	39
3.2.1. <i>La voie interferon-like</i> .....	40
3.2.2. <i>La voie de l'ARN interference</i> .....	41



3.2.3.	<i>L'apoptose</i> .....	41
<b>4.</b>	<b>L'AUTOPHAGIE</b> .....	<b>43</b>
4.1.	GENERALITES .....	43
4.1.1.	<i>Historique</i> .....	43
4.1.2.	<i>Les fonctions de la voie de l'autophagie</i> .....	45
4.1.3.	<i>Les différents types d'autophagie</i> .....	45
4.1.4.	<i>L'autophagie selective</i> .....	46
4.1.5.	<i>L'autophagie au niveau cellulaire</i> .....	47
4.1.6.	<i>Mécanismes moléculaires de l'autophagie</i> .....	47
4.1.7.	<i>L'autophagie un mécanisme impliqué dans la survie et la mort cellulaire</i> .....	51
4.2.	AUTOPHAGIE ET INFECTIONS VIRALES .....	52
4.2.1.	<i>Le role antiviral de l'autophagie</i> .....	52
4.2.2.	<i>Des virus échappent à l'autophagie</i> .....	53
4.2.3.	<i>Des virus manipulent l'autophagie pour leur propre benefice</i> .....	54
4.3.	AUTOPHAGIE ET IMMUNITE CHEZ LES MOLLUSQUES .....	57
	<b>CHAPITRE II CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE CHEZ L'HUITRE CREUSE</b> .....	<b>59</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>61</b>
<b>2.</b>	<b>CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE CHEZ C. GIGAS AU NIVEAU CELLULAIRE</b> .....	<b>62</b>
	ARTICLE 1 .....	63
<b>3.</b>	<b>CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE CHEZ C. GIGAS AU NIVEAU MOLECULAIRE ET PROTEIQUE</b> .....	<b>86</b>
	ARTICLE 2 .....	87
<b>4.</b>	<b>RESULTATS COMPLEMENTAIRES: CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE CHEZ L'HUITRE CREUSE AMERICAINE, CRASSOSTREA VIRGINICA</b> .....	<b>118</b>
4.1.	INTRODUCTION.....	118
4.2.	MATERIEL ET METHODES .....	119
4.2.1.	<i>Identification des protéines de la voie de l'autophagie chez C. virginica</i> .....	119
4.2.2.	<i>Analyse phylogénétique</i> .....	119
4.2.3.	<i>Matériel biologique</i> .....	120

---

4.2.4.	<i>Plan experimental</i> .....	120
4.2.5.	<i>Approches en cytométrie en flux</i> .....	120
4.2.6.	<i>Western blot</i> .....	121
4.3.	<b>RESULTATS</b> .....	122
4.3.1.	<i>Identification des proteines de la voie de l'autophagie chez C. virginica</i> .....	122
4.3.2.	<i>Modulation de l'autophagie dans les hémocytes de C. virginica</i> .....	127
4.3.1.	<i>Modulation de l'autophagie dans le manteau de C. virginica</i> .....	127
4.1.	<b>DISCUSSION</b> .....	130
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>133</b>
<b>CHAPITRE III IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE AU COURS D'UNE INFECTION VIRALE</b>		<b>137</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>139</b>
	ARTICLE 3 .....	141
<b>2.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>177</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....		<b>179</b>
<b>REFERENCES BILIOGRAPHIQUES</b> .....		<b>187</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>211</b>



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Liste des figures

Figure 1. Tonnage de la production française de l’huître creuse, <i>C. gigas</i> de 1971 à 2016 associé aux principaux évènements de mortalités .....	4
Figure 2. Evolution de la production conchylicole nationale entre 2001 et 2012 et répartition de la production d’huîtres creuses par région conchylicole en 2012 .....	12
Figure 3. Anatomie de l’huître creuse, <i>C. gigas</i> .....	14
Figure 4. Cycle de reproduction de l’huître creuse, <i>C. gigas</i> .....	15
Figure 5. A. Structure d’une particule de type herpèsvirus et reconstitution de la capsidie du virus OsHV-1 par microscopie électronique .....	18
Figure 6. Classification du virus OsHV-1 au sein de l’ordre des herpesvirales.....	19
Figure 7. Cycle de réplication supposé du virus OsHV-1 .....	23
Figure 8. Différents types d’hémocytes observés en microscopie électronique à transmission .....	29
Figure 9. Schéma de la réponse humorale et cellulaire retrouvée chez les mollusques bivalves au cours d’une infection par des micro-organismes .....	33
Figure 10. Voies antivirales conservées chez l’huître creuse .....	38
Figure 11. Modifications ultrastructurales associées à l’apoptose observées chez <i>C. gigas</i> au stade naissain affecté par le virus OsHV-1 .....	42
Figure 12. Vacuoles autophagiques observées en microscopie électronique à transmission... ..	44
Figure 13. Différents types d’autophagie .....	44
Figure 14. Mécanisme cellulaire de la voie de l’autophagie chez les mammifères .....	47
Figure 15. Fonctionnement moléculaire de la voie de l’autophagie chez les mammifères .....	48
Figure 16. Schéma récapitulant les différents mécanismes mis en place par les virus afin d’échapper ou de manipuler l’autophagie pour leur propre bénéfice.....	55

---

Figure 17. Analyse phylogénétique des protéines clés de la voie de l'autophagie chez l'huître américaine, <i>C. virginica</i> .....	126
Figure 18. Détection et suivi de l'activité autophagique dans les hémocytes par cytométrie en flux .....	128
Figure 19. Détection et quantification des protéines SQSTM1 et MAP1LC3 dans le manteau de l'huître creuse américaine, <i>C. virginica</i> .....	129

## Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des génomes du virus OsHV-1 de référence et $\mu$ Var .....	21
Tableau 2. Liste des protéines et domaines de la voie de l'autophagie identifiés chez l'huître creuse américaine ( <i>C. virginica</i> ) et comparée avec les protéines et domaines identifiés chez l'huître creuse japonaise ( <i>C. gigas</i> ).....	123

# INTRODUCTION GENERALE

---



L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est l'espèce ostréicole majoritairement cultivée dans le monde (FAO 2018a). Originaires du Japon, cette espèce est appréciée pour ses capacités de croissance rapide et sa grande tolérance aux conditions environnementales (FAO 2018a; FAO 2018b). En France, la production ostréicole est dominée par la production d'huîtres creuses (98,9%) (FAO 2018a). Pourtant, *C. gigas* n'a pas toujours été la principale espèce d'huître cultivée dans ce pays et la part importante qu'occupe sa production est liée à la fragilité des stocks ostréicoles nationaux et à l'apparition de maladies au cours de l'histoire de cette filière de production.

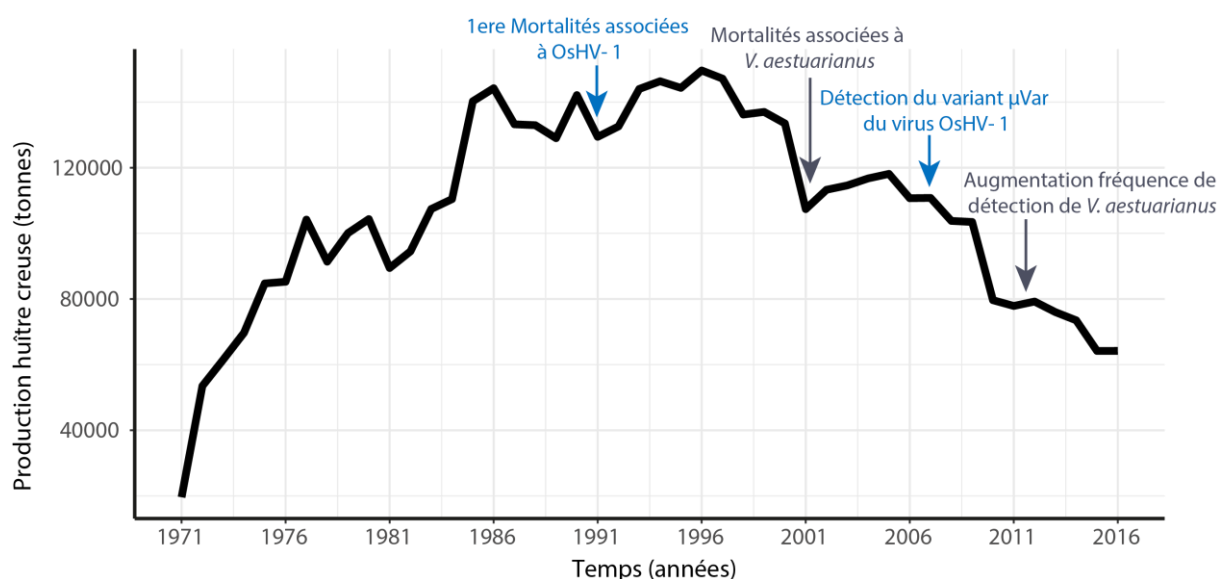
Dans les années 1700, les ressources marines étaient supposées inépuisables et les populations sans grandes ressources alimentaires consommaient directement l'huître endémique des côtes Européennes, *Ostrea edulis* (aussi appelée huître plate) à partir des bancs sauvages existant sur le littoral français. La surexploitation de ces gisements naturels entraîna leur tarissement dans les années 1750 et provoqua le début des recherches concernant la régénérescence des bancs naturels d'huîtres et la réalisation d'une production contrôlée de cette espèce (Vidal 2011). Le commencement de ces recherches marqua la naissance de l'ostréiculture en France.

L'histoire de l'ostréiculture est également liée à l'apparition de maladies. En effet, *O. edulis* était l'espèce majoritairement produite jusque dans les années 1920, période à laquelle elle a été touchée par des premiers épisodes de mortalité massive qui provoquèrent son déclin (Dollfus 1921). L'apparition successive de deux maladies parasitaires, la marteiliose et la bonamiose, dans les années 70, ont fait qu'aujourd'hui la production de cette espèce reste très réduite en France (de l'ordre de 1500 à 2000 tonnes par an). L'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, a été importée en France dès 1860 à la suite d'une pénurie de naissain d'*O. edulis* (Gouletquer et Heral 1997). *C. angulata* a disparu des côtes françaises. A la fin de l'année 1969 et au début des années 70, deux épisodes de mortalités associés à la détection de virus de type iridovirus (Comps 1988) ont été incriminés dans la disparition de *C. angulata*. Afin d'assurer la pérennité de l'activité ostréicole française, l'huître creuse, *C. gigas*, fut introduite à la fin des années 1960 et au début des années 1970 à partir du Japon et du Canada (Grizel et Heral 1991).

Aujourd'hui *C. gigas*, est également affectée par des maladies principalement virales et bactériennes (Figure 1). Les mortalités observées en France ont grandement affectées la production de l'huître creuse entraînant de lourdes pertes économiques (Garcia *et al.* 2011). L'un des agents majeurs responsables d'épisodes de mortalité massive rapportés chez cette espèce est un virus appartenant à l'ordre des herpesvirales appelé Ostreid herpesvirus 1



(OsHV-1) (Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b; Le Deuff et Renault 1999; Davison *et al.* 2005). En France, OsHV-1 a causé des épisodes de mortalité massive (80 à 90%) chez *C. gigas* au stade larvaire au sein d'écloseries à partir de 1991, puis au stade naissain sur l'estran aussi bien pour des animaux issus de captage naturel que pour des huîtres produites en écloseries à partir de 1993 (Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b). En 2008, des épisodes de mortalité massive (entre 40 à 100% suivant le bassin ostréicole touché) ont affecté l'huître creuse au stade naissain et juvénile au niveau de l'ensemble des bassins ostréicoles français (Segarra *et al.* 2010). Ces épisodes de mortalité ont été associés à la détection d'un génotype d'OsHV-1 particulier, appelé  $\mu$ Var (Segarra *et al.* 2010).



**Figure 1.** Tonnage de la production française de l'huître creuse, *C. gigas* de 1971 à 2016 associé aux principaux événements de mortalités (d'après FAO, 2018a).

Les moyens de lutte disponibles pour diminuer l'impact des maladies infectieuses restent limités chez les mollusques bivalves marins. Les huîtres ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif comme les vertébrés, et la vaccination au sens conventionnel du terme ne peut donc pas être envisagée pour lutter contre les maladies. De plus, l'environnement marin ouvert dans lequel vivent ces animaux les expose directement aux organismes pathogènes et aucun moyen de lutte par traitement ne peut être mis en œuvre du fait des risques de recontamination possible, des doses nécessaires pour obtenir un effet dans un milieu ouvert et enfin des risques environnementaux.

L'une des approches utilisée pour lutter contre les maladies consiste à développer des programmes d'amélioration génétique. Les études menées ont démontré la possibilité

d'améliorer le taux de survie des huîtres creuses aux stades adultes, larvaires, juvéniles et naissain lors d'une infection par le virus OsHV-1 (Dégremont *et al.* 2015; Dégremont *et al.* 2016; Dégremont 2011). La seconde approche consiste à acquérir des connaissances sur les interactions hôte/organisme pathogène. Ces dernières années, des travaux réalisés ont permis d'améliorer les connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la résistance/tolérance de l'huître creuse à une infection virale, par la mise en évidence d'effecteurs cellulaires et moléculaires (Chen *et al.* 2018; He *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2014; Green *et al.* 2015a; Renault *et al.* 2011; Segarra *et al.* 2014c; Martenot *et al.* 2017; Green *et al.* 2015b). De plus, le séquençage de son génome en 2012 (Zhang *et al.* 2012) a ouvert de nouvelles possibilités pour étudier les mécanismes immunitaires présents chez l'huître creuse et leurs implications en réponse à cet herpèsvirus. L'ensemble de ces découvertes ont permis de réaliser des approches RNAseq ou de PCR en temps réel permettant d'identifier et d'étudier la régulation de certains gènes impliqués dans le système immunitaire de l'huître creuse. Ces différentes études et le séquençage du génome ont permis de démontrer que plusieurs voies antivirales connues chez les mammifères existaient potentiellement chez l'huître creuse (Zhang *et al.* 2011; Green et Montagnani 2013; Segarra *et al.* 2014c; Segarra *et al.* 2014a; Green *et al.* 2015a; He *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2015; Martenot *et al.* 2017).



Chez les mollusques marins, l'autophagie est un mécanisme immunitaire étudié (Moore *et al.* 2007; Bai *et al.* 2012; Moreau *et al.* 2015; Balbi *et al.* 2018). Les résultats de ces différentes études suggèrent que la voie de l'autophagie existe et pourrait être fonctionnelle chez les mollusques marins.

L'une des formes majeure de l'autophagie appelée la macro-autophagie (que nous appellerons par la suite autophagie) est un processus très conservé de la levure jusqu'à l'homme (Levine et Deretic 2007). Ce processus repose sur la dégradation de portions de cytoplasme à l'intérieur de lysosomes par l'intermédiaire de vésicules à double membrane (Joubert et Albert, 2013). Cette voie est connue pour jouer un rôle dans la dégradation de matériel intracellulaire dans le but de maintenir un renouvellement des composants de la cellule (Klionsky et Emr 2000). Elle est également impliquée dans un grand nombre d'autres fonctions cellulaires, comme le jeûne, la mort cellulaire, le développement embryonnaire et les défenses immunitaires (Mizushima 2005; Mizushima 2007; Levine et Kroemer 2008; Mizushima et Levine 2010). En effet, l'autophagie permet de limiter la réplication et/ou

l'infection de différents organismes pathogènes viraux, bactériens et parasitaires (Deretic 2006; Schmid et Münz 2007).

Chez *C. gigas*, plusieurs gènes de la voie de l'autophagie ont été identifiés et ce processus apparaît impliqué au cours d'une infection par le virus OsHV-1. En effet, ce mécanisme est activé dans le manteau de l'huître creuse 20 heures post-infection par le virus (Moreau *et al.* 2015). Cependant dans cette étude, l'ensemble des gènes constituant la voie de l'autophagie n'a pas été recherché et ce processus a été étudié au sein d'un seul tissu à un moment au cours de l'infection par le virus OsHV-1. De plus, cette voie n'a pas été analysée dans sa globalité au travers de l'utilisation de plusieurs approches complémentaires au niveau cellulaire et moléculaire.

Il est apparu d'intérêt d'approfondir les connaissances sur le mécanisme de la voie de l'autophagie chez *C. gigas* et sur sa régulation au cours d'une infection par le virus OsHV-1 en utilisant une approche intégrative afin de répondre à deux objectifs :

-  caractériser précisément au niveau cellulaire et moléculaire la voie de l'autophagie chez l'huître creuse ;
-  déterminer le rôle de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse en réponse à l'infection par le virus OsHV-1.

Ces nouveaux éléments permettront de mieux appréhender les interactions entre le virus et l'huître creuse et de déterminer dans quelle mesure cette voie est impliquée dans la réponse à l'infection par le virus OsHV-1.

Ce travail de thèse est organisé en trois chapitres.

Le premier chapitre présente un état de l'art traitant du modèle d'étude, l'huître creuse et de l'organisme pathogène étudié, le virus OsHV-1. Dans un second temps, le système immunitaire de l'huître creuse est décrit. La voie de l'autophagie est présentée de manière générale et ses interactions avec les virus sont développées. Enfin, cette synthèse bibliographique se termine par un état des connaissances concernant l'autophagie chez les mollusques bivalves.

Les résultats présentés dans le second chapitre visent à mieux comprendre le fonctionnement de l'autophagie chez l'huître creuse par l'utilisation d'approches aux niveaux cellulaire, moléculaire et protéique. Dans une première partie, nous avons suivi la modulation de la voie de l'autophagie au sein de cellules clés du système immunitaire de l'huître creuse (les hémocytes) par le biais de méthodes cellulaires. Dans un second temps, une caractérisation

des gènes constituant la voie de l'autophagie a été réalisé et les tissus de l'huître creuse au sein desquels l'autophagie est présente de manière constitutive ont été identifiés par le biais d'approches moléculaires.

Le troisième chapitre étudie la part jouée par l'autophagie dans la réponse immunitaire de l'huître creuse au cours d'une infection par le virus OsHV-1. Pour cela, des huîtres creuses ont été infectées expérimentalement afin de suivre la régulation de la voie au cours d'une infection par le virus OsHV-1 en condition *in vivo* en présence d'un modulateur de la voie de l'autophagie et par une approche ARN interférence. Le flux autophagique a été étudié au niveau cellulaire et moléculaire dans différents tissus impliqués dans la réponse à l'infection virale (l'hémolymphe et le manteau) au cours d'une cinétique de temps. En parallèle la réplication du virus a été suivie par des approches moléculaires.

Ce manuscrit se termine par une conclusion permettant d'appréhender les travaux entrepris dans leur globalité et de présenter les perspectives proposées à l'issue de ce travail de thèse.



# CHAPITRE I

---

## ETAT DE L'ART



## 1. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*

### 1.1. Production ostréicole

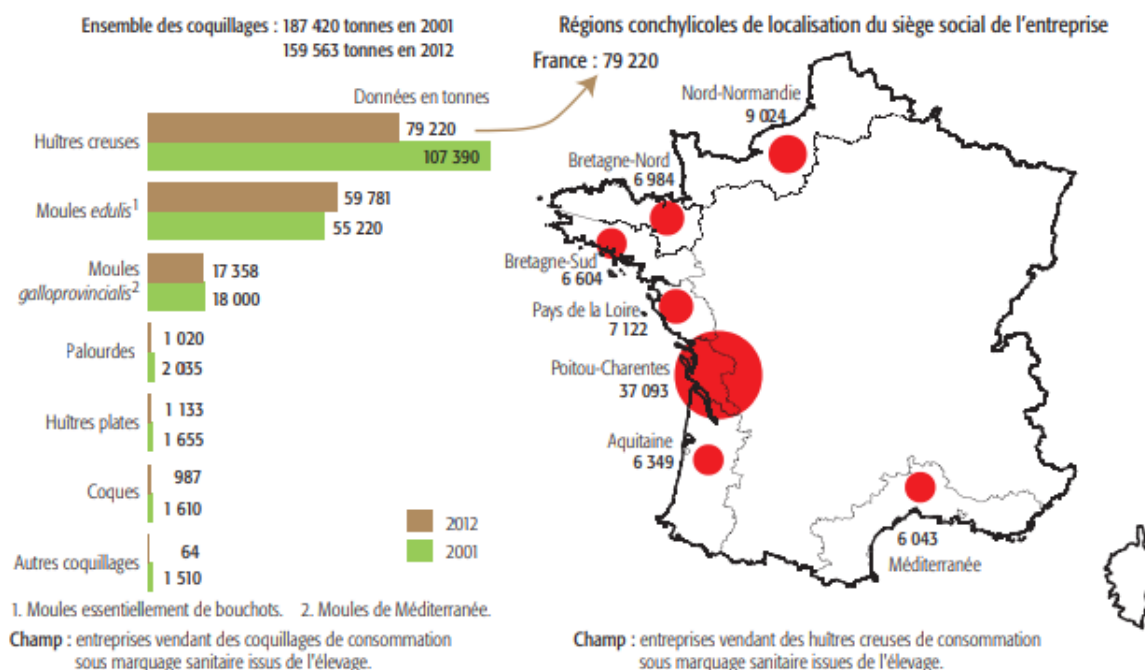
L'ostreiculture mondiale représentait en 2016 une production de 5,5 millions de tonnes pour un chiffre d'affaire d'environ 6,6 milliards d'USD (US Dollars) (FAO 2018a). Si cette activité est dominée par le continent asiatique, elle est présente sur tous les continents. En 2016, le pays producteur d'huîtres (toutes espèces confondues) le plus important était la Chine. Les trois autres principaux pays producteurs de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, étaient la Corée du Sud (268 973 t), le Japon (158 925 t) et la France (64 200 t). En 2016, la production mondiale de *C. gigas* était estimée à 573 617 t, représentant une valeur marchande de 1,1 milliards de dollars (l'estimation ne prend pas en compte la production Chinoise).

En France, *C. gigas* est l'espèce de mollusque représentant le plus grand intérêt économique. En effet, sur 124 900 tonnes de mollusques produites en France en 2016, 51% était représenté par l'huître creuse. Ce mollusque bivalve représentait à lui seul un chiffre d'affaire d'environ 360 millions d'USD. Entre 2001 et 2012, la production de cette espèce a diminué de 26% en raison des phénomènes de mortalités massives ayant impacté le naissain depuis 2008 (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation-agreste 2014) (Figure 2). Malgré cela, l'huître creuse est toujours restée l'espèce majoritairement produite au niveau national et la France reste le principal pays européen producteur d'huîtres creuses devant l'Irlande et le Royaume-Uni (FAO 2018a; comité national de la conchyliculture 2014). De plus, la France exporte une partie du naissain de *C. gigas* qu'elle produit en éclosérie vers d'autres pays européens à des fins de culture. Occasionnellement des transferts d'animaux sont réalisés principalement avec l'Italie et l'Irlande (Muehlbauer *et al.* 2014). L'activité conchylicole est répartie sur tout le littoral français, cependant la production d'huîtres est essentiellement concentrée sur le Poitou-Charentes, la Bretagne et la Normandie (comité national de la conchyliculture 2014) (Figure 2).

La région Nouvelle-Aquitaine représente à elle seule 37% du chiffre d'affaire (hors taxes) de la conchyliculture française et regroupe 38% des entreprises françaises de conchyliculture (AcclimaTerra et Le Treut 2018). La production d'huîtres creuses dans cette région est la plus importante de France puisque 55% de la production nationale (soit 43400 tonnes en 2012) est obtenue en région Nouvelle-Aquitaine (Figure 2 ; Ministère de l'agriculture et de l'alimentation-agreste 2014). De plus, l'essentiel du captage naturel au niveau national est



réalisé dans les bassins de Marennes Oléron et d'Arcachon (Robert *et al.* 2013; Muehlbauer *et al.* 2014). La production Française de *C. gigas* est initiée majoritairement à partir de naissain provenant de captage naturel (70%) et dans une moindre mesure des écloséries (30%) (Robert *et al.* 2013). Cette disparité régionale dans le captage de naissain est à l'origine de nombreux transferts d'animaux au niveau national (Muehlbauer *et al.* 2014). Le naissain collecté en Nouvelle-Aquitaine est transféré au niveau de sites de grossissements en Normandie, en Bretagne et en Méditerranée.



**Figure 2.** Evolution de la production conchylicole nationale entre 2001 et 2012 et répartition de la production d'huîtres creuses par région conchylicole en 2012 (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation-agreste 2014).

## 1.2. Biologie et cycle de vie de *C. gigas*

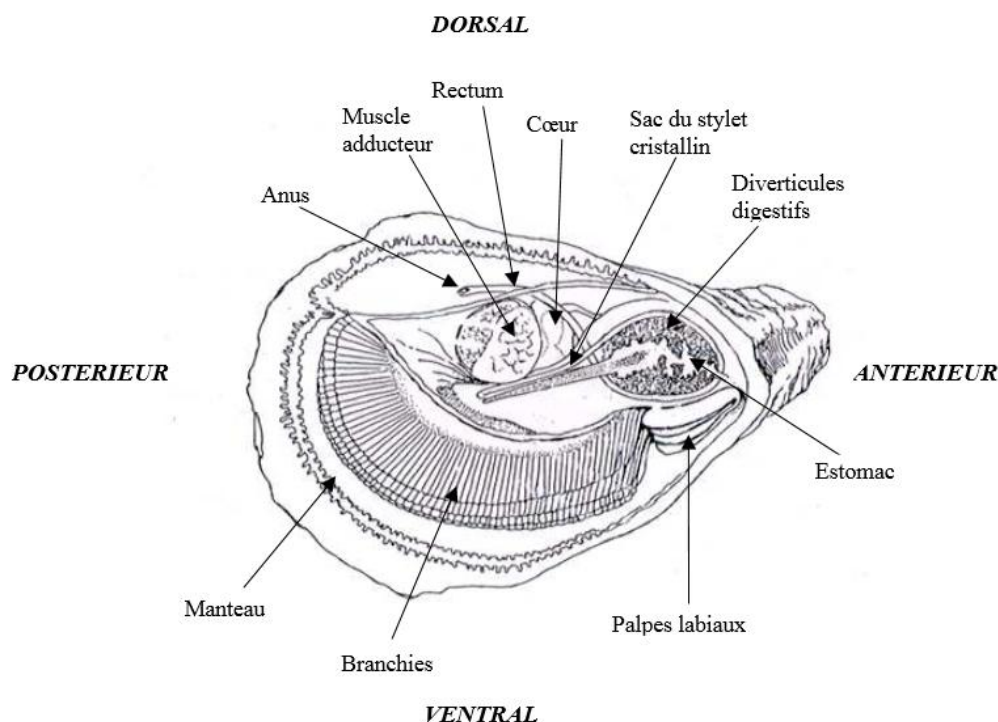
L'huître creuse, *Crassostrea gigas* est un mollusque bivalve marin filtreur, dont la position phylogénétique a été détaillée par le « world register of marine species » (WoRMS):

- Règne : Animal, Invertébrés
- Embranchement : Mollusques
- Classe : Bivalves
- Ordre : Ostreida
- Super-famille : Ostreidea
- Famille : Ostreidae
- Sous famille : Crassostreinae
- Genre : *Crassostrea* ou *Magallana* (reclassifié en 2016 par Salvi et Mariottini 2017)

- Espèce : *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) ou *Magallana gigas* (reclassifié en 2016 par Salvi et Mariottini 2017).

Bien que la nomenclature de *C. gigas* par le WoRMS ait changé en 2016 suite à la proposition de création d'un nouveau genre appelé *Magallana* (Salvi *et al.* 2014; Salvi et Mariottini 2017), tous les scientifiques ne s'accordent pas à l'utilisation de cette nouvelle taxinomie (Bayne *et al.* 2017; Backeljau 2018). Les analyses réalisées par Salvi et Mariottini (2017) ne seraient pas assez robustes pour proposer un tel changement de classification (nombre limité de gènes séquencés, échantillonnage incomplet au niveau de la sous-famille Crassostreinae et absence de diagnostic phénotypique qui inclut d'autres traits que des données de séquences ADN) (Bayne *et al.* 2017). Aussi, dans le cadre de ce manuscrit, nous continuerons à parler de l'huître creuse sous le nom de *Crassostrea gigas*.

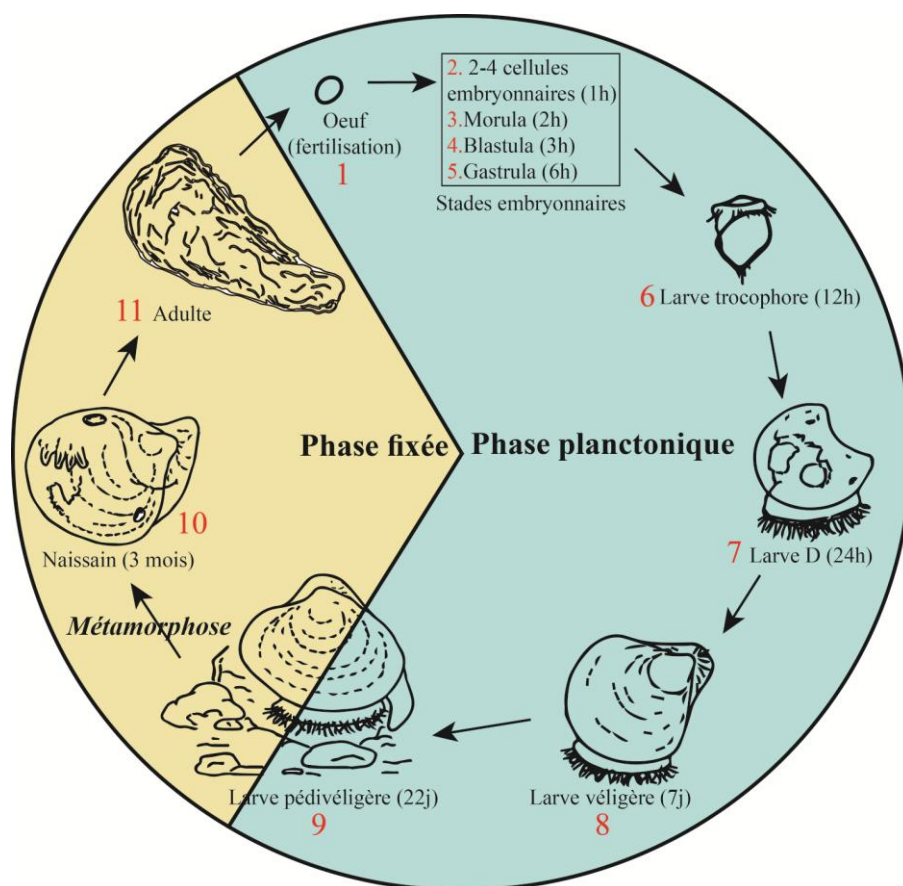
Cette espèce est communément appelée huître creuse, huître japonaise ou huître du Pacifique. Elle est constituée de deux valves asymétriques contenant un corps mou. Les deux valves sont rattachées entre elles par le biais du muscle adducteur mais également de la charnière. L'huître creuse possède un manteau qui lui permet de sécréter la coquille (Figure 3). Celui-ci est parcouru par de nombreuses terminaisons nerveuses et intervient dans la perception sensorielle tactile. L'huître creuse possède des branchies jouant un rôle dans la respiration et dans la nutrition (Figure 3). En effet, au-delà de permettre un approvisionnement en éléments nutritifs et en oxygène, les cils branchiaux latéraux génèrent un courant d'eau de mer inhalant. Les particules en suspension dans cette eau de mer sont retenues par les cils branchiaux et dirigées vers les palpes labiaux afin que seules les particules sélectionnées soient ingérées (Figure 3). Les autres sont rejetées sous forme de pseudofèces. Le système digestif est constitué par un court œsophage, un estomac et un intestin dans lequel se trouve le sac du stylet cristallin intervenant dans le broyage mécanique et chimique des aliments (Figure 3). Le système circulatoire de l'huître creuse est dit semi-ouvert. Le fluide circulant incolore, appelé hémolymphe, est présent dans les vaisseaux et baigne également les différents tissus. Ce système est composé d'un cœur (comprenant un ventricule et deux oreillettes), d'artères et de sinus (Figure 3). L'hémolymphe est transportée jusqu'aux branchies pour être oxygénée. Dans ce fluide, se trouvent notamment les hémocytes qui sont les principaux effecteurs de l'immunité de l'huître creuse lors d'une infection. Le muscle adducteur est le seul muscle squelettique de l'huître creuse (Figure 3). Il est capable de modifier l'ouverture valvaire. La reproduction est assurée par la gonade.



**Figure 3.** Anatomie de l'huître creuse, *C. gigas* (Gagnaire 2005).

Chez l'huître creuse, l'hermaphrodisme successif est dit à tendance protandrique (mâle la première année, puis changement de sexe) (Buroker 1983). La gamétogenèse débute au printemps lorsque les conditions environnementales sont favorables. Durant l'été, la maturation et l'émission des gamètes sont possibles uniquement si le seuil de température dit « température critique de ponte » est dépassé. La fécondation est externe puisque les gamètes des deux sexes sont expulsés dans l'eau de mer (Figure 4). Un individu peut émettre plusieurs dizaines de millions de gamètes mâles ou femelles. En général, le nombre de gamètes mâles émis est toujours supérieur au nombre de gamètes femelles. Le développement passe par une phase larvaire planctonique (Figure 4). Après la fécondation, le développement embryonnaire a été largement étudié chez l'huître creuse (Gerard *et al.* 1995). Les divisions cellulaires sont rapides et aboutissent à la formation d'un embryon de type morula (après 2 h), blastula (après 3 h) et gastrula (après 6 h). Puis, 12 h après fécondation, une larve trochophore est formée pour donner à 24 heures une larve en forme de D (Figure 4). Après une période de 22 jours post-fécondation, la larve appelée pédivéligère atteint une taille d'environ 200  $\mu\text{m}$  et développe un pied participant à la recherche d'un substrat pour sa fixation (Figure 4). Une fois fixée, la larve débute sa métamorphose se traduisant par de nombreuses modifications comprenant notamment l'apparition du manteau et des branchies et la disparition du pied et du vélum. A la fin de ces modifications, la larve devient naissain. A partir de 12 mois, elle est

considérée comme juvénile, et après 18 mois le terme d'adulte est utilisé (Figure 4). Elle passera ensuite le reste de sa vie fixée au substrat sans autre modification qu'une augmentation de taille.



**Figure 4.** Cycle de reproduction de l'huître creuse, *C. gigas*. (1) ovocyte fertilisé, (2) 2-4 cellules embryonnaires, (3) Morula, (4) Blastula, (5) Gastrula, (6) larve trochophore, (7) Larve D, (8) larve véligère, (9) larve pédivéligère, (10) naissain, (11) adulte (d'après Tirapé *et al.* 2007).

### 1.3. Génome de l'huître creuse

L'apparition du séquençage haut débit aussi appelé next-generation sequencing (NGS) dans les années 2000, a facilité et permis le séquençage de nombreux génomes. Actuellement, trois génomes de mollusques sont disponibles dans les bases de données publiques (Guo et Ford 2016; Ensembl Metazoa): le génome de la pieuvre, *Octopus bimaculoides* (Albertin *et al.* 2015), de l'escargot de mer, *Lottia gigantea* (Simakov *et al.* 2013) et de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Zhang *et al.* 2012). Le génome de l'huître creuse a été publié en 2012 (Zhang *et al.* 2012). Au sein de celui-ci, 28 027 gènes prédictifs ont été identifiés et des séquences répétitives ont été détectées en abondance. Cependant, un nombre important de ces répétitions (62%) ne peuvent être assignées à des catégories fonctionnelles connues. Ces observations montrent qu'il manque des informations génomiques chez les mollusques.

Le génome présente également un polymorphisme élevé et un grand nombre d'éléments transposables actifs. Le mode de vie sessile de l'huître creuse ainsi que l'environnement intertidal dans lequel elle vit, serait à l'origine de l'existence d'un nombre important de gènes impliqués dans des voies de défense de l'hôte contre les stress biotiques et abiotiques. C'est notamment le cas des gènes codant pour les Heat Shock Proteins (HSP) et les inhibiteurs d'apoptose (IAP). Le séquençage du génome de l'huître creuse et les données détaillées du transcriptome fournissent des ressources précieuses pour étudier la biologie des mollusques, l'évolution des lophotrochozoaires et l'amélioration génétique des huîtres.

#### 1.4. Episodes de mortalités massives chez *C. gigas*

En France, l'huître creuse est affectée par plusieurs maladies dues à différents organismes pathogènes ayant principalement été identifiés comme appartenant aux bactéries du genre *Vibrio* et au virus OsHV-1.

Des épisodes de mortalité massive de bivalves ont été rapportés en écloserie ou dans les structures d'élevage en mer associés à la présence de bactéries du genre *Vibrio* (Travers *et al.* 2015; Barbosa Solomieu *et al.* 2015). Plusieurs clades (comme *Splendidus* et *Harveyi*) ou espèces (*Vibrio aestuarianus*, *Vibrio tubiashii*, *Vibrio coralliilyticus* et *Vibrio tapetis*) sont associés à ces événements de mortalité observés chez *C. gigas*. Depuis 2001, des mortalités ont été rapportées en France sur des huîtres creuses aux stades juvénile et adulte. Une étude plus approfondie des animaux moribonds et de leur environnement a permis de détecter la présence de *V. aestuarianus* (Barbosa Solomieu *et al.* 2015). Le réseau REPAMO (Réseau de pathologie des mollusques) coordonné par l'Ifremer a montré une augmentation du nombre de cas de mortalité d'huîtres creuses adultes associés à la détection de la bactérie *V. aestuarianus* (11% des lots présentaient la bactérie en 2010 contre 64% en 2012) (Francois *et al.* 2013). Au sein de cette espèce, il a été mis en évidence plusieurs souches présentant des degrés de virulence variables conduisant à des mortalités plus ou moins importantes (Goudenège *et al.* 2015).

Le virus OsHV-1 (Davison *et al.* 2005) est également associé à de nombreux événements de mortalité chez plusieurs espèces de mollusques dans le monde dont fait partie *C. gigas* (Arzul *et al.* 2017). Au début des années 1990, des premières mortalités ont été observées au sein d'éclosiers sur des larves et du naissain de *C. gigas* en France (Nicolas *et al.* 1992), en Nouvelle-Zélande (Hine *et al.* 1992), aux Etats-Unis (Friedman *et al.* 1997; Cherr et Friedman 1998; Burge *et al.* 2006) et au Mexique (Renault et Novoa 2004). Les observations de larves

et de naissain infectés effectuées au microscope électronique à transmission ont montré la présence de particules virales présentant les caractéristiques morphologiques partagées par les herpesvirus (Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b). Des mortalités ont par la suite été observées sur du naissain le long des côtes françaises, associées à la détection de particules virales de type herpes. Ce virus a été appelé Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Hine *et al.* 1992; Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994b). Depuis 2008, l'émergence d'un nouveau génotype appelé OsHV-1  $\mu$ Var, a conduit à l'apparition de mortalités massives sur l'ensemble des bassins ostréicoles français (Segarra *et al.* 2010).

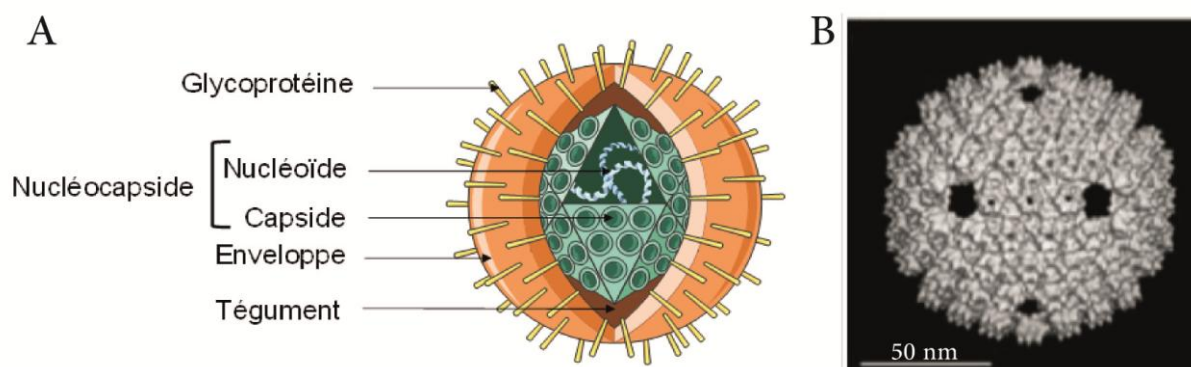
## 2. Le virus ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)

### 2.1. Origine et structure du virus OsHV-1

Plus de cent cinquante herpesvirus ont été identifiés et isolés principalement à partir d'organismes vertébrés et de quelques invertébrés (Smith et Whitley 2017). La première détection d'une infection par un virus de type herpes chez un mollusque (*Crassostrea virginica*) a été observée aux Etats-Unis en 1972 (Farley *et al.* 1972). En France, le premier virus de type herpes identifié a été associé à des mortalités observées aux stades naissain et larvaire chez l'huître creuse, *C. gigas* (Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b). Ce virus a provoqué des mortalités chez d'autres espèces de bivalves incluant le pétoncle *Chlamys farreri* (Ren *et al.* 2013), les palourdes *Scapharca broughtonii* (Xia *et al.* 2015), *Ruditapes philippinarum* (Arzul *et al.* 2001c; Renault *et al.* 2001b) et *Ruditapes decussatus* (Renault et Arzul 2001; Arzul *et al.* 2001c), la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Arzul *et al.* 2001a), l'huître plate *Ostrea edulis* (Comps et Cochenec 1993; Renault *et al.* 2000; Arzul *et al.* 2001c; Arzul *et al.* 2001b), l'huître Portugaise *Crassostrea angulata* et l'huître plate Australienne *Ostrea angasi* (Hine et Thorne 1997).

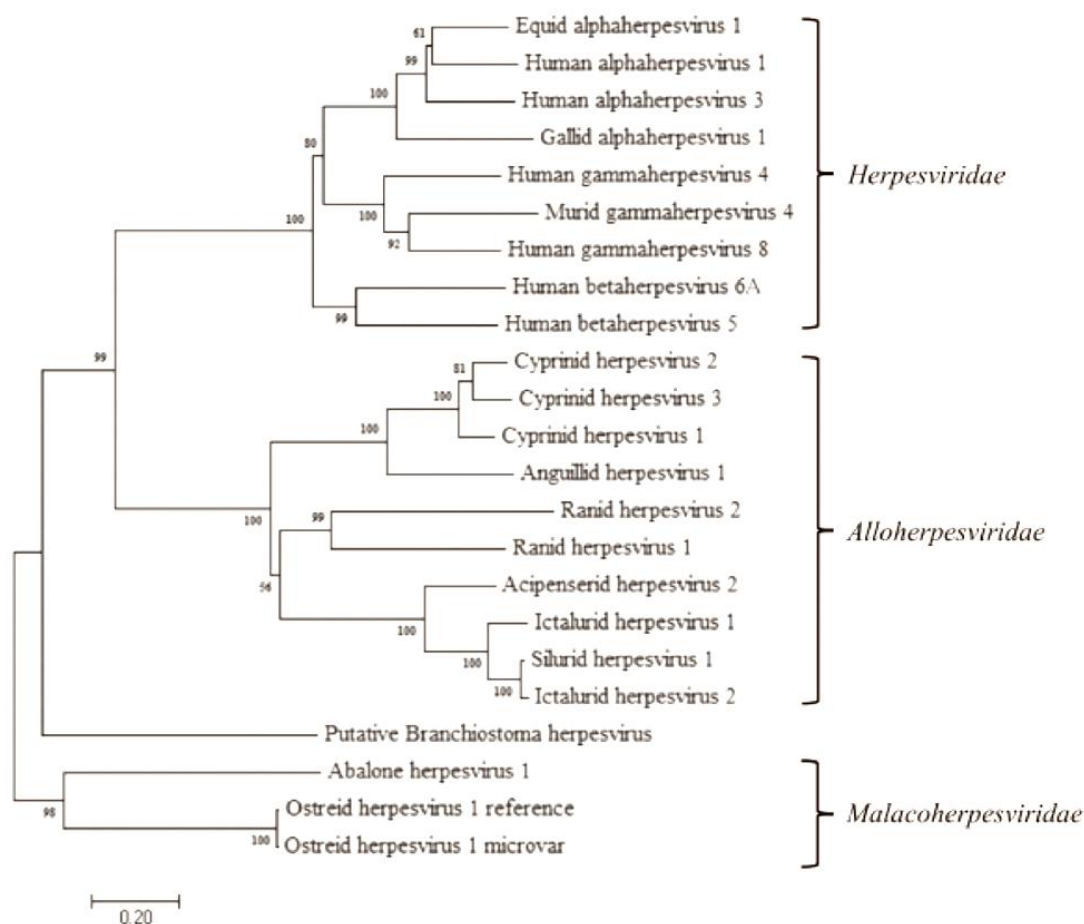
A partir de larves de *C. gigas* infectées issues d'une éclosion française et collectés en 1995, des particules virales d'OsHV-1 ont été purifiées (Le Deuff et Renault 1999). Elles ont permis de réaliser une extraction du matériel génétique viral (Le Deuff et Renault 1999) et de séquencer le génome du virus (Davison *et al.* 2005). L'analyse de son génome a permis de le classer comme appartenant aux herpesvirus. Des analyses complémentaires menées aux niveaux moléculaire et morphologique ont mis en évidence la présence de caractéristiques spécifiques aux herpesvirus (Davison *et al.* 2005) et de proposer son identification comme Ostreid herpesvirus type 1 (OsHV-1). Parmi les critères morphologiques spécifiques aux

herpèsvirus identifiés chez OsHV-1, il a été démontré la présence d'une capsid, d'un tégment, d'une enveloppe présentant parfois des projections à sa surface et d'un ADN double brin (Figure 5A) (Renault *et al.* 1994a; Renault 1998). Une approche en microscopie électronique à transmission, a également permis d'observer que la capsid du virus était de forme icosaédrique constituée de 16 triangles et d'une taille de 116 nm (Davison *et al.* 2005) Ce motif géométrique en forme de maille est observé uniquement chez les membres de cette famille (Figure 5B). Son génome est d'une taille de 207 439 pb et contient 38.7 mol% G+C (Davison *et al.* 2005).



**Figure 5.** A. Structure d'une particule de type herpèsvirus (Segarra 2014) B. Reconstitution de la capsid du virus OsHV-1 par microscopie électronique (Davison *et al.* 2005).

L'un des critères moléculaires spécifiques aux herpèsvirus identifié chez OsHV-1 est la présence de l'ORF 109. Cet ORF code une sous-unité ATPase d'une terminase présentant des équivalents dans l'ensemble des herpèsvirus de vertébrés. En règle générale, la structure de cet ORF permet de répartir les homologues entre les deux branches phylogénétiques que sont les alloherpesviridae (herpèsvirus infectant les amphibiens et les poissons) et les herpesviridae (herpèsvirus affectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles). En effet, cet ORF présente un intron chez les herpèsvirus des vertébrés supérieurs et deux introns chez les herpèsvirus des vertébrés inférieurs. Cependant, dans le cas du virus infectant l'huître creuse, aucun épissage n'est observé pour ce gène. L'ensemble des caractéristiques morphologiques et moléculaires du virus infectant les larves d'huîtres creuses ont conduit à la création d'une troisième famille appelée les Malacoherpesviridae, dont le premier membre identifié est le virus OsHV-1 (Davison *et al.* 2005). Cette nouvelle famille partage le même ancêtre commun que les deux autres familles phylogénétiques et toutes les trois sont regroupées sous l'ordre des herpesvirales (Figure 6) (Davison *et al.* 2005).



**Figure 6.** Classification du virus OsHV-1 au sein de l'ordre des herpesvirales (Davison *et al.* 2009; Burioli *et al.* 2017). Les herpesvirales regroupent trois familles : les alphaherpesvirinae, les betaherpesvirinae et les gammaherpesvirinae.

## 2.2. Diversité et évolution du virus OsHV-1

En 2005, le génome de référence d'OsHV-1 a été publié. Cependant des variants d'OsHV-1 ont été rapportés chez différents mollusques marins et dans différentes localisations géographiques (Arzul *et al.* 2001a; Arzul *et al.* 2001b; Friedman *et al.* 2005; Moss *et al.* 2007; Renault *et al.* 2001b; Renault *et al.* 2001a).

En France, un variant appelé « Var » a été mis en évidence en 1997 durant un épisode de mortalité affectant des larves d'huitres creuses et de palourdes japonaises (*Ruditapes philippinarum*) dans des écloseries (Arzul *et al.* 2001a; Renault *et al.* 2001b; Renault *et al.* 2001a). Ce variant a été très rarement détecté en France et infecte possiblement en priorité les palourdes (Renault *et al.* 2012). En 2001, ce variant d'OsHV-1 a aussi été détecté chez des larves de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) affectées par des mortalités (Arzul *et al.* 2001a).



En 2008, l'émergence d'un autre variant d'OsHV-1 appelé  $\mu$ Var a provoqué des mortalités massives chez le naissain d'huître creuse sur l'ensemble du littoral français et en Europe (Segarra *et al.* 2010; EFSA 2010). Le variant  $\mu$ Var a initialement été rapporté en France (Segarra *et al.* 2010; Martenot *et al.* 2011; Renault *et al.* 2012; Martenot *et al.* 2013), en Irlande (Peeler *et al.* 2012), puis en Grande Bretagne en 2010 (EFSA 2010; Lynch *et al.* 2012). Plusieurs autres variants très proches du variant  $\mu$ Var associés à des épisodes de mortalité ont également été détectés en France (appelé  $\mu$ Var  $\Delta 9$  et  $\mu$ Var  $\Delta 15$ ) (Martenot *et al.* 2011; Martenot *et al.* 2012), en Nouvelle-Zélande (Keeling *et al.* 2014), en Australie (Paul-Pont *et al.* 2014), au Mexique (Grijalva-Chon *et al.* 2013), en Irlande (Lynch *et al.* 2012; Morrissey *et al.* 2015), au Japon (Shimahara *et al.* 2012), en Corée du sud (Hwang *et al.* 2013) et en Espagne (Roque *et al.* 2012). Dans ce contexte, le terme  $\mu$ Var ne peut être utilisé que pour définir le variant présentant les mutations rapportées par Segarra *et al.* (2010). Les variants génotypiques présentant des séquences proches de celles du variant  $\mu$ Var sont désignés sous le vocable « microvariants » (OIE 2018). Parfois, il est possible de détecter simultanément plusieurs variants au sein d'un même animal comme cela a été observé en Italie (Dundon *et al.* 2011). Cependant depuis 2008, OsHV-1  $\mu$ Var est le principal variant détecté au cours des épisodes de mortalités en Europe (Segarra *et al.* 2010; Renault *et al.* 2012).

L'apparition de l'ensemble de ces variants au niveau mondial met en évidence une évolution du virus OsHV-1. Il est connu que les herpesvirus évoluent de manière synchronisés avec leur hôte (Tischer et Osterrieder 2010). La détection de certains variants d'OsHV-1 associés à différentes espèces de mollusques bivalves comme *C. ferrari*, *S. broughtonni* et *C. gigas* suggèrent un processus évolutif influencé par l'hôte (Bai *et al.* 2018), même si des différences ont pu également être observées en fonction de l'origine géographique chez l'huître creuse (Renault *et al.*, com pers.). Les données disponibles aujourd'hui ne permettent pas d'associer virulence et génotype bien qu'au niveau génomique, des mutations aient été observées pour le variant  $\mu$ Var dans les régions codantes de plusieurs cadres de lecture ouverts (open reading frame, ORF) (Burioli *et al.* 2017). La diversité du virus OsHV-1 a également été observée aux travers de modifications structurelles du génome, identifiées à l'aide du séquençage du génome du variant  $\mu$ Var en 2017 (Burioli *et al.* 2017).

### 2.3. Architecture génomique du virus OsHV-1

Les caractéristiques générales des deux génotypes séquencés d'OsHV-1 (référence et  $\mu$ Var) ont été rapportées dans le Tableau 1 ci-dessous :

**Tableau 1.** Caractéristiques des génomes du virus OsHV-1 de référence et  $\mu$ Var (Davison *et al.* 2005; Burioli *et al.* 2017). ORF : open reading frame. TRL et IRL, TRS et IRS : séquences inversées répétées; X et X', UL et US : régions uniques.

	Génome OsHV-1 de référence	Génome OsHV-1 $\mu$ Var
<b>Organisation du génome</b>	TR <sub>L</sub> -U <sub>L</sub> -IR <sub>L</sub> -X-IR <sub>S</sub> -U <sub>S</sub> -TR <sub>S</sub>	TR <sub>L</sub> -U <sub>L</sub> -IR <sub>L</sub> -X-IR <sub>S</sub> -U <sub>S</sub> -TR <sub>S</sub> -X' Ou X'-TR <sub>L</sub> -U <sub>L</sub> -IR <sub>L</sub> -X-IR <sub>S</sub> -U <sub>S</sub> -TR <sub>S</sub>
<b>Longueur du génome</b>	207 439 pb	204 897 pb
<b>Composition en G+C</b>	38.7 %	38.9%
<b>Nombre d'ORFs total</b>	136	128
<b>ORFs répliqués (régions répétées inversées)</b>	12	13
<b>ORFs codants pour des protéines uniques</b>	124	115
<b>Protéines codant pour des enzymes et protéines sécrétées</b>	12	25
<b>Protéines membranaires</b>	18	19
<b>Inhibiteur d'apoptose</b>	4	4
<b>Gènes possédant des motifs zinc finger RING</b>	9	8
<b>Gènes de fonction inconnue</b>	84	70

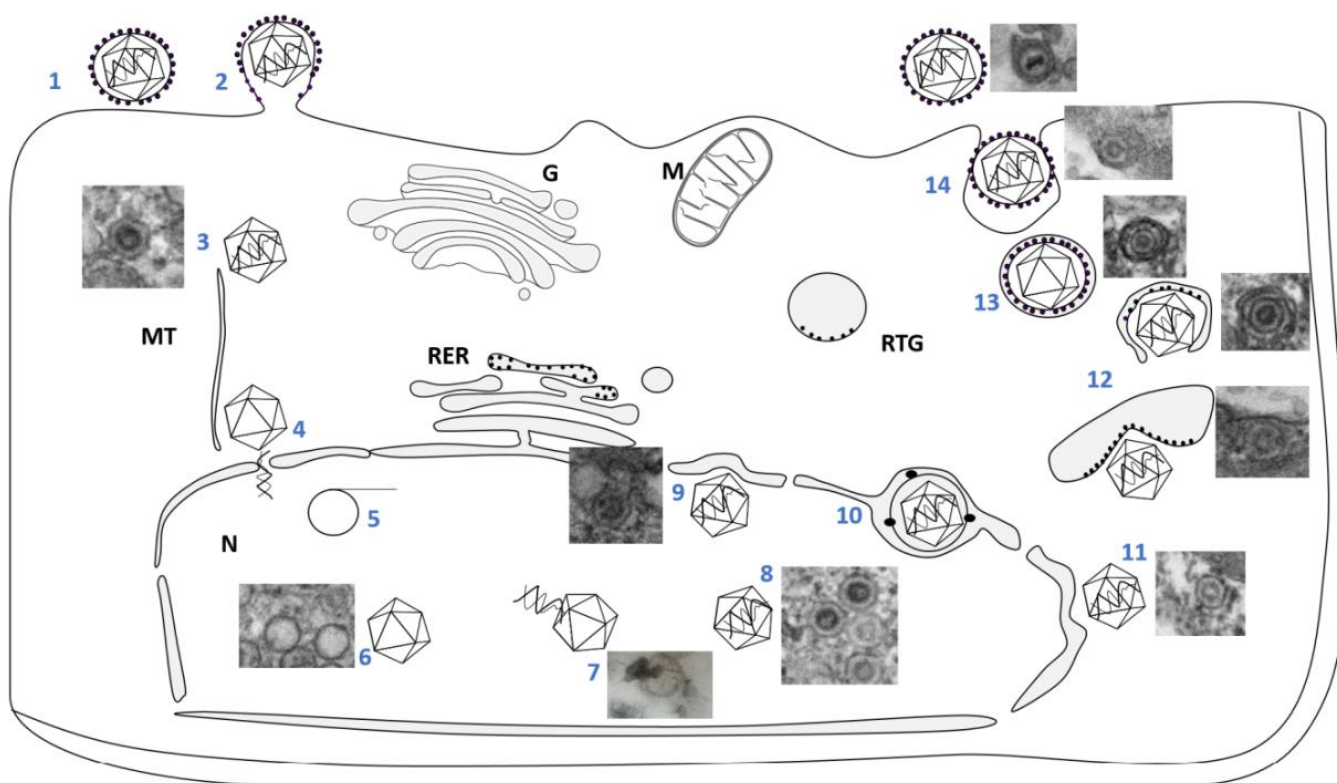
Les données obtenues par Burioli et collaborateurs (Burioli *et al.* 2017) mettent en évidence que le génome du variant  $\mu$ Var est génétiquement proche du génome de référence. En effet, la comparaison des séquences nucléotidiques des deux génotypes a révélé qu'ils partageaient 94,4 % de similarité et qu'il y avait peu de variation entre le nombre d'ORFs retrouvés dans le génome OsHV-1 de référence et  $\mu$ Var. De plus, l'organisation du génome est proche entre les deux génotypes. Les deux régions uniques dénommées U<sub>L</sub> et U<sub>S</sub>, respectivement flanquées des deux séquences inversées répétées : TR<sub>L</sub> et IR<sub>S</sub>, TR<sub>S</sub> et IR<sub>S</sub> ont été retrouvés.

Les répétitions sont séparées par une troisième région unique appelée X (Davison *et al.* 2005). Pour le variant  $\mu$ Var une région X' a également été identifiée en supplément par rapport au génome de référence, mais sa position est incertaine. Segarra *et al.* (2010) ont identifié plusieurs différences dans deux régions du génome (l'ORF 4 et les ORFs 42/43). Notamment, une délétion de 12 pb dans un microsatellite situé en amont de l'ORF 4, caractérisant le variant  $\mu$ Var par rapport au génome de référence (GenBank accession n° AY509253). Une disparition des ORFs 36 et 37 et une disparition partielle de l'ORF 38 a également été rapportée dans la majorité des cas (Segarra *et al.* 2010; Renault *et al.* 2012). Burioli *et al.* (2017) ont mis en évidence que le variant  $\mu$ Var présentait cinq régions avec d'importantes délétions en comparaison avec le génome de référence d'OsHV-1 toutes localisées dans la région U<sub>L</sub> ou à cheval entre la région U<sub>L</sub> et IR<sub>L</sub>. Les insertions ou délétions observées ont conduit à la perte de 5 ORFs (36, 37, 48, 62 et 63), à la diminution de taille de l'ORF 11, et à l'ajout de 4 ORFs appelés ORF<sup>V</sup>s IN.1 à IN.4.

#### 2.4. Cycle de réplication du virus OsHV-1

Le cycle de réplication du virus OsHV-1 n'est pas encore complètement élucidé. Chez les mollusques bivalves, il n'est pas possible de l'étudier en condition *in vitro* car il n'existe pas de lignée cellulaire de mollusque bivalve marin. Cependant, un cycle hypothétique de réplication du virus OsHV-1 a été proposé par Segarra (2014) sur la base d'un ensemble de travaux réalisés en microscopie électronique à transmission et préalablement publiés (Figure 7). Celui-ci est proche du cycle de réplication classiquement observé chez les herpesvirus décrit par Lussignol et Esclatine (2017).

Cependant chez les herpesvirus, le cycle viral est constitué d'une phase productive et d'une phase de latence. Cette seconde phase permet au virus de rester au sein de son hôte tout au long de sa vie (Lussignol et Esclatine 2017). L'ADN du virus est alors circularisé, formant un épisode. Ces épisodes sont généralement localisés au niveau du noyau de la cellule. Au cours de la phase de latence, le génome viral n'est pas complètement silencieux car quelques gènes viraux continuent à être exprimés (Grinde 2013). Un herpesvirus peut être réactivé (passage d'une phase de latence à une phase de production) en réponse à différents stimuli (stress, facteurs environnementaux et état physiologique de l'hôte) (Segarra 2014; Lussignol et Esclatine 2017). Cependant chez le virus OsHV-1, la phase de latence n'a jamais été clairement mise en évidence, même si des études suggèrent qu'il est capable de persister au sein des animaux adultes. En effet, au sein d'animaux adultes asymptomatiques, de l'ADN



**Figure 7.** Cycle de réplication supposé du virus OsHV-1 (Le Deuff *et al.* 1994; Renault *et al.* 1994a; Segarra 2014). (1) Adsorption du virus par cellule cible et (2) fusion avec la glycoprotéine membrane. (3) Perte d'une grande partie du tégment. (4) Nucléocapsides transportées par les microtubules vers le pore nucléaire, (5) ADN viral libéré et transcrit dans le noyau puis réplication de l'ADN viral. (6) Assemblage de la capside. (7) Conditionnement de l'ADN viral et (8) entrée de l'ADN viral dans la capside. (9) La nucléocapside fusionne avec la membrane nucléaire interne. (10) La nucléocapside atteint ensuite la membrane nucléaire extérieure puis (11) est libérée dans le cytoplasme. (12) La capside «nue» acquiert son enveloppe finale au niveau du réseau trans-golgien formant une vésicule. (13) Les virions matures entrent dans la vésicule pour être transportés vers la membrane cellulaire qui sera ensuite (14) libérée par exocytose. M : mitochondrie, G : appareil de Golgi, N : noyau, RER : réticulum endoplasmique rugeux, MT : microtubules et RTG : réseau trans golgien

et des protéines virales ont été observées (Arzul *et al.* 2002). De plus, un faible nombre de copies d'ADN viral semble être maintenu au sein des huîtres creuses adultes après la phase aiguë de l'infection (Segarra *et al.* 2014a).

## 2.5. Réplication et localisation du virus OsHV-1 chez son hôte

Des travaux réalisés en microscopie électronique à transmission ont été les premiers à permettre d'identifier des cellules et tissus cibles puis des sites de réplication virale (Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b; Renault *et al.* 2001a). Ainsi, les cellules fibroblastiques, les cardiomyocytes et les cellules nerveuses sont apparues comme des cellules dans lesquelles le virus se réplique (Renault *et al.* 1994b; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1995; Renault *et al.* 2000). Des particules virales ont pu être détectées dans le manteau, les branchies, la glande digestive, le muscle adducteur ou les ganglions nerveux (Renault *et al.* 1994b; Renault *et al.* 1995).

Ces travaux ont ensuite été complétés en utilisant des outils moléculaires. Une recherche de la localisation d'ADN viral et d'ARNm viraux a été effectuée sur du naissain de *C. gigas* infecté par OsHV-1 (Segarra *et al.* 2016). Des résultats en hybridation *in situ* montrent que le virus est capable de se répliquer dans différents tissus de l'huître creuse (Segarra *et al.* 2016). Les branchies, le manteau et le cœur sont les premiers organes concernés par une réplication virale, puis l'ensemble des tissus présentent des ARNm viraux à l'exception de la gonade. Le cœur pourrait être un site de réplication précoce du virus et contribuerait à la dissémination du virus au sein de l'organisme de part sa capacité à faire circuler l'hémolymphe. Dans le manteau de l'huître creuse, la réplication du virus semble également précoce. Certains gènes (les inhibiteurs d'apoptose et les enzymes) sont détectables à partir de 2 hpi par PCR en temps réel (Segarra *et al.* 2014b). Une approche en immunohistochimie a également permis de localiser trois protéines virales au sein des tissus de l'huître creuse (Martenot *et al.* 2016). Ces trois protéines virales ont été détectées dans les cellules épithéliales de différents organes (manteau, branchies, glande digestive,...). Les résultats suggèrent que les tissus conjonctifs seraient des sites privilégiés pour la réplication d'OsHV-1.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires viraux et cellulaires de l'huître impliqués dans les interactions hôte/virus, deux familles de sensibilité contrastée à l'infection par OsHV-1 ont été utilisées (Segarra *et al.* 2014c). Les résultats ont mis en évidence des différences en termes de réplication virale et de réponse immunitaire. Toutefois, le cycle de

réplication semble être le même entre les deux familles contrastées et les huîtres appartenant à une famille résistante à l'infection ne sont pas réfractaires à l'infection.

Au stade adulte, des individus de *C. gigas* ne présentant pas de symptômes d'une infection par OsHV-1, ont été analysés à l'aide d'outils moléculaires (hybridation *in situ*, PCR en temps réel) et protéiques (immunohistochimie). Le but de ces approches était de détecter et localiser de l'ADN et des protéines virales au sein de différents tissus (Arzul *et al.* 2002). L'ensemble de ces trois techniques ont permis de détecter la présence d'herpèsvirus dans les tissus conjonctifs du manteau, des branchies et des gonades mâles et femelles. Chez les huîtres adultes, le manteau et les branchies seraient des sites privilégiés de réplication du virus et la gonade serait infectée favorisant la contamination des embryons d'huître creuse. Segarra *et al.* (2014a) ont également suivi la quantité d'ADN viral et l'expression de 39 ORFs du virus au cours d'une infection expérimentale dans le manteau d'animaux adultes. Les résultats obtenus mettent en lumière une capacité du virus à se répliquer au sein des huîtres adultes, mais les animaux seraient capables de gérer l'infection virale et la réplication du virus induisant une diminution de celle-ci au cours de l'infection.

## 2.6. Infection virale et facteurs de risques

La dynamique de l'infection virale peut être influencée par plusieurs facteurs liés à l'environnement, l'hôte et aux pratiques culturelles (Barbosa Solomieu *et al.* 2015; Arzul *et al.* 2017).

Dans l'environnement, les mortalités chez l'huître creuse sont observées en été de manière récurrente (Garcia *et al.* 2011). D'après plusieurs études, l'apparition de ces mortalités estivales, seraient liées à la température de l'eau de mer (Garcia *et al.* 2011). En effet, une augmentation de la température de l'eau permettrait la production précoce de particules virales. Cela causerait une dissémination rapide de la maladie et entraînerait des mortalités importantes et soudaines chez des huîtres aux stades larvaire et naissain (Le Deuff *et al.* 1996; Sauvage *et al.* 2009). Cependant, le virus induit des mortalités dans une gamme de température précise. Sur le terrain et en condition expérimentales, les mortalités sont généralement observées si la température est comprise entre 16 et 24°C (Sauvage *et al.* 2009; Schikorski *et al.* 2011; Pernet *et al.* 2012; Petton *et al.* 2013; Renault *et al.* 2014). En dessous de 16°C, le virus persiste dans les huîtres mais n'induit pas de mortalité (Pernet *et al.* 2015). A une température élevée (29°C), la survie des huîtres est améliorée en réponse à une infection virale (Delisle *et al.* 2018). De plus, à 25°C, le virus serait moins infectieux

(Martenot *et al.* 2015). L'ensemble de ces résultats montrent que la température de l'eau de mer impacte le développement du virus et de la maladie.

La salinité de l'eau de mer est également un facteur environnemental influençant la dynamique d'infection du virus. En effet, acclimater le naissain d'huître creuse à une faible salinité (10‰) avant de l'exposer à une source infectieuse (eau de mer contaminée produite à partir d'animaux détectés positifs au virus OsHV-1) provoque une meilleure survie des animaux et une diminution de l'expression des gènes viraux et de la quantité d'ADN viral. De plus, le virus serait moins infectieux lorsque l'eau de mer présente une faible salinité (10‰) (Fuhrmann *et al.* 2016).

Il est également connu que plusieurs facteurs liés à l'hôte, comme l'âge, la taille, le poids et la composante génétique influencent la résistance de l'huître creuse à une infection par le virus OsHV-1. En effet, lorsque les huîtres sont âgées de moins d'un an, elles sont plus sensibles à une infection par le virus (Renault *et al.* 1995; Schikorski *et al.* 2011; Garcia *et al.* 2011). Plus les animaux sont âgés, de grande taille, et d'un poids élevé, plus ils sont résistants à une infection par le virus OsHV-1 (Dégremont 2013; Normand *et al.* 2014). Une corrélation négative a été observée entre le poids et le taux de mortalité ainsi qu'entre la masse de l'individu et la détection du virus (Normand *et al.* 2014). Plusieurs études supportent également l'existence d'une base génétique permettant une meilleure résistance de l'huître creuse en réponse à une infection par OsHV-1 (Sauvage *et al.* 2009; Dégremont 2011). Au cours d'une infection virale, les huîtres issues de plusieurs familles produites via des programmes de sélections présentent des taux de survie différents. De plus, ce taux de survie peut être amélioré chez des huîtres aux stades adulte, juvénile et larvaire (Dégremont 2011; Dégremont *et al.* 2015; Dégremont *et al.* 2016).

Les pratiques culturelles pourraient également avoir un impact sur la dynamique d'infection du virus. L'élevage d'huîtres dans une zone intertidale semble avoir un fort impact sur la mortalité et la détection du virus OsHV-1 (Garcia *et al.* 2011; Normand *et al.* 2014). Une amélioration de la survie des huîtres est observée si l'élevage a lieu plus en hauteur dans la zone intertidale (Paul-Pont *et al.* 2013a). Les auteurs suggèrent qu'un temps d'immersion réduit induit une exposition plus faible des huîtres aux particules virales limitant ainsi le risque qu'elles soient infectées par le virus (Peeler *et al.* 2012; Paul-Pont *et al.* 2013a).

## 2.7. Transmission du virus OsHV-1

En dehors de son hôte, le virus se transmettrait d'une huître creuse à une autre par l'eau de mer. Une étude a permis de détecter de l'ADN viral dans l'eau de mer situé à proximité d'huîtres infectées par le virus OsHV-1 (Sauvage *et al.* 2009). Plusieurs expérimentations réalisées en condition expérimentale ont été menées sur des huîtres aux stades naissain et larvaire afin de démontrer la transmission horizontale du virus par l'eau de mer. Au stade naissain, une expérimentation par cohabitation entre des huîtres infectées et non infectées a démontré que les huîtres supposées non infectées présentaient des mortalités (50% au bout de 8 jours post cohabitation) et de l'ADN viral dans leurs tissus à partir de 6 heures post cohabitation (Schikorski *et al.* 2011). Des mortalités ont également été observées sur des larves axéniques de *C. gigas* (100%) mises en contact avec un inoculum de suspension virale (constitué à partir d'eau de mer dans laquelle des larves de *C. gigas* infectées ont macéré avant d'être filtrée à 0,22 µm) pendant une durée de 6 jours (Le Deuff *et al.* 1994).

De récents travaux suggèrent que la transmission du virus dans l'eau de mer se ferait également par le biais d'un vecteur ou d'une particule (Paul-Pont *et al.* 2013b; Evans *et al.* 2014; Whittington *et al.* 2015). D'après Paul-Pont *et al.* (2013b), le virus pourrait être transmis en étant attaché à du phytoplancton. Le virus pourrait exister dans l'eau de mer sous différentes formes : virus libres, agrégés, accrochés à des particules ou ADN viral libre (Evans *et al.* 2014).

La transmission du virus à des huîtres non infectées serait possible grâce à l'existence d'huîtres infectées jouant le rôle de réservoirs à virus (Le deuff *et al.* 1996). Les animaux moribonds et les huîtres mortes sont vraisemblablement une source importante de virus (Sauvage *et al.* 2009), mais les huîtres adultes pourraient avoir un rôle de réservoir (Arzul *et al.* 2002; Segarra *et al.* 2014a). En effet, de l'ADN et des protéines virales ont été détecté chez des huîtres adultes ne présentant pas de symptômes d'une infection par le virus OsHV-1. Il est également possible que d'autres animaux puissent jouer le rôle de réservoir (OIE 2018). Récemment, de l'ADN viral d'OsHV-1 a été détecté en France et en Irlande chez la moule bleue (*Mytilus edulis*) et la telline (*Donax trunculus*) (Cochennec-Laureau *et al.* 2011; O'Reilly *et al.* 2018; OIE 2018).



### 3. Le système immunitaire chez les bivalves

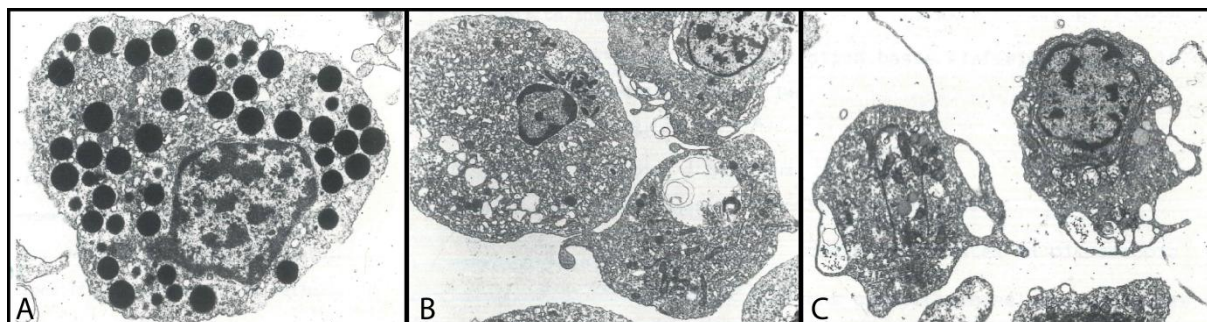
Les bivalves, peuvent être infectés par divers organismes pathogènes. Ils luttent contre ces infections en utilisant des mécanismes de défense faisant appel à des réponses aux niveaux cellulaire et humorale. Chez les vertébrés, le système immunitaire inclut deux formes d'immunité : innée, présente chez toutes les espèces vivantes, et adaptative, présente uniquement chez les vertébrés (Flajnik et Du Pasquier 2004). Les organismes invertébrés présentent une forme d'immunité innée, et également une forme de mémoire immunitaire appelée « priming immunitaire ». L'immunité innée chez les invertébrés est une réponse immunitaire non spécifique qui permet d'engager une réponse au cours d'une infection par des agents pathogènes de manière générique (Guo *et al.* 2015). Cependant, il existe un système de reconnaissance du soi et du non soi (Galloway et Depledge 2001). En effet, chez les invertébrés, des récepteurs de reconnaissance immunitaires (PRRs, pattern recognition receptors) permettent d'identifier des structures moléculaires glucidiques, protéiques, lipidiques ou combinées, produites par les micro-organismes. Ces structures sont appelées des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns) (Riout 2013). La reconnaissance de ces PAMPs par les PRRs induit l'activation de la réponse immunitaire innée. Le système immunitaire inné des invertébrés repose sur les défenses cellulaires et humorales.

#### 3.1. Le système immunitaire de *C. gigas*

##### 3.1.1. Les hémocytes, cellules clés du système immunitaire

Chez les bivalves, les défenses sont médiées par les hémocytes, qui sont les principaux acteurs de l'immunité. Ce sont des cellules circulantes présentes dans les différents tissus de l'huître creuse. Il existe trois principales catégories d'hémocytes ayant été identifiées chez *C. gigas* : les petits hyalinocytes (parfois appelés agranulocytes), les grands hyalinocytes (aussi appelés semi-granulocytes) et les granulocytes. Ces trois types d'hémocytes sont séparés en fonction de critères morphologiques basés sur des analyses réalisées aux microscopes photonique et électronique, ainsi qu'au cytomètre en flux sur des critères de taille/complexité (Auffret 1985; Jean Chagot 1989; Soudant *et al.* 2013; Wang *et al.* 2017b). Les cellules de grande taille et complexes dont le cytoplasme contient des granules sont appelées des granulocytes. A l'opposé, les hyalinocytes sont des cellules de petite taille, peu complexes dont le cytoplasme est agranuleux. Les grands hyalinocytes sont de taille et

complexité intermédiaires aux deux autres classes d'hémocytes et peuvent présenter quelques granules au niveau du cytoplasme (Figure 8). Les différents types d'hémocytes semblent être impliqués de manière différente dans la réponse immunitaire. Les hyalinocytes sont suspectés jouer un rôle plus important dans la guérison et le colmatage des blessures alors que les granulocytes ont une activité de phagocytose plus importante et contiennent plus d'enzymes lysosomales (Ruddell 1971; Fisher 1988; Chu 2000). Wang *et al.* (2017b) suggèrent même que les granulocytes sont les principales cellules immunocompétentes de l'huître creuse.



**Figure 8.** Différents types d'hémocytes observés en microscopie électronique à transmission. A. Granulocyte (grossissement :  $\times 10800$ ) B. Grands hyalinocytes (grossissement :  $\times 3700$ ) C. Petits hyalinocytes (grossissement :  $\times 4500$ ), (Jean Chagot 1989).

### 3.1.2. Les facteurs de reconnaissances immunitaires

Comme chez les invertébrés, chez l'huître creuse, le déclenchement des voies de défenses aux niveaux humoral et cellulaire est médié par des facteurs de reconnaissances immunitaires (PRRs). Ils permettent la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux organismes pathogènes (PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns) et transfèrent cette information par le biais de cascades de protéines, afin d'activer une réponse cellulaire et/ou humorale suivant le type d'organisme pathogène reconnu (Guo *et al.* 2015). Un très grand nombre de PRRs sont présents chez *C. gigas*, et leur diversité est importante (Zhang *et al.* 2015). Les principaux PRRs présents chez l'huître creuse sont présentés ci-dessous.

#### 3.1.2.1. Les toll-like receptors

Les « Toll-Like Receptors » (TLRs) sont parmi les PRRs les plus importants. Ils jouent un rôle dans la reconnaissance des organismes pathogènes et l'activation de la réponse immunitaire innée (Guo *et al.* 2015). Chez l'huître creuse, 83 gènes présentant une homologie avec des TLRs ont été identifiés dans le génome (Zhang *et al.* 2015). Ce nombre est bien supérieur au nombre de TLRs trouvé chez d'autres organismes mammifères ou arthropodes. Ce grand nombre de TLRs laisse supposer que l'expansion et la diversification des TLRs

seraient importantes pour l'adaptation de l'huître creuse face à la diversité des organismes pathogènes présents dans le milieu marin (Guo *et al.* 2015).

Au niveau structurel, les TLRs de l'huître creuse présentent des domaines « external leucine rich repeat » (LRR) permettant la reconnaissance et la fixation des PAMPs, et un domaine récepteur « Toll Interleukin-1 » (TIR) agissant avec des adaptateurs immunitaires afin de réguler le signal transductionnel. Le « myeloid differentiation factor 88 » (MyD88) est l'un des adaptateurs activant la voie de signalisation en se couplant avec des TLRs (Renault *et al.* 2011). Cette voie de signalisation interagit également avec d'autres voies et peut éventuellement conduire à une activation de la voie « nuclear factor kappa B » (NFκB) permettant l'activation d'effecteurs immunitaires (He *et al.* 2015).

### 3.1.2.2. Retinoic acid-inducible gene-1 like receptors

Les « retinoic acid-Inducible gene (RIG)-1 like receptors » (RLRs) sont un groupe de PRRs qui reconnaît les acides nucléiques viraux et cible des réponses inflammatoires antivirales. Par l'intermédiaire de l'activation de facteurs comme les « tissue necrosis factor receptor associated factor » 3 et 6 (TRAF 3 et 6), RIG-1 active des facteurs de transcription comme des « Interferon Regulating Factor » (IRFs) et NF-κB. RIG-1 est aussi impliqué dans l'activation de « Fas-associated protein with death domain » (FADD) qui permet une activation de la voie de l'apoptose. Le génome de l'huître creuse code 11 RLRs (He *et al.* 2015). Les récepteurs et la voie RIG-1 semblent hautement conservés chez l'huître creuse.

### 3.1.2.3. Les lectines

Les lectines sont divisées en trois principaux groupes : les type-C (calcium-dépendant), type S (Galectine) et type-P (récepteurs mannose-6-phosphate). Le génome de *C. gigas* comprend 266 gènes de lectine de type C. Chez les mollusques, les lectines joueraient un rôle dans l'opsonisation ou l'agglutination durant la phagocytose par les hémocytes (Guo *et al.* 2015). Les « fibrinogen-related proteins » (FREPs) sont un type particulier de lectine qui contient à minima un domaine fibrinogène. Les FREPs sont essentielles pour la défense de l'hôte et le processus de coagulation. Cependant, leur rôle exact dans l'immunité innée n'est pas encore complètement compris (Hanington et Zhang 2011). Le génome de *C. gigas* comprend 190 FREPs (Zhang *et al.* 2012).

#### 3.1.2.4. Les protéines de reconnaissance des peptidoglycane

Les protéines appelées « peptidoglycan recognition proteins » (PRGPs), sont des PRRs permettant la reconnaissance de peptidoglycane, un composé important de la paroi cellulaire des bactéries (Zhang *et al.* 2007). Il a été mis en évidence l'existence de 9 PGRPs chez *C. gigas* (Zhang *et al.* 2015).

#### 3.1.2.5. Les récepteurs à tumor necrosis factor et interleukine

Les récepteurs appelés « tumor necrosis factors receptor » (TNFR, pouvant fixer des cytokines comme les tumor necrosis factors (TNFs)) et les récepteurs « interleukine 17 receptor » (IL-17R, reconnaissant des IL-17) sont également importants pour la régulation de l'immunité, l'inflammation et l'apoptose (Aggarwal 2003). Les signaux passent ensuite par la voie TNF via les molécules TRAFs impliquées dans la voie TLR et REG-1 et dans la régulation de la voie de l'apoptose (Häcker *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011).

#### 3.1.2.6. G-protein-coupled receptors

Les « G-protein-coupled receptors » (GPCRs), sont une grande famille de récepteurs à 7 domaines transmembranaires. Ils joueraient également un rôle dans la réponse immunitaire de l'huître creuse (Guo et Ford 2016).

#### 3.1.2.7. Les lipopolysaccharides and beta-1,3-glucan-binding protein

Les « lipopolysaccharides and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein » (LGBPs) sont également des récepteurs impliqués dans l'immunité innée, permettant de reconnaître des lipopolysaccharides (LPS) et des  $\beta$ -1,3-glucan ( $\beta$ G), connus pour être des PAMPs (Chen *et al.* 2016b). Deux  $\beta$ GBPs (Cg- $\beta$ GBP-1 et Cg- $\beta$ GBP-2) ont été caractérisées chez *C. gigas*. Leurs structures sont différentes car l'une contient un seul motif de reconnaissance d'intégrine, alors que le second en contient deux, impliquant des fonctions différentes entre les deux gènes. Cg- $\beta$ GBP-1 pourrait jouer un rôle dans les fonctions hématocytaires alors que Cg- $\beta$ GBP-2 semble impliqué dans l'activation de phénoloxydases (Itoh *et al.* 2010a).

### 3.1.2.8. Les scavenger receptors

Les récepteurs appelés « Scavenger receptors » (SR) reconnaissent les lipoprotéines de faible densité et participent à supprimer les macromolécules étrangères. Soixante et onze SR ont été identifiés dans le génome de *C. gigas* (Guo et Ford 2016).


### 3.1.2.9. Opsonisation

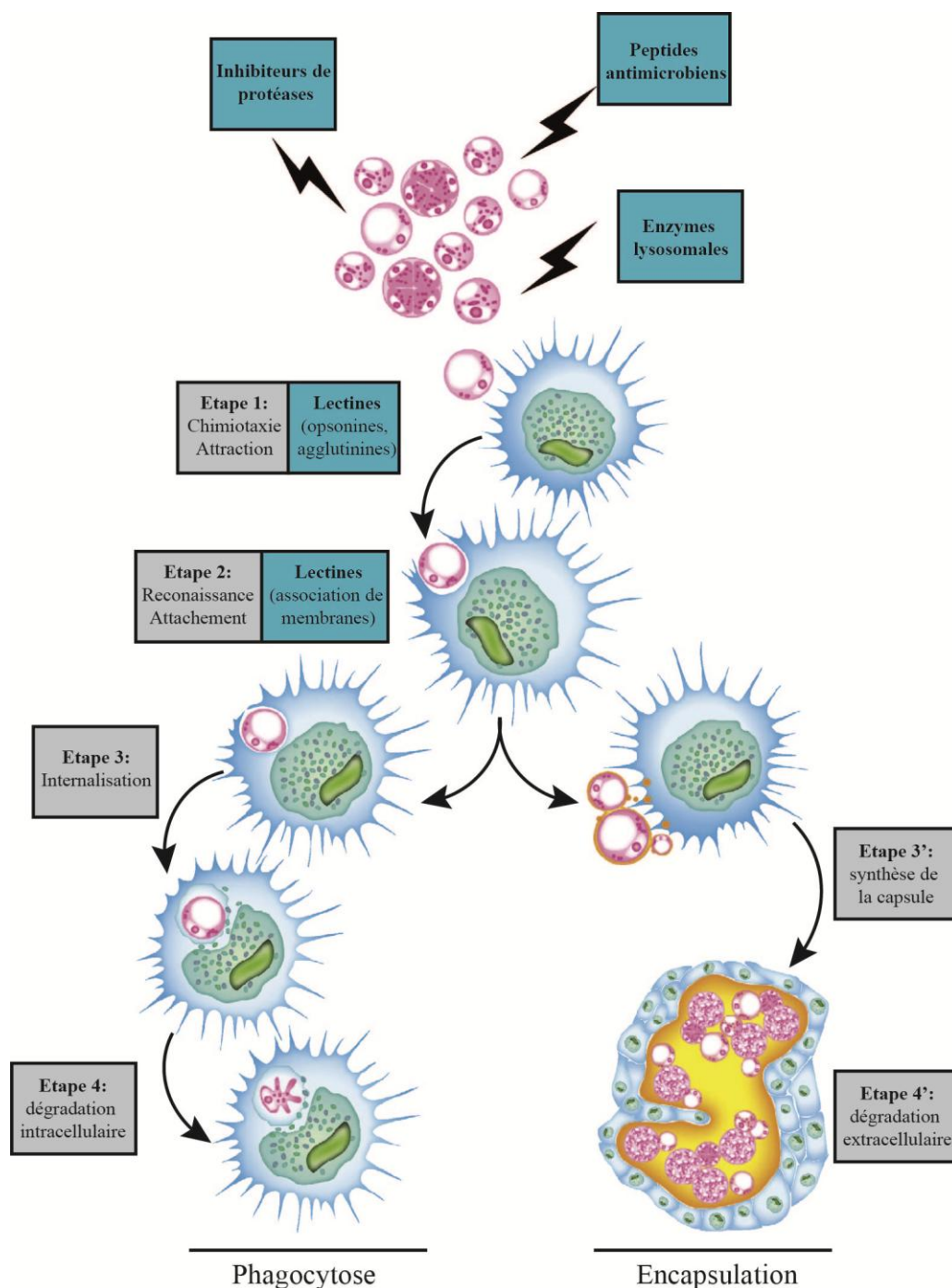
D'autres facteurs de reconnaissance ne sont pas positionnés au niveau des membranes, mais sont présents sous forme dissoute dans l'environnement (hémolymphe et mucus) et peuvent également interagir avec les organismes pathogènes. Ce processus appelé opsonisation correspond à la présence dans l'hémolymphe des bivalves, de protéines qui reconnaissent et se fixent à la surface des organismes pathogènes, facilitant leur internalisation par les hémocytes (Allam et Raftos 2015). Des agglutinines ont été identifiées dans le plasma de l'huître creuse *C. gigas* mettant en évidence une activité opsonique chez cet organisme. Ces agglutinines permettent d'améliorer la prise en charge de bactéries par les hémocytes (Hardy *et al.* 1977). Cette activité opsonique pourrait également jouer sur l'activité de phagocytose des hémocytes (Canesi *et al.* 2002).

## 3.1.3. La défense cellulaire

Une des réponses cellulaires généralement observée est l'infiltration des tissus par les hémocytes. Cette infiltration se traduit par un changement du nombre d'hémocytes présent dans le système circulatoire et dans les tissus. Ceci est dû à une mobilisation différente des hémocytes de différents compartiments vers d'autres, à la production d'hémocytes (hématopoèse), ainsi qu'à la dégradation et la lyse des hémocytes dans les animaux infectés (De Vico et Carella 2012).

Les autres réponses cellulaires impliquent la destruction des organismes pathogènes par deux processus biologiques importants dans le cadre de la défense cellulaire : la phagocytose ou l'encapsulation (Soudant *et al.* 2013).


 La phagocytose est un mécanisme de défense interne présent chez les bivalves (Wootton *et al.* 2003). Ce processus permet d'éliminer une grande variété de particules de petite taille comprenant entre autre les virus, les bactéries, les levures et les algues. Il se décompose en plusieurs étapes (Figure 9):



**Figure 9.** Schéma de la réponse humorale et cellulaire retrouvée chez les mollusques bivalves au cours d'une infection par des micro-organismes (d'après Soudant *et al.* 2013). Carrés bleus : Facteurs humoraux participant à l'élimination des organismes pathogènes. Carrés gris : Etapes de la phagocytose et de l'encapsulation. La phagocytose peut être décomposée en quatre étapes: (1) Chimiotaxie, attraction et migration. (2) Reconnaissance et attachement des organismes pathogènes. Ces deux premières étapes sont associées à la présence et la synthèse de lectines. (3) Internalisation des organismes pathogènes dans un phagosome. (4) Destruction des organismes pathogènes. (3') Si au cours de l'étape 3, l'hémocyte n'arrive pas à phagocyter l'organisme pathogène (principalement à cause de sa taille trop importante), celui-ci est alors encapsulé par plusieurs hémocytes. (4') Les hémocytes dégradent l'organisme pathogène extérieurement en libérant des enzymes lysosomales ou des ROS/RNS.

- 1) L'hémocyte se déplace par chimiotaxie jusqu'à la particule. Les espèces chimiques libérées par les organismes pathogènes attirent et font migrer les hémocytes dans leur direction. Cependant, cette étape n'est pas toujours requise ou impliquée dans la phagocytose (Cheng 2000; Chu 2000).
- 2) L'hémocyte reconnaît la particule comme un élément étranger à l'hôte et s'y attache. La reconnaissance se fait par le biais de récepteurs membranaires capables de reconnaître des motifs présents sur la cellule cible. Chez les mollusques des lectines et des protéines de liaison (LPS) ont été identifiés.
- 3) La particule est internalisée par l'hémocyte par endocytose (Cheng 2000). Le résultat de cette endocytose est la formation d'un phagosome au sein de l'hémocyte. Le phagosome fusionne ensuite avec des lysosomes permettant ainsi la formation d'une structure appelée un phagolysosome.
- 4) La particule est dégradée au sein de l'hémocyte (Soudant *et al.* 2013; Allam et Raftos 2015). Au sein du phagolysosome, le lysosome libère des enzymes hydrolytiques contribuant à la dégradation des particules contenues dans la structure. L'hémocyte produit des espèces réactive de l'oxygène (ROS) et azotées (RNS) pouvant participer à la destruction de ces particules. L'association de ces deux mécanismes permet de tuer les particules contenues dans les phagolysosomes. Une fois dégradées, les particules sont excrétées par exocytose.

L'ensemble des différents types hémocytaires peuvent réaliser la phagocytose, mais les granulocytes sont le type cellulaire ayant l'activité de phagocytose la plus importante (Allam et Raftos 2015). En effet, les granulocytes contiennent des granules (lysosomes) possédant les enzymes hydrolytiques et auraient une rapidité de mobilité cellulaire plus importante que les autres types hémocytaires.

 L'encapsulation est employée dans le cas où la phagocytose ne peut se faire du fait de la taille trop importante des particules (Allam et Raftos 2015; Carella *et al.* 2015). Une capsule constituée d'un grand nombre d'hémocytes entoure alors le corps étranger. Puis un relargage de produits cytotoxiques provoque la mort des éléments contenus dans la capsule (Figure 9) (Loker *et al.* 1982; Dove *et al.* 2004).

### 3.1.4. La défense humorale

La défense humorale correspond à la production de molécules effectrices solubles biologiquement actives, sécrétées par les hémocytes ou d'autres cellules jouant un rôle dans la défense immunitaire. Les multiples facteurs hémolymphatiques tels que les lysines et les peptides antimicrobiens constituent les mécanismes de défense humorale (Riout 2013). Ce mécanisme de défense aboutit à la destruction des organismes pathogènes ou de certaines molécules produites par les agents pathogènes (Guo *et al.* 2015). Une liste non exhaustive de molécules effectrices est présentée ci-dessous :

#### Les peptides et protéines antimicrobiens

Les peptides et protéines antimicrobiens (AMPs) sont des effecteurs anciens de la défense de l'hôte retrouvés chez tous les organismes dans le spectre de l'évolution (Yeaman et Yount 2003). Il existe plusieurs familles d'AMPs identifiées chez l'huître creuse (Schmitt *et al.* 2011) : la famille des defensines (19 variants identifiés chez *C. gigas*), la famille proline-rich AMP (24 variants identifiés chez *C. gigas*) (Schmitt *et al.* 2010) et la famille des protéines bactericidal/permeability-increasing. Ces trois familles présentent une grande diversité d'isoformes. Ces AMPs sont uniquement retrouvés au niveau des cellules ayant un rôle clé dans la défense immunitaire de l'huître creuse, les hémocytes. Les AMPs jouent de multiples rôles dans l'immunité. Ils participent à l'élimination des organismes pathogènes, à l'amélioration de certaines réponses immunitaires innées et exercent des effets immunomodulateurs sélectifs sur l'hôte.

#### Enzymes hydrolytiques et inhibiteurs de protéases

La première activité protéase a été démontrée par Cheng (1983) dans le plasma des bivalves. Cette étude a également mis en évidence que la production et la sécrétion de protéases étaient régulées en condition *in vivo* et *in vitro* au cours d'une infection par des microorganismes à pouvoir pathogène. Récemment, il a été montré que ces sécrétions pouvaient avoir des activités protéolytiques.

Des inhibiteurs de protéases (comme les sérines et cysteines protéases) sont également présents dans les tissus et sécrétions de bivalves. Leurs rôles chez les bivalves restent peu étudiés. Les inhibiteurs de protéases permettraient de protéger l'hôte des protéases produites par les organismes pathogènes. Ils agiraient en limitant le taux de croissance et la prolifération des protéases de l'organisme pathogène ou en facilitant la neutralisation des protéases via les



protéines du système immunitaire de l'hôte (Phillips *et al.* 2004). Les inhibiteurs de protéases permettraient également de réguler les niveaux de protéase de l'hôte au cours d'une exposition à un organisme pathogène (Guo *et al.* 2015).

### Le stress oxydatif

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et azotée (RNS) est également un mécanisme important de lutte contre des macromolécules microbiennes ou un organisme pathogène (Aguirre *et al.* 2005; Winterbourn 2008; Soudant *et al.* 2013; Guo *et al.* 2015; Wang *et al.* 2017a). Dans certains cas, les hémocytes peuvent mettre en place le métabolisme oxydatif, induisant la production de ROS et RNS comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), l'oxyde nitrique (NO•) ou des anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Guo *et al.* 2015; Soudant *et al.* 2013). Le NO• va déclencher une grande quantité de RNS qui agit en synergie avec les ROS, induisant des effets très toxiques sur les microorganismes internalisés (Fang 2004). Il est suggéré que l'huître creuse possède un système complexe de génération et suppression de ROS. La production de ROS et de RNS dans les hémocytes d'huîtres creuses a notamment été démontrée pendant la phagocytose (Arumugan *et al.* 2000; Soudant *et al.* 2013).

### Les lysozymes

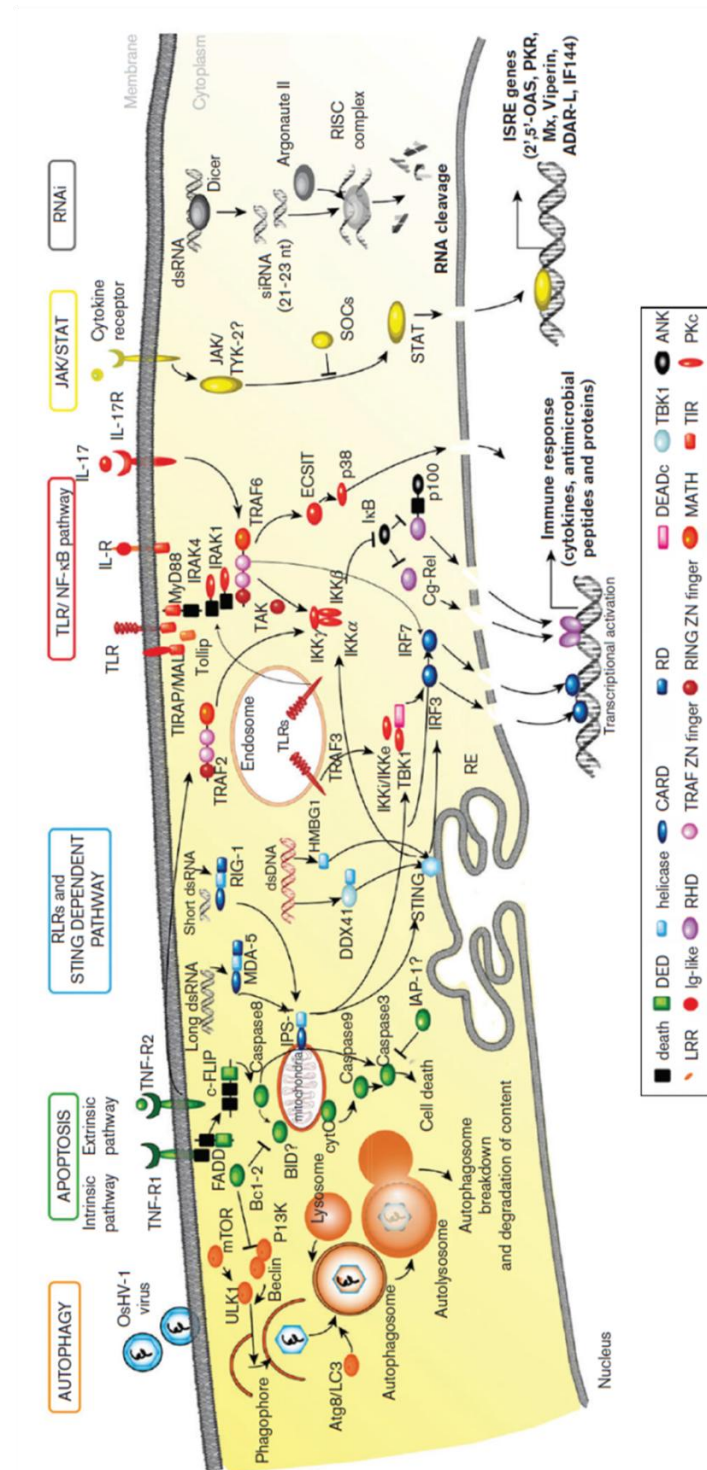
Les lysozymes sont des enzymes cationiques hydrolytiques présentes dans une grande partie du règne animal (des bactéries jusqu'à l'humain) qui jouent un rôle dans la digestion et la défense des bivalves (Schmitt *et al.* 2011; Soudant *et al.* 2013). Plusieurs lysozymes (CGL-1, CGL-2 et CGL-3 et cv-lysozyme 1) ont été identifiés chez les huîtres (Itoh *et al.* 2007; Itoh *et al.* 2010b). Ces enzymes permettent de détruire les bactéries constituant une partie de l'alimentation de *C. gigas* (Birkbeck et McHenery 1982; Guo *et al.* 2015). Leur implication dans la défense face à des organismes pathogènes a également été démontrée chez l'huître creuse. Un lysozyme de *C. gigas*, CGL-1 est différenciellement exprimé dans les hémocytes infectés par le *vibrio* pathogène *V. splendidus* (souche LGP32) comparé à un *vibrio* non pathogène (Lorgeril *et al.* 2011). La diversité des lysozymes chez les bivalves est importante et ces protéines sont principalement exprimées dans le manteau, les branchies et la glande digestive. Elles permettent ainsi la dégradation des particules microbiennes alimentaires et d'avoir une protection immunitaire générique contre les organismes pathogènes (Allam et Raftos 2015).

## Ribonucléases et inhibiteurs

Les ribonucléases ainsi que leurs inhibiteurs pourraient être un mécanisme permettant la destruction d'ARN viraux. En effet, au cours d'une infection par OsHV-1 chez l'huître creuse, une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de ribonucléase est corrélée à une diminution des inhibiteurs de ribonucléases lorsque les récepteurs à ARN RIG-1/MDA5 sont régulés positivement. Il est suggéré que cette voie serait sous le contrôle de différentes autres voies (RIG-1/MDA, TLR et TNF) et de facteurs environnementaux (Guo *et al.* 2015).

### 3.1.5. Le priming immunitaire

Plusieurs d'études suggèrent que le système immunitaire de l'huître creuse pourrait également posséder une forme de mémoire immunitaire (Green et Speck 2018). Celle-ci se traduit par une amélioration de la survie des huîtres creuses observée après une seconde exposition au virus OsHV-1 (Green et Speck 2018). Cependant, les mécanismes de cette mémoire immunitaire sont associés à la mémoire immunitaire innée. Ils ne doivent pas être confondus avec les mécanismes de l'immunité adaptative présents chez les vertébrés. Chez les invertébrés, ces mécanismes ont donc été appelés « priming immunitaire » (Little et Kraaijeveld 2004). Le « priming immunitaire » a été démontré par plusieurs études chez l'huître creuse en utilisant des ARN double ou simple brins de taille variable (300 pb à 8000 pb). Ces derniers ont permis d'améliorer la réponse antivirale chez l'huître creuse face à une infection expérimentale par le virus OsHV-1 (Green et Montagnani 2013; Green *et al.* 2015b; Lafont *et al.* 2017; Pauletto *et al.* 2017). En exposant des huîtres à du poly I:C (molécules mimant un ARN viral double brins), Lafont *et al.* (2017) ont montré que l'huître creuse possédait une mémoire immunitaire innée. Cette réponse serait spécifique d'une réponse antivirale. En effet, des huîtres préalablement exposées ou non à des bactéries inactivées avant de subir une infection par le virus OsHV-1 présentaient des quantités d'ADN viral équivalentes à la fin de l'expérimentation. De plus, une injection serait suffisante pour induire une réponse antivirale efficace pour protéger l'huître creuse d'une infection virale sur une longue période de temps (5 mois après traitement). Des premiers résultats laissent également supposer que le « priming immunitaire » puisse être transmis à la descendance. En effet, chez des larves issues de parents ayant été stimulés par du poly I:C et infectées par OsHV-1, il a été observé une amélioration du taux de survie (Green *et al.* 2016). Cependant, les connaissances des mécanismes moléculaires du « priming immunitaire » chez l'huître creuse sont encore lacunaires et doivent être approfondies.



**Figure 10.** Voies antivirales conservées chez l’huître creuse. Ce schéma a été construit par rapport aux séquences identifiées comme conservées dans le génome de *C. gigas* (Zhang *et al.* 2012). La plupart des interactions entre les composants de ces voies sont déduites de la littérature sur les vertébrés et les insectes, et restent à être élucidées chez les mollusques. Les domaines caractéristiques des protéines sont indiqués ; TIR: Toll/IL1 receptor, Ig: immunoglobulin, DD: death domain, LRR: leucine rich repeat, TM: transmembrane, PKc: protein kinase, RHD: rel homology domain, IPT: immunoglobulin-like fold plexins transcription factors, RING: RING-finger domain, zf-TARF: TRAF type zinc finger, MAT: meprin and TRAF-C homology domain, UBL-TBK1-like: ubiquitin-like domain of human Tbk1 et proteines similaires (Green *et al.* 2015a).

### 3.2. L'immunité antivirale chez *C. gigas* : le cas d'OsHV-1

Peu de données sont disponibles concernant l'immunité antivirale chez les mollusques bivalves (Allam et Raftos 2015). Des études impliquant OsHV-1 et *Crassostrea gigas* mettent principalement l'accent sur la caractérisation de la réponse transcriptionnelle de l'hôte en réponse à l'infection par le virus et sur l'identification de composés antiviraux (Green *et al.* 2014; Renault *et al.* 2011; Segarra *et al.* 2014b; Segarra *et al.* 2014a; Segarra *et al.* 2014c).

Quelques travaux semblent indiquer la présence d'effecteurs antiviraux chez *C. gigas* (Bachère *et al.* 1990; Olicard *et al.* 2005). Green *et al.* (2014) ont montré pour la première fois que la carvotine était une protéine ayant des propriétés antivirales. La première identification de gènes différentiellement exprimés au cours d'une infection expérimentale a été observée sur des hémocytes prélevés à partir d'huîtres ayant préalablement été injectées avec le virus OsHV-1 (Renault *et al.* 2011). Cette étude a aussi permis de caractériser complètement un certain nombre de gènes d'intérêts comme IFI44 (interferon-induced protein 44), MYD88, le glypican et une laccase (Renault *et al.* 2011).

En suivant l'approche de Renault *et al.* (2011), plusieurs études génomiques et protéomiques ont été entreprises pour investiguer les interactions hôtes/organismes pathogènes (Corporeau *et al.* 2014; Green et Montagnani 2013; Jouaux *et al.* 2013; Moreau *et al.* 2015; Segarra *et al.* 2014b; Segarra *et al.* 2014a; Tamayo *et al.* 2014; Morga *et al.* 2017). Segarra *et al.* (2014b; 2014a; 2014c) ont réalisé une double approche transcriptomique (huître/virus) permettant pour la première fois de travailler sur la cinétique de l'expression de gènes viraux en parallèle de l'expression de gènes de l'huître. Pour étudier plus en détail les interactions entre le virus et son hôte, les auteurs ont étudié l'expression de gènes viraux et de l'huître dans des familles présentant des résistances contrastées lors d'une infection par OsHV-1 (Segarra *et al.* 2014c). De plus, la disponibilité de l'ensemble des séquences du génome de l'huître creuse a ouvert de nouvelles possibilités pour étudier les transcriptomes du virus et de l'huître (He *et al.* 2015). Toutes ces études mettent en évidence l'implication de nombreux gènes de l'immunité dans la réponse antivirale. Ces gènes sont impliqués dans des processus tels que la voie interféron-like, l'ARN interférence et la mort cellulaire programmée incluant l'apoptose et l'autophagie (Figure 10).

Ces résultats suggèrent que la réponse antivirale chez les mollusques bivalves présente des similarités avec la réponse antivirale mise en place chez les organismes supérieurs dans sa composante innée.

### 3.2.1. La voie interferon-like

La voie de l'interféron est un mécanisme important pour les vertébrés en réponse à une infection virale (Randall et Goodbourn 2008). En effet, un état antiviral peut être induit au sein de chaque cellule nucléée si les protéines interférons se lient aux récepteurs associés aux kinases JAK. La fixation d'interférons entraîne la phosphorylation des récepteurs permettant la fixation des facteurs de transcription STAT pouvant à leur tour être phosphorylés. Cela provoque la formation de dimères qui vont être transloqués dans le noyau et se fixer sur une séquence présentant les promoteurs des gènes cibles de la voie. Chez l'homme cela conduit à l'activation de centaines « d'interferons stimulated genes » (ISGs). Les produits synthétisés par ces ISGs possèdent de multiples fonctions antivirales permettant entre autre d'inhiber l'entrée du virus au sein de la cellule ou de bloquer la réplication virale (Schneider *et al.* 2014). Chez l'huître creuse, si des homologies ont été identifiées au niveau des domaines de certains gènes de la voie de l'interféron chez l'humain, à ce jour aucun gène présentant des homologies avec des gènes codant pour les interférons eux-mêmes n'a été détecté. Aussi, le terme de voie interféron-like est utilisé chez *C. gigas*.

Dans le génome de l'huître creuse, des ISGs ont été trouvés. La protéine IFI44, un membre de la famille des gènes induits par les interférons (IFN $\alpha/\beta$ ), a été caractérisée chez *C. gigas* (Renault *et al.* 2011). L'IFI44 est surexprimé dans l'hémolymphe d'huîtres juvéniles infectées par le virus OsHV-1 (Renault *et al.* 2011). Une autre protéine antivirale appelée vipérine a été identifiée en réponse à l'infection par OsHV-1 (Green *et al.* 2015b). Les auteurs ont montré que la vipérine de l'huître co-localise avec caveolin-1 et inhibe la réplication du virus de la dengue dans un modèle hétérologue. Une « protease heat-stable » susceptible d'être le facteur induisant la transcription d'ARNm de la vipérine dans les hémocytes a été mise en évidence dans l'hémolymphe provenant d'huîtres ayant été injectées avec du poly I:C. La présence de cette « protease heat-stable » a été associée à une augmentation d'ISGs. L'ensemble de ces résultats supportent l'existence chez les huîtres de systèmes antiviraux présentant des similarités avec la voie de l'interféron dans les vertébrés (Green *et al.* 2015a).

Dans une étude publiée par He *et al.* (2015), quatre gènes appartenant aux TLRs ou TLR-like ont été montrés comme étant significativement plus régulés chez des huîtres creuses ayant été injectées avec OsHV-1. De plus, le principal modulateur de NF- $\kappa$ B, la protéine NEMO, a également été identifiée chez l'huître creuse (Chen *et al.* 2018). Ces résultats suggèrent que la voie TLR/NF- $\kappa$ B serait potentiellement fonctionnelle chez *C. gigas* et qu'elle jouerait un rôle dans la réponse antivirale de l'huître par des régulations complexes (He *et al.* 2015).

### 3.2.2. La voie de l'ARN interference

L'ARN interférence (ARNi) est un processus conservé au cours de l'évolution. Il est utilisé par la cellule pour réguler l'expression endogène des gènes. Chez les invertébrés, les plantes et les champignons, ce processus est aussi un moyen de défense pour éliminer les acides nucléiques indésirables (comme ceux provenant de virus) (Ding 2010). Ce mécanisme est utilisé en génétique inverse car il permet d'étudier la fonction d'un gène. Le complexe « RNA-induced silencing complex » (RISC) est associé à une courte séquence d'ARN, appelée petit ARN interférent (siRNA, small interfering RNA) lui permettant de reconnaître une séquence nucléotidique complémentaire et de s'y fixer afin de cliver l'ARNm ou d'inhiber la traduction, provoquant une inhibition de l'expression du gène concerné.

Chez l'huître creuse, des gènes impliqués dans la voie de l'ARNi ont été identifiés (Zhang *et al.* 2012; Green et Speck 2018; Green *et al.* 2015a). La présence de Dicer, de la sous unité du complexe de chargement RISC (TRBP, RISC loading complex subunit) et de deux protéines Argonaute (AGO-2) a été démontrée. De plus, cette voie est connue pour être fonctionnelle chez les mollusques (Owens et Malham 2015).

L'extinction de l'expression de plusieurs gènes a déjà pu être réalisée avec succès chez *C. gigas* par l'utilisation d'une approche par ARNi. La première étude publiée par Fabioux *et al.* (2009) a mis en évidence la possibilité d'utiliser une approche par ARNi chez les bivalves en démontrant une diminution de l'expression des ARNm et de la protéine d'un gène appelé vasa, impliqué dans le développement de la lignée germinale chez *C. gigas*. Li *et al.* (2016) ont publié la première étude dans laquelle l'ARNi est utilisé pour montrer l'implication d'un gène (VDAC2) dans la réponse à un organisme pathogène (OsHV-1) au cours d'une infection chez un mollusque bivalve (*C. gigas*).

L'importance de cette voie dans la défense antivirale dans les cellules de mollusques n'est pas encore connue. Cependant, Green et Speck (2018) supposent que l'ARNi jouerait un rôle de faible envergure dans la défense antivirale de l'huître creuse. L'expression du gène Dicer et des deux gènes AGO-2 n'est pas régulée au cours d'une infection par le virus OsHV-1 $\mu$ Var chez des huîtres creuses au stade naissain (He *et al.* 2015).

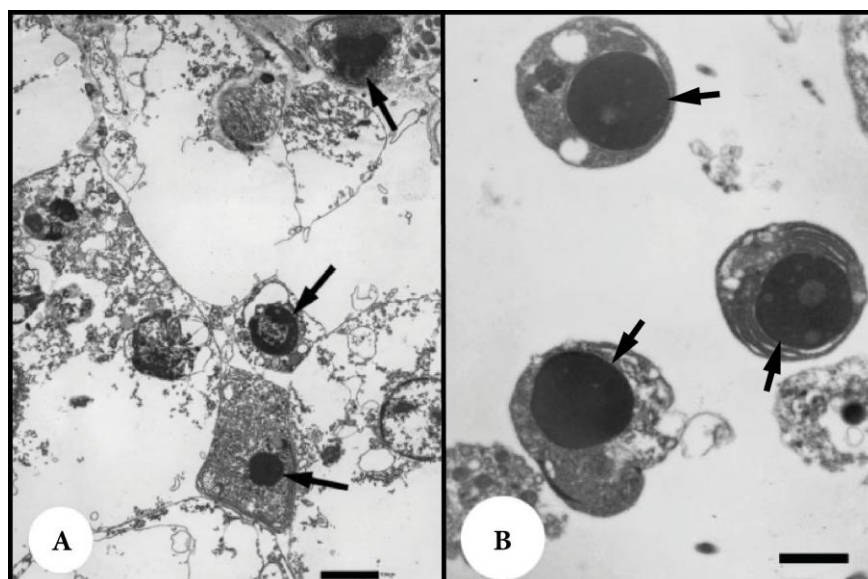
### 3.2.3. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée (programmed cell death, PCD) jouant un rôle dans de nombreuses fonctions au niveau cellulaire. Cette voie est connue pour

être impliquée en réponse à des infections virales (Thomson 2001). Elle contribue à limiter la réplication virale, la synthèse de protéines dans les cellules infectées par le virus et à empêcher la dissémination du virus aux cellules saines.

Le séquençage du génome de l'huître creuse a permis d'observer que l'apoptose est un mécanisme conservé chez *C. gigas*. Le nombre d'inhibiteurs de l'apoptose identifié dans le génome est considérable (n=49) (Zhang *et al.* 2012). Le génome d'OsHV-1 comprend également plusieurs inhibiteurs d'apoptose (Davison *et al.* 2005).

Chez l'huître creuse, des premiers travaux réalisés en microscopie électronique à transmission ont suggéré une implication de l'apoptose au cours d'une infection par le virus OsHV-1. Des caractéristiques morphologiques spécifiques de l'apoptose avaient pu être observées sein de cellules fibroblastiques et hémocytaires de larves d'huîtres creuses infectées par le virus OsHV-1 (Figure 11) (Renault *et al.* 2000).



**Figure 11.** Modifications ultrastructurales associées à l'apoptose observées chez *C. gigas* au stade naissain affecté par le virus OsHV-1 dans A. le tissu conjonctif du manteau et B. les hémocytes (flèches : noyaux condensés, marginalisation de la chromatine). Echelle = 2  $\mu$ m. (D'après Renault *et al.* 2000).

Récemment, des études utilisant des approches moléculaires ont renforcés cette hypothèse. Au cours de l'infection virale, une protéine inhibitrice de l'apoptose (IAP) du virus OsHV-1, l'ORF 87, a été détectée à différents temps et dans plusieurs tissus de l'huître creuse notamment, au niveau des noyaux des cellules des tissus conjonctifs (Martenot *et al.* 2016; Segarra *et al.* 2016). Les auteurs suggèrent une possible expression de cet IAP en réponse à l'activation de l'apoptose par *C. gigas*.

Cependant, des approches transcriptomiques ayant étudiées l'expression de certains IAP de *C. gigas* en réponse à une infection par le virus suggèrent l'existence d'un phénomène anti apoptotique important chez l'huître creuse. En effet, une régulation positive d'un grand nombre d'IAP au cours de l'infection virale est observée au sein de *C. gigas* au stade naissant (Segarra *et al.* 2014c; He *et al.* 2015; Martenot *et al.* 2017). De plus, une corrélation positive a été observée entre le niveau de transcrits d'un IAP et les quantités d'ADN viral (Segarra *et al.* 2014c). Cependant, l'origine de ce phénomène anti-apoptotique n'est pas élucidée à ce jour. Certains virus sont connus pour moduler l'apoptose chez leur hôte afin de faciliter leur prolifération, ce pourrait être le cas du virus OsHV-1 (Segarra *et al.* 2014c; He *et al.* 2015). En réponse à l'infection virale, l'huître creuse pourrait également moduler cette voie. La régulation de l'apoptose est complexe et il existe probablement une balance entre les facteurs pro et anti apoptotiques (Jenner et Young 2005; Martenot *et al.* 2017).

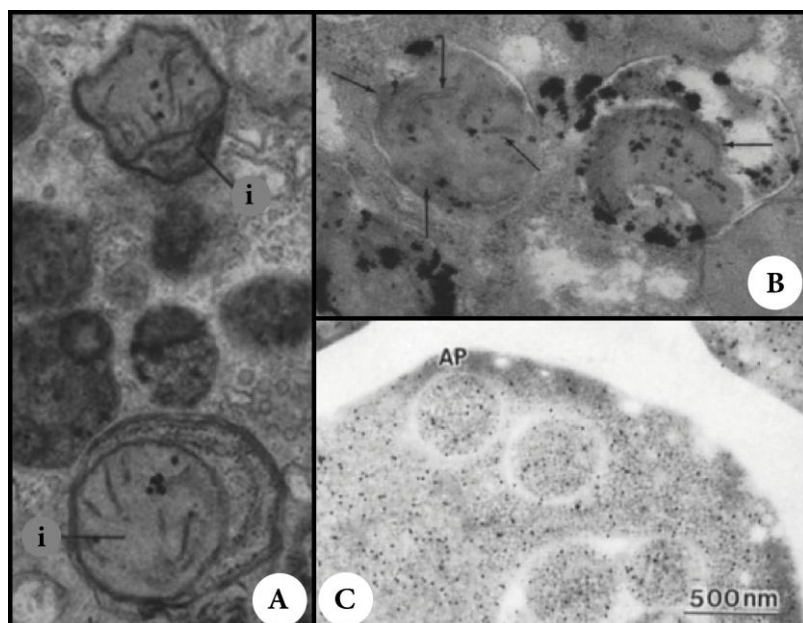
## 4. L'autophagie

### 4.1. Généralités

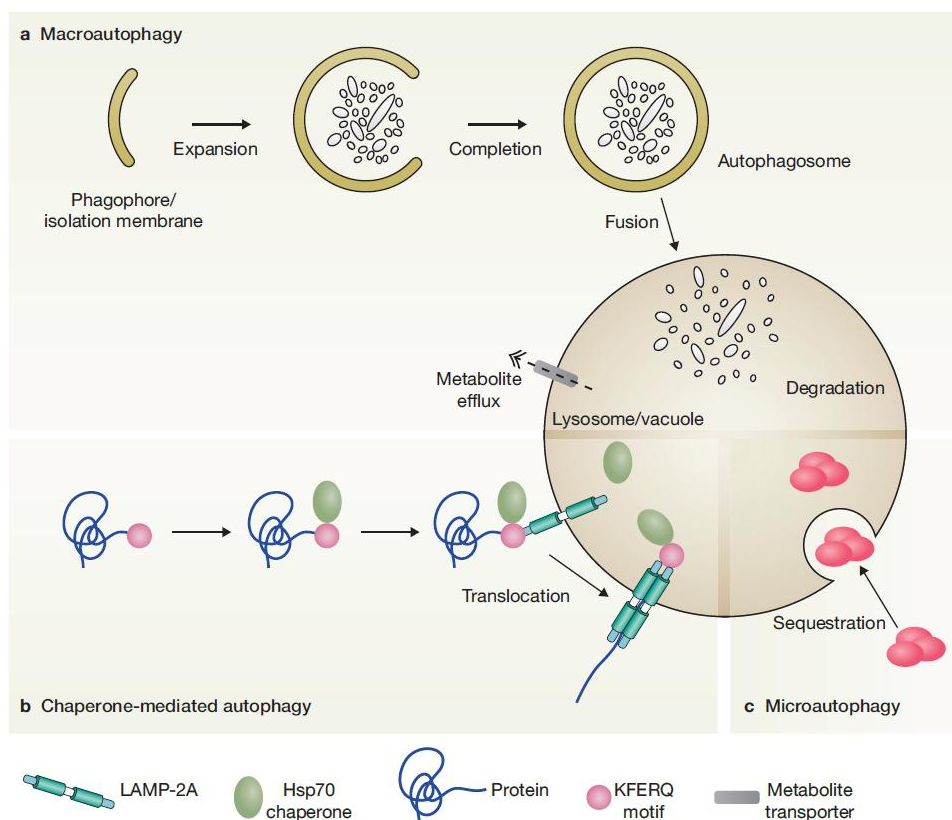
#### 4.1.1. Historique

La voie de l'autophagie a été premièrement décrite dans les années 50 chez les mammifères (Levine et Klionsky, 2017). Le terme autophagie, dérive du suffixe « phagy » signifiant manger et du préfixe « auto » signifiant soi-même en grec (Levine et Klionsky 2004). L'autophagie a été définie en 1963 par de Duve suite à l'observation en microscopie électronique de structures contenant des composés cytoplasmiques dégradés (incluant des mitochondries, des ribosomes et des membranes du réticulum endoplasmique) au sein d'une fraction enrichie en lysosomes issue d'un foie de rat (Novikoff *et al.* 1956; de Duve 1963). L'autophagie a ensuite été décrite et observée chez des plantes et d'autres animaux (Figure 12) (Matile 1978; Baba *et al.* 1994; Baba *et al.* 1995). Puis, les travaux de recherche menés sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans les années 1990, ont conduit à la découverte des gènes de la voie de l'autophagie. Entre 1996 et 2000, un nombre important de gènes impliqués dans les différentes étapes de la voie de l'autophagie ont été identifiés chez plusieurs espèces de levures (Kametaka *et al.* 1996; Schlumpberger *et al.* 1997; Mizushima *et al.* 1998; Lang *et al.* 1998; Yuan *et al.* 1999; Kirisako *et al.* 1999; Tanida *et al.* 1999). Cette situation a conduit à une multiplication du nombre de dénominations utilisées pour désigner les gènes de la voie de l'autophagie chez les différentes espèces. La création d'un





**Figure 12.** Vacuoles autophagiques observées en microscopie électronique à transmission. A. Autophagosomes observés dans un foie de rat (i) contenant du réticulum endoplasmique rugueux et une mitochondrie (grossissement :  $\times 26000$ ). (Ashford et Porter 1962; Eskelinen *et al.* 2011) B. Autolysosomes, observés dans un foie de rat, contenant des mitochondries partiellement dégradées et présentant une activité phosphatase acide (dépôts noirs) démontrant qu'une fusion avec un lysosome a eu lieu. Flèches : crêtes mitochondriales (grossissement :  $\times 43000$ ). (Novikoff et Essner 1962; Eskelinen *et al.* 2011) C. Autophagosome (AP) observé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant des enzymes cytosoliques (Baba *et al.* 1994).



**Figure 13.** Différents types d'autophagie. a. la macro-autophagie, b. l'autophagie médiée par les chaperonnes et c. la micro-autophagie (Boya *et al.* 2013).

système unifié de nomenclature utilisant le nom « autophagy genes » aussi appelé *ATG* (autophagy related genes) a permis d'unifier la dénomination de chacun des gènes identifiés au sein des différents organismes (Ohsumi 2014). En 2016, le prix Nobel de médecine a été décerné à Yoshinori Ohsumi pour la découverte des mécanismes de la voie de l'autophagie (NobelPrize.org 2016).

Au début des années 2000, ces gènes de la voie de l'autophagie ont été identifiés chez les mammifères comme les bovins, la souris et l'humain. Ces recherches ont mis en évidence la conservation des gènes de l'autophagie d'un point de vue fonctionnel au cours de l'évolution des métazoaires (Liang *et al.* 1999; Levine et Klionsky 2017). L'identification de ces gènes a également permis l'utilisation de la génétique inverse sur un nombre important d'organismes modèles, afin d'approfondir les connaissances concernant les fonctions associées à la voie de l'autophagie dans divers processus biologiques (Qu *et al.* 2003; Meléndez *et al.* 2003; Kuma *et al.* 2004; Nakagawa *et al.* 2004).




#### **4.1.2. Les fonctions de la voie de l'autophagie**

La voie de l'autophagie joue un rôle important dans l'homéostasie de la cellule. Elle permet de dégrader une partie du matériel intracellulaire pour assurer un renouvellement des composés de la cellule contrôlant ainsi la qualité et la quantité de la biomasse intracellulaire (Klionsky et Emr 2000). Cette voie permet entre autre de supprimer le surplus d'organelles ou celles qui sont endommagées. Elle maintient un recyclage des protéines ou d'autres macromolécules, soit pour apporter des nutriments en cas de période de carence en aliments, soit pour débarrasser la cellule d'agrégats de protéines.

Cependant, ce mécanisme joue également d'autres rôles impliqués dans plusieurs processus cellulaires, comme l'anti-vieillesse, la mort cellulaire, la lutte contre le cancer (supprime ou limite la formation de tumeurs), la réponse adaptative face à un jeûne, la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire (Levine et Kroemer 2008; Mizushima et Levine 2010; Mizushima 2007). Ce mécanisme limite également la réplication et/ou l'infection de différents organismes pathogènes viraux, bactériens et protozoaires (Deretic 2006; Schmid et Münz 2007).

#### **4.1.3. Les différents types d'autophagie**

Il existe trois principaux types d'autophagie (Figure 13) (Glick *et al.* 2010; Mizushima *et al.* 2011):

-  L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes : les éléments à dégrader situés dans le cytoplasme sont directement transloqués à l'aide de protéines chaperonnes à travers la membrane du lysosome pour être dégradés. Toutes les protéines à dégrader par le biais de ce processus possèdent dans leur séquence le motif KFERQ. Ce motif est reconnu par des protéines chaperonnes (comme les Hsp-70) qui transportent la protéine à dégrader à proximité de la membrane du lysosome puis assiste son dépliage. Une fois dépliée, la protéine s'accroche sur l'un des récepteurs membranaires du lysosome appelé « membrane receptor lysosomal-associated membrane protein » (LAMP-2A). Ce récepteur se multimérise et permet ensuite la translocation de la protéine dépliée au sein du lysosome où elle va être dégradée (Parzych et Klionsky 2014).
-  La micro-autophagie : cette forme d'autophagie correspond à l'internalisation par invagination de la membrane du lysosome des composés à dégrader.
-  La macro-autophagie (plus communément appelée autophagie) : au cours de ce processus, des portions de cytoplasme sont séquestrées au sein d'une vacuole à double membrane appelée un autophagosome. Suite à la fermeture de la double membrane de l'autophagosome, le cytosol et les organelles contenus sont délivrés aux lysosomes pour être dégradés (Deretic 2006). La macro-autophagie est un mécanisme participant à la défense contre les organismes pathogènes (Deretic 2011; Valdor et Macian 2012; Yordy et Iwasaki 2011; Schmid et Münz 2005).

#### 4.1.4. L'autophagie selective

La voie de l'autophagie peut être sélective, c'est-à-dire que sous certaines conditions spécifiques, les autophagosomes peuvent séquestrer et dégrader certains composés cellulaires spécifiques comme les mitochondries (la mitophagie), le réticulum endoplasmique (la réticulophagie), les ribosomes (la ribophagie), les organismes pathogènes comme les bactéries (xénophagie) et les virus (virophagie) (Joubert et Albert 2013). Les protéines permettant de réguler certaines voies comme l'inflammasome (complexe protéique oligomérique responsable de l'activation des processus inflammatoires) sont également régulées par autophagie sélective. La reconnaissance spécifique des composés à dégrader repose sur la présence de récepteurs spécifiques comme p62/SQSTM1 et NBR1 (Johansen et Lamark 2011; Reggiori *et al.* 2012; Klionsky *et al.* 2016). L'autophagie médiée par les

protéines chaperonnes est une forme d'autophagie uniquement sélective, tandis que la micro-autophagie et la macro-autophagie peuvent être sélective ou non.

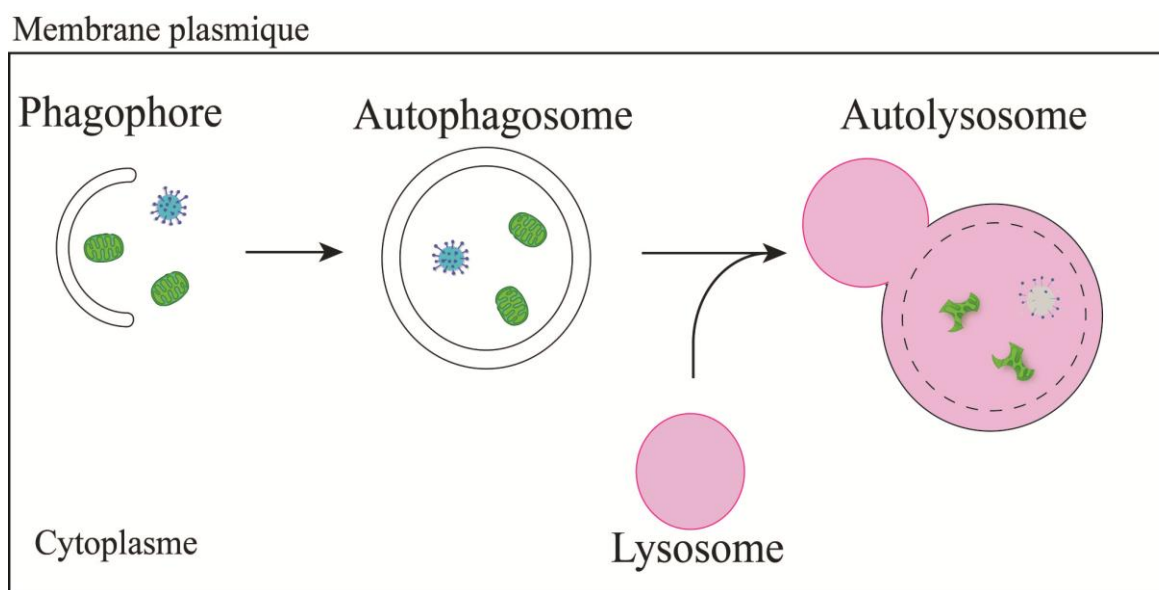
#### 4.1.5. L'autophagie au niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, la voie de l'autophagie se décompose en trois étapes distinctes (Deretic 2006) (Figure 14).

1– Une phase d'initiation : elle correspond à la formation du phagophore par l'association de membranes d'origines inconnues. Des études suggèrent qu'elles seraient originaires du réticulum endoplasmique.

2– Une phase d'élongation : la double membrane se referme autour des composés cytosoliques à dégrader. La structure formée est appelée un autophagosome.

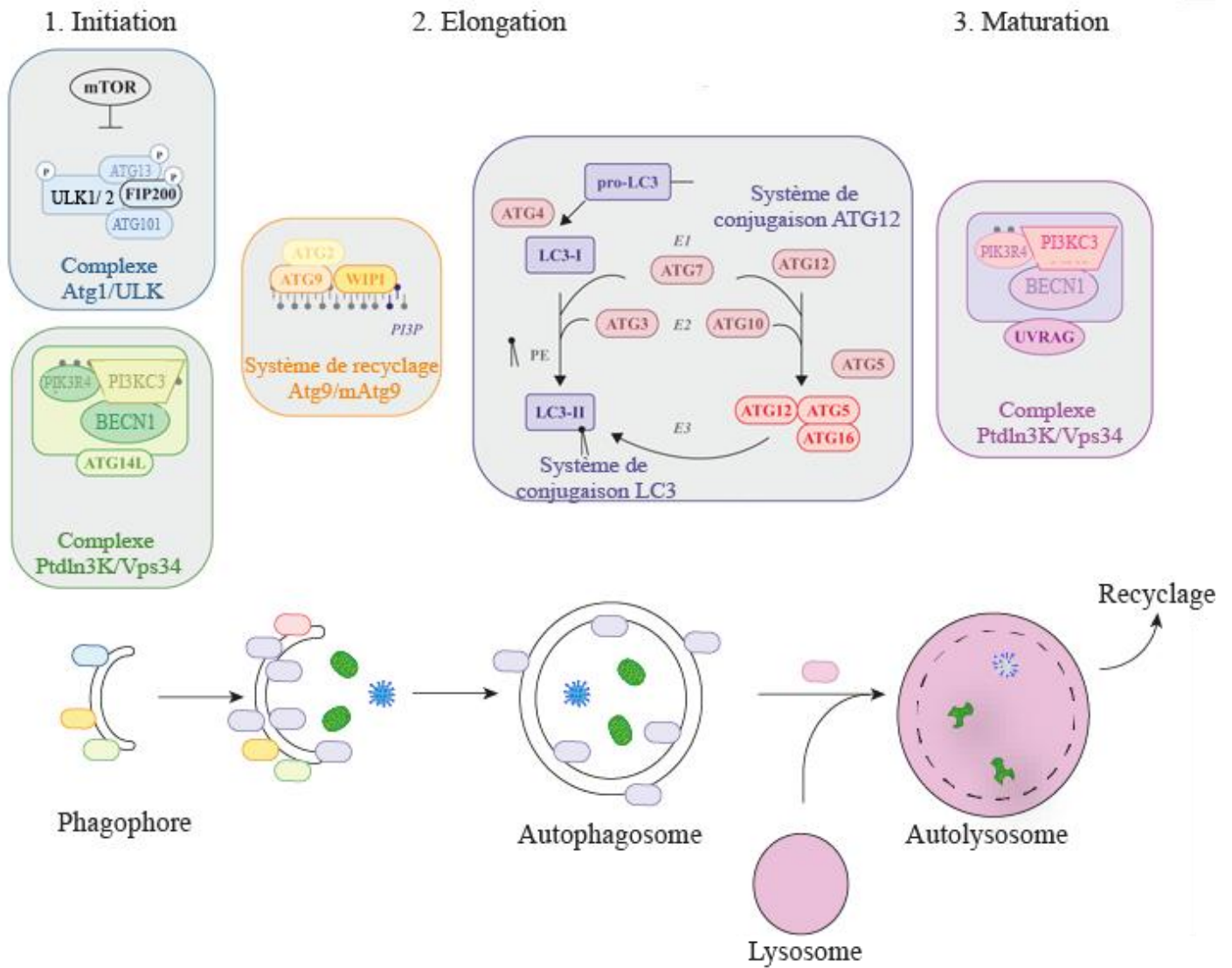
3– Une phase de maturation : cette étape finale correspond à la fusion entre l'autophagosome et des lysosomes entraînant la dégradation du contenu de l'autophagosome. La structure formée est appelée un autolysosome.



**Figure 14.** Mécanisme cellulaire de la voie de l'autophagie chez les mammifères (d'après Klionsky *et al.* 2016).

#### 4.1.6. Mécanismes moléculaires de l'autophagie

Les étapes du fonctionnement moléculaire de la voie de l'autophagie ont été décrites dans un premier temps chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* au début des années 1990 (Ohsumi 2014). Des homologues des protéines Atg (autophagy related genes) de la levure ont par la suite été identifiés chez les mammifères. Cependant, peu de similarité ont été trouvées entre



**Figure 15.** Fonctionnement moléculaire de la voie de l'autophagie chez les mammifères (d'après Daussy et Espert 2016).

les séquences en acides-aminés des protéines homologues (Ohsumi 2014). Ces découvertes démontrent que la majorité des ATGs sont conservés chez les eucaryotes (Figure 15).

#### 4.1.6.1. La phase d'initiation

En réponse à différents stimuli et stress, comme la présence d'organismes pathogènes ou une période de jeûne, la voie de l'autophagie est initiée grâce à deux complexes : Atg1/unc-51-like kinase (ULK) et class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIn3K). La phase d'initiation est régulée par le complexe Atg1/ULK. Chez la levure, il est constitué des protéines Atg1-Atg13-Atg17. Chez les mammifères, il existe deux homologues d'Atg1, appelés ULK1 et ULK2 et un homologue d'Atg17 appelé FIP200. Le complexe contient également la protéine ATG101 permettant d'accrocher et de stabiliser ATG13 au complexe ULK1/2-ATG13-FIP200. Le complexe ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101 est contrôlé par la protéine kinase mTOR dont l'activité est elle-même régulée par plusieurs facteurs comprenant entre autre les niveaux d'acides aminés et de glucose au sein de la cellule (Jung *et al.* 2010; Galluzzi *et al.* 2014; Meijer *et al.* 2015). Le complexe ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101 est stable quelque soit le statut nutritionnel de la cellule. En présence d'acides aminés, mTOR se fixe sur le complexe ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101 et phosphoryle ULK1/2 et ATG13 entraînant l'inactivation du complexe Atg1/ULK. Dans le cas inverse, mTOR est dissocié du complexe ULK1/2-ATG13-FIP200-ATG101, provoquant une déphosphorylation d'ATG13 et d'ULK1/2 qui induisent à leur tour la phosphorylation de FIP200 et d'ATG13 et provoquent une activation de l'autophagie.

Le complexe PtdIn3K joue également un rôle important dans l'initiation de l'autophagie car il permet la nucléation et l'assemblage de la membrane initiale du phagophore. Le complexe est chargé de produire du PI3P (Phosphatidyl-inositol 3 phosphatase) qui permet le recrutement des protéines de liaisons du PI3P incluant WIPI1 et ATG14 (Daussy et Espert 2016). Ce complexe est composé de plusieurs protéines: PI3KC3, PIK3R4 et BECN1. La régulation de ce complexe se fait principalement par le biais de la protéine BECN1. En effet, lorsque les conditions nutritives sont abondantes, la voie de l'autophagie est inhibée par la protéine antiapoptotique BCL-2. BCL-2 s'accroche à BECN1 et séquestre cette protéine. Dans le cas d'une carence nutritive, BCL-2 se dissocie de BECN1. BECN1 peut alors se fixer sur PI3KC3, permettant le recrutement de protéines effectrices comme DFCP1 et WIPI, initiant les étapes de formation des autophagosomes. D'autres molécules sont nécessaires pour induire l'activité du complexe. C'est notamment le cas d'ATG14L qui interagit avec BECN1.

La protéine UVRAG peut également se lier à BECN1. UVRAG est capable de se lier à la protéine BIF-1 et d'augmenter l'activité du complexe.

#### 4.1.6.1. La phase d'élongation

La phase d'élongation est contrôlée par deux principaux systèmes de conjugaison. Le premier système de conjugaison est composé des protéines ATG12-ATG5-ATG16L1. ATG12 est activée par ATG7, puis transférée sur ATG10 pour finalement se lier avec ATG5, ce complexe recrute et associe ATG16L. Une fois formé, il s'associe à la membrane extérieure du phagophore. Ce complexe interagit par la suite avec une enzyme du second complexe de conjugaison dépendant de LC3. Ce second complexe est constitué principalement de la protéine MAP1LC3. Sous forme libre dans le cytoplasme, elle est dénommée MAP1LC3-I. Lors de l'induction de la voie de l'autophagie, les protéines ATG7, ATG3 et le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 permettent la liaison d'une phosphatidylethanolamine (PE) à MAP1LC3-I formant la protéine MAP1LC3-II. Grâce à cette PE la protéine MAP1LC3-II pourra s'ancrer dans la membrane extérieure et intérieure des autophagosomes. MAP1LC3-II est la seule protéine qui reste séquestrée dans les autophagosomes après leur formation. Cette protéine est un marqueur clé de la voie de l'autophagie.

Par ailleurs, une protéine appelée ATG9 est indispensable à l'expansion du phagophore. En effet, ATG9 assumerait le transport des lipides jusqu'au site d'assemblage du phagophore. Cette protéine réaliserait des trajets cycliques entre le phagopore et les sites périphériques. Lorsque l'autophagie est induite, ATG9 est recrutée au niveau du phagophore, sinon elle est située au niveau du réseau trans-Golgi. La réalisation de ces allers-retours entre les différents sites est dépendante de l'activité des complexes Atg1/ULK et PtdIn3K. Il s'agit de la seule protéine transmembranaire chez les autophagosomes.

#### 4.1.6.2. La phase de maturation

La dernière étape de l'autophagie est la maturation. Au cours de cette étape, la protéine UVRAG se lie avec le complexe BECN1-PI3KC3-PIK3R4 au niveau de la protéine BECN1. Le nouveau complexe formé BECN1-PI3KC3-PIK3R4-UVRAG permet d'augmenter la maturation des autophagosomes. UVRAG est également capable de se lier à la protéine RUBICON. Dans ce cas, le complexe formé inhibe la maturation des autophagosomes.

#### 4.1.7. L'autophagie un mécanisme impliqué dans la survie et la mort cellulaire

Dans la littérature, certains auteurs ont émis l'hypothèse que le choix de la cellule de survivre ou de mourir pourrait largement être influencé par la voie de l'autophagie (Fitzwalter et Thorburn 2015). En effet, la voie de l'autophagie, qui est souvent présentée comme un mécanisme lié à la survie de la cellule est également considéré comme une forme de mort cellulaire programmée. Cette voie interagirait et influencerait les autres types de mort cellulaire (Fitzwalter et Thorburn 2015; Liu et Levine 2015).

Les mécanismes de l'apoptose et de l'autophagie semblent être interconnectés, puisque certains ATG et d'autres protéines régulent l'autophagie mais aussi l'apoptose. La protéine UVRAG prend part à la formation du complexe PtdIn3K et régule aussi l'activation de BAX impliqué dans le contrôle de la voie intrinsèque de l'apoptose au niveau de la membrane mitochondriale (Yin *et al.* 2011). Certains régulateurs de la voie de l'apoptose contrôlent aussi l'autophagie. Plusieurs membres de la famille BCL (B-cell lymphoma) comme BCL-2 et BCL-x sont impliqués dans la régulation de la voie de l'apoptose, mais peuvent également inhiber la voie de l'autophagie (Pattingre *et al.* 2005).

En inhibant la voie de l'apoptose, la voie de l'autophagie peut protéger la cellule de la mort cellulaire. Dans certaines lignées cellulaires, l'autophagie dégrade la caspase-8. Cette caspase peut alors inhiber les récepteurs permettant l'induction de la voie de l'apoptose appelés TRAIL (tumor necrosis related apoptosis inducing ligand) (Hou *et al.* 2010).

Cependant, dans certains cas où l'apoptose canonique (le mécanisme préférentiel de mort cellulaire) ne peut pas être activée, la voie de l'autophagie serait nécessaire afin de promouvoir la mort cellulaire. Elle peut agir de deux manières: (1) directe : la voie de l'autophagie agirait par le biais de son mécanisme moléculaire sur les différentes autres formes de mort cellulaire programmée. (2) Indirecte : la voie de l'autophagie grâce à sa machinerie cellulaire pourrait dégrader certains composés dont l'accumulation peut conduire à l'activation du processus de mort cellulaire.

Un nombre important d'études font état qu'il reste complexe de déterminer les interactions et les mécanismes moléculaires par lesquels la voie de l'autophagie inhibe ou active la voie de l'apoptose (Yonekawa et Thorburn 2013; Fitzwalter et Thorburn 2015). La complexité des interactions et des mécanismes moléculaires entre ces deux voies démontre la nécessité d'approfondir leurs rôles complémentaires.



## 4.2. Autophagie et infections virales

### 4.2.1. Le rôle antiviral de l'autophagie

La première démonstration du rôle antiviral de l'autophagie a été observée entre la plante *Nicotiana benthamiana* et le virus de la mosaïque du tabac (TMV). La réplication du TMV augmente de manière importante jusqu'à provoquer la mort des cellules si beclin 1 n'est pas fonctionnelle (Liu *et al.* 2005). D'autres études ont mis en évidence le rôle antiviral de l'autophagie chez des organismes vertébrés et invertébrés (Carré-Mlouka *et al.* 2007; Orvedahl *et al.* 2010; Shelly *et al.* 2009; Yakoub et Shukla 2015; Joubert *et al.* 2012).

#### 4.2.1.1. Chez les vertébrés

Chez les vertébrés, un nombre important d'études ont mis en évidence le rôle antiviral de la voie de l'autophagie en réponse à des virus à ADN (comme le virus herpès simplex 1) et à ARN (comme le virus du chikungunya et le virus sindbis) (Yakoub et Shukla 2015; Joubert *et al.* 2012; Orvedahl *et al.* 2010).

Dans certains cas, le rôle antiviral de la voie de l'autophagie consiste à internaliser et dégrader des protéines virales, à l'aide d'un récepteur autophagique. La protéine sequestosome 1 (p62/SQSTM1) est le récepteur autophagique le plus étudié (Daussy et Espert 2016). Cette protéine a la capacité de reconnaître les protéines virales et de les adresser à la voie de l'autophagie pour dégradation (Lussignol et Esclatine 2017). Ce mécanisme a été observé chez plusieurs virus (Orvedahl *et al.* 2010; Judith *et al.* 2013; Sagnier *et al.* 2015). Lors de l'infection du système nerveux central de la souris par le virus Sindbis (SIN), la voie de l'autophagie joue un rôle protecteur en induisant l'élimination des protéines virales par la protéine SQSTM1 (Orvedahl *et al.* 2010). Cette protéine interagit avec la capsid du SIN et l'adresse directement au niveau des autophagosomes pour permettre sa dégradation via le processus autophagique. De la même manière, la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est reconnue par la protéine SQSTM1 dans les lymphocytes T CD4+ et adressée à la voie de l'autophagie pour être dégradée (Sagnier *et al.* 2015). Ce phénomène a également été observé pour le virus du chikungunya (Judith *et al.* 2013).

Dans de plus rares cas, le rôle antiviral de la voie de l'autophagie consiste à internaliser et dégrader les particules virales dans leur intégralité (Lussignol et Esclatine 2017; Joubert et Albert 2013). Cependant, peu d'études mettent en évidence ce processus. La première dégradation de particules virales au sein d'autophagosomes a été observée dans des

fibroblastes embryonnaires de souris infectés par le virus herpes simplex 1 (HSV-1) (Tallóczy *et al.* 2006).

#### 4.2.1.2. Chez les invertébrés

Plusieurs études ont montré le fonctionnement ou l'activation de la voie de l'autophagie en réponse à une infection virale chez les crustacés (Chen *et al.* 2016a) et les insectes (Carré-Mlouka *et al.* 2007; Shelly *et al.* 2009). L'autophagie joue un rôle important dans la défense antivirale de la drosophile contre le Vesicular Stomatitis Virus (VSV) (Shelly *et al.* 2009). Une induction de la voie de l'autophagie chez la mouche en condition *in vivo* conduit à une diminution de la réplication virale, alors qu'une répression de l'autophagie conduit à une augmentation de la réplication virale pouvant aller jusqu'à provoquer la mort de l'animal. Chez les mollusques bivalves, une première étude menée en conditions expérimentales sur l'huître creuse, *C. gigas*, a montré que l'autophagie jouerait un rôle protecteur lors d'une infection par le virus OsHV-1 (Moreau *et al.* 2015).

#### 4.2.2. Des virus échappent à l'autophagie

Plusieurs virus sont capables d'échapper à la voie de l'autophagie afin de contrer les défenses immunitaires de l'hôte. Certains virus utilisent des protéines anti-autophagie afin de bloquer la voie de l'autophagie (Kudchodkar et Levine 2009; Lussignol et Esclatine 2017).

Plusieurs virus ciblent notamment l'induction de la voie de l'autophagie au niveau de la protéine BECN1, laissant supposer qu'il s'agit d'un régulateur important dans la réponse antivirale (Jackson 2015). L' $\alpha$ -herpèsvirus herpès simplex virus 1 (HSV-1) provoque une inhibition de l'autophagie grâce à la protéine appelée ICP-34.5. Cette protéine virale est capable de se fixer à la protéine BECN1, connue pour induire la voie de l'autophagie lorsqu'elle est activée (Figure 16) (Orvedahl *et al.* 2007). Un autre herpèsvirus humain, le Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) produit un homologue de BCL-2 capable de se lier à BECN1 et d'inhiber la voie de l'autophagie (Pattingre *et al.* 2005).

Chez les herpèsvirus, l'activation de plusieurs protéines anti-autophagie peut intervenir à différents niveaux du processus. Au cours d'une infection par le HSV-1, la protéine virale Us11 est exprimée plus tardivement que la protéine ICP34.5. Cette protéine interagirait avec PKR pour inhiber directement la voie de l'autophagie (Lussignol *et al.* 2013) (Figure 16). Certains virus ciblent la phase de maturation de la voie de l'autophagie. Par exemple, le VIH et le virus de la grippe interagissent au niveau de la protéine BECN1, respectivement via les

protéines virales Nef (Kyei *et al.* 2009) et M2 (Gannagé *et al.* 2009) (Figure 16). Ces interactions modifient la fonction du complexe BECN1 formé avec PI3KC3 et UVRAG, permettant la maturation des autophagosomes.

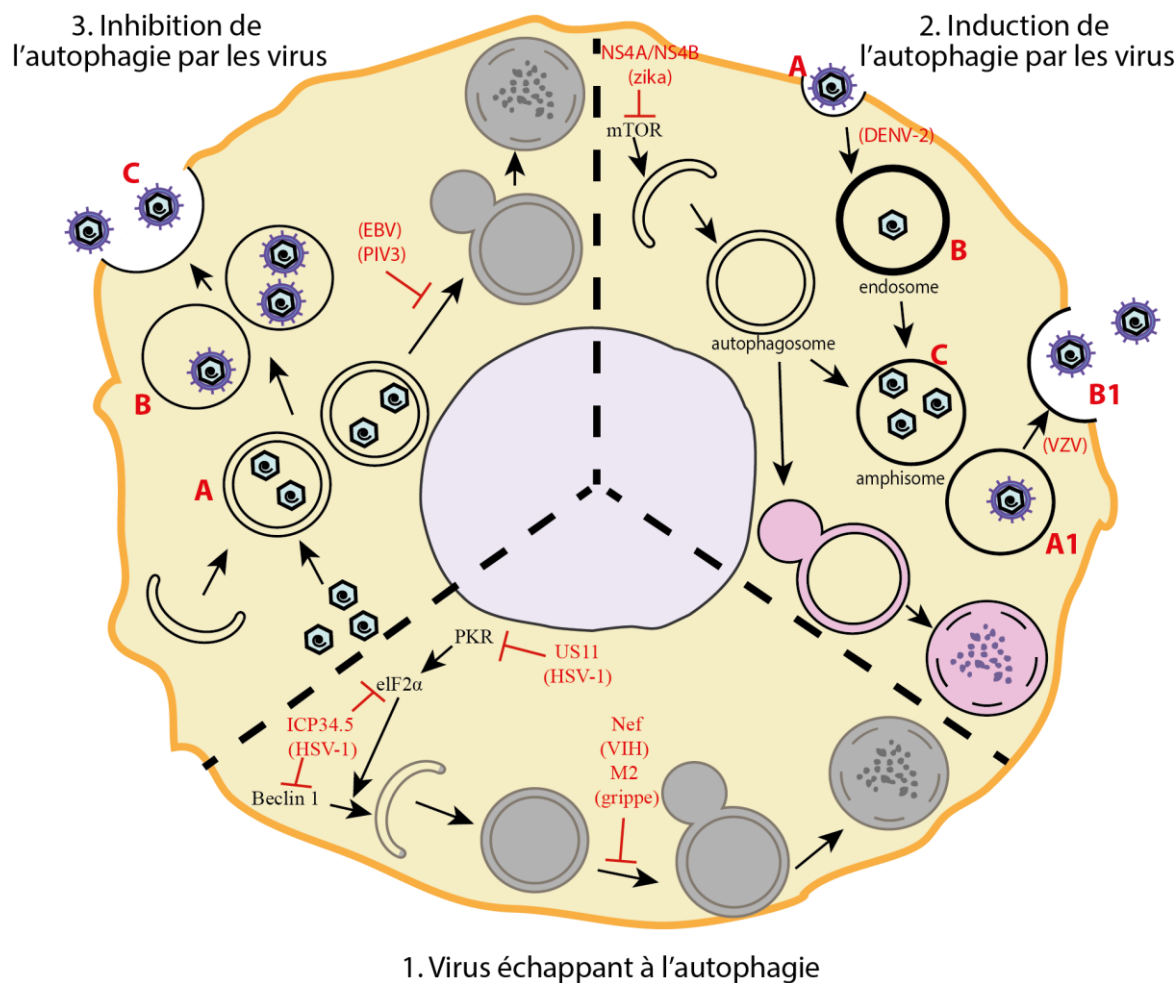
### 4.2.3. Des virus manipulent l'autophagie pour leur propre bénéfice

D'autres virus à ADN et à ARN modulent la voie de l'autophagie afin d'en tirer des bénéfices pour leur propre réplication ou pour sortir de la cellule. Les virus peuvent utiliser plusieurs stratégies. Certains activent la voie de l'autophagie alors que d'autres l'inhibent. Des exemples de virus utilisant ces différentes stratégies sont présentés ci-dessous.

#### 4.2.3.1. Induction de la voie de l'autophagie par les virus

Une des stratégies employées par les virus est de moduler la voie de l'autophagie en l'activant ou en permettant au moins la formation d'autophagosomes durant l'infection.

Ce mécanisme permet notamment au virus de favoriser sa propre réplication. Dans la littérature, plusieurs herpèsvirus utilisent cette stratégie. Il a récemment été montré que le virus entérique du canard (Duck enteritis virus, DEV) pouvait activer la voie de l'autophagie au sein des cellules fibroblastiques embryonnaires, favorisant la réplication du virus au sein des cellules (Yin *et al.* 2017). Cependant, les mécanismes moléculaires d'actions de ce virus n'ont pas encore été décryptés à ce jour. Le flavovirus zika semble également jouer un rôle proviral en activant la voie de l'autophagie. Cette stratégie lui permet ainsi d'augmenter sa réplication. Il utilise pour cela deux protéines antivirales NS4A et NS4B dont le rôle est de diminuer la phosphorylation de la protéine Akt, provoquant une inhibition de mTOR, induisant une activation de la voie de l'autophagie (Chiramel et Best 2017). Ces deux protéines induisent également un stress au niveau du réticulum endoplasmique, facilitant ainsi la courbure des membranes du réticulum endoplasmique. Cela permet de mobiliser les membranes et les lipides pour la réplication du virus et facilite la formation de son complexe de réplication. Le flavovirus de la dengue (DENV) active également de manière précoce la voie de l'autophagie, afin de mobiliser les membranes et les lipides pour sa réplication (Welsch *et al.* 2009; Heaton et Randall 2010; Chiramel et Best 2017). Puis il l'inhibe avant de déclencher le mécanisme de mort cellulaire de la cellule (Metz *et al.* 2015). Dans le cas du virus de la dengue-2 et 3 (DENV-2 et DENV-3), les particules virales se fixent sur un récepteur membranaire qui permet leur entrée au sein de la cellule via les endosomes. L'enveloppe virale fusionne avec la membrane de l'endosome.



Légende


**Figure 16.** Schéma récapitulant les différents mécanismes mis en place par les virus afin d'échapper ou de manipuler l'autophagie pour leur propre bénéfice. (1) Echapper à l'autophagie. Certains virus inhibent l'autophagie par le biais de la production de protéines virales anti-autophagie agissant au niveau de l'étape d'initiation (HSV-1) ou de maturation (virus de la grippe ou VIH) de l'autophagie. (2) Induction de l'autophagie au bénéfice du virus. L'autophagie peut être activée par le virus afin d'augmenter sa réplication virale (virus Zika, DENV-2) ou afin d'être libéré à l'extérieur de la cellule (VZV). Le DENV-2 (A) s'accroche sur un récepteur membranaire lui permettant d'entrer dans la cellule par le biais d'endosomes. (B) L'enveloppe virale fusionne avec la membrane de l'endosome. (C) l'endosome fusionne avec un autophagosome pour former un amphisome au sein duquel le virus peut se répliquer. Le VZV permet (A1) la formation d'amphisomes qu'il va utiliser pour (B1) être libéré à l'extérieur de la cellule. (3) Inhibition de l'autophagie au bénéfice du virus. L'autophagie est inhibée par le virus afin d'utiliser les vésicules autophagiques pour libérer les particules virales hors de la cellule sans provoquer de lyse cellulaire ou afin de former de nouvelles particules virales (EBV et PIV3). Les virus EBV et PIV3 (A) inhibent la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes provoquant une accumulation d'autophagosomes. (B) Les membranes autophagiques sont utilisées pour former de nouvelles particules virales ou (C) pour libérer des particules virales hors de la cellule. Structures grisées : étapes de la voie de l'autophagie n'étant pas réalisées.

Cette dernière fusionne ensuite avec un autophagosome formant un amphisome (structure résultant de la fusion d'un autophagosome avec un endosome). Ce dernier est le site de formation du complexe de réplication du virus (Khakpoor *et al.* 2009; Panyasrivanit *et al.* 2009) (Figure 16).

La voie peut également être utilisée pour permettre la maturation des virus afin qu'ils acquièrent leur pouvoir infectieux (Jackson 2015). Si la voie de l'autophagie est inhibée, le DENV devient moins infectieux (Mateo *et al.* 2013).

Le virus peut activer la voie de l'autophagie afin de permettre une meilleure propagation des particules virales hors de la cellule sans induire de lyse cellulaire (Jackson 2015; Lussignol et Esclatine 2017). Le Varicella Zoster Virus (VZV) induit la formation d'autophagosomes dans les cultures cellulaires tout au long du cycle d'infection (Buckingham *et al.* 2014) et la présence de particules virales du VZV a pu être détectée au sein de structures suspectées être des amphisomes. Cette étude a également mis en évidence que la protéine gE (protéine de l'enveloppe du VZV la mieux caractérisée) était co-localisée avec MAP1LC3 et rab11 (un marqueur du recyclage des endosomes) au sein de ces structures. Les auteurs, supposent que les amphisomes pourraient jouer le rôle de vésicules d'endocytose permettant de libérer le virus hors de la cellule (Buckingham *et al.* 2016) (Figure 16).

#### 4.2.3.2. Blocage de la voie de l'autophagie par les virus

La seconde stratégie employée par les virus consiste à inhiber la voie de l'autophagie. Ainsi, les vésicules autophagiques produites sont utilisées par les virus pour être transportés hors de la cellule ou afin de permettre la formation de l'enveloppe virale (Jackson 2015) (Figure 16). Le Virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à une augmentation du nombre de vésicules marquées avec MAP1LC3 dans le cytoplasme des cellules B au cours de son cycle de lyse. Cette accumulation correspond à une inhibition de la fusion entre autophagosomes et autolysosomes due à l'action de protéines virales lytiques (Granato *et al.* 2014; Nowag *et al.* 2014). Les membranes des autophagosomes produits pourraient alors contribuer à constituer la seconde enveloppe du virus dans le cytosol de la cellule infectée ou les vésicules autophagiques produites pourraient servir à transporter les particules virales afin de les faire sortir de la cellule.

Le parainfluenza virus (PIV3) développe cette stratégie afin d'utiliser les membranes des structures autophagiques pour former de nouvelles particules virales et pour transporter les particules virales hors de la cellule. Pour cela le PIV3 provoque un blocage de la voie de l'autophagie au niveau de l'étape de maturation. Le virus va bloquer l'accrochage de la

protéine SNARE Stx17 (située dans la membrane des autophagosomes) à la protéine SNAP29 (située au niveau de la membrane du lysosome) empêchant la fusion entre le lysosome et l'autophagosome (Faure 2014).

### 4.3. Autophagie et immunité chez les mollusques

Récemment, peu de données étaient disponibles concernant la voie de l'autophagie chez les mollusques bivalves, notamment concernant la relation entre la voie de l'autophagie et l'immunité chez les mollusques. Bai *et al.* (2012) ont été les premiers à démontrer la présence chez un mollusque, l'ormeau (*Haliotis diversicolor*), d'un gène potentiellement impliqué dans l'autophagie et le système immunitaire inné, appelé GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein (GABARAP). Ils ont mis en évidence que ce gène était exprimé de manière inégale dans les tissus de cet animal. L'expression la plus importante était observée dans l'hépatopancréas et la plus faible dans les hémocytes. De plus, leurs travaux suggèrent que ce gène pourrait jouer un rôle important dans le système immunitaire de l'ormeau adulte face à la présence d'organismes pathogènes (Bai *et al.* 2012).

La voie de l'autophagie a été étudiée chez l'huître creuse, *C. gigas*. Plusieurs gènes ATGs (autophagy related genes) ont été identifiés dans son génome (ATG4, ATG5, ATG7, ATG6, ATG9, ATG16, ATG1 et MAP1LC3). Ils sont phylogénétiquement proches des ATGs des mammifères tel que l'homme, *Homo sapiens* (Moreau *et al.* 2015). Au sein du manteau de *C. gigas*, des molécules connues pour moduler la voie de l'autophagie chez d'autres organismes (la carbamazépine un inducteur de la voie et le chlorure d'ammonium, un inhibiteur de la voie) ont été utilisées. Cela a permis de montrer que l'autophagie existe et est fonctionnelle au sein de cet organe. Au cours d'une infection expérimentale avec le virus OsHV-1, les auteurs ont montré par western blot une quantité de protéine MAP1LC3-II significativement plus élevée chez les huîtres infectées par le virus par rapport aux huîtres saines. En présence de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl), la survie des huîtres infectées par le virus diminue et une accumulation de la protéine MAP1LC3-II est observée. Ces résultats indiquent une non dégradation des autophagosomes. Au contraire, en présence de carbamazépine, la survie des huîtres infectées par le virus augmente, et la quantité d'ADN viral présent dans les animaux diminue. Des travaux complémentaires menés sur deux familles présentant des sensibilités contrastées à l'infection par OsHV-1 ont permis de mettre en évidence une amplitude de modulation différente de la voie de l'autophagie entre ces deux familles. Cette étude met en lumière pour la première fois, une modulation de l'autophagie

chez l'huître creuse au cours d'une infection par le virus OsHV-1 dans des conditions expérimentales.

Plus récemment, des travaux réalisés par Balbi *et al.* (2018) ont également démontré pour la première fois que la voie de l'autophagie est présente dans les cellules immunitaires (les hémocytes) d'un mollusque bivalve, la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*). De plus, il est suggéré que ce processus pourrait jouer un rôle protecteur en réponse à une infection par des *Vibrios* potentiellement pathogènes. Les chercheurs ont observé au sein des hémocytes la formation d'autophagosomes et autolysosomes en microscopie électronique à transmission en réponse à *V. tapetis*. Cependant, le sens du flux autophagique (induction ou inhibition de la voie) n'a pas été déterminé.

# CHAPITRE II

---

## **CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE CHEZ L'HUITRE CREUSE : *C. GIGAS* et *C. VIRGINICA***





## 1. Introduction

L'autophagie est un processus très conservé (Levine et Deretic 2007) dont le fonctionnement est bien documenté chez plusieurs espèces telles que la levure (*S. cerevisiae*) et l'homme (*H. sapiens*). Cependant ce mécanisme reste peu connu chez un nombre important d'organismes parmi lesquels les mollusques. Des premiers travaux ont été récemment initiés afin d'étudier ce processus au sein de l'ormeau, de l'huître creuse, de la moule méditerranéenne et de la moule bleue (Moore *et al.* 2007; Bai *et al.* 2012; Moreau *et al.* 2015; Balbi *et al.* 2018). Ces recherches ont permis d'identifier certains gènes impliqués dans la voie de l'autophagie et d'étudier la modulation de ce processus en réponse à des stress environnementaux (Moore *et al.* 2007) et à des organismes pathogènes tels que les bactéries (Bai *et al.* 2012; Moreau *et al.* 2015; Balbi *et al.* 2018) et les virus (Moreau *et al.* 2015). Cependant, la voie de l'autophagie reste peu documentée et caractérisée au niveau cellulaire et moléculaire chez les mollusques. Dans ce contexte, ce premier chapitre vise à caractériser l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*, par la combinaison d'approches cellulaires, moléculaires et protéiques.

La modulation de l'autophagie a été dans un premier temps étudiée au niveau cellulaire dans les cellules clés du système immunitaire de l'huître creuse : les hémocytes. Une approche intégrative a ainsi été entreprise en utilisant les méthodes de cytométrie en flux, de microscopie à fluorescence et de microscopie électronique à transmission.

En seconde partie de ce chapitre, le récent séquençage du génome de l'huître creuse (Zhang *et al.* 2012) nous a permis (1) d'identifier les protéines constituant la voie de l'autophagie chez *C. gigas* à l'aide de bases de données publiques ; (2) de localiser l'expression de quatre gènes et protéines clés de la voie de l'autophagie par PCR en temps réel, western blot et immunohistochimie dans les différents tissus de l'huître creuse.

Des résultats complémentaires sur la caractérisation de l'autophagie au niveau cellulaire et moléculaire chez l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*, sont également présentés dans une troisième partie. Ce travail a fait l'objet d'un séjour à l'Institute of Marine and Environmental Technology (IMET) à Baltimore (USA) sous la direction du Dr Colleen Burge. Des approches précédemment développées chez *C. gigas* ont été appliquées sur *C. virginica* afin (1) d'identifier les protéines constituant la voie de l'autophagie chez *C. virginica* à l'aide de la base de donnée publique NCBI ; (2) d'étudier la modulation de l'autophagie dans les hémocytes et le manteau de *C. virginica* en utilisant respectivement une approche cellulaire (cytométrie en flux) et une approche protéique (western blot).

## 2. Caractérisation de l'autophagie chez *C. gigas* au niveau cellulaire

Dans le cadre de cette première partie, nous avons étudié l'autophagie au niveau cellulaire au sein des hémocytes. Pour cela, des huîtres ont été exposées à deux molécules connues pour moduler la voie de l'autophagie: la carbamazépine (inducteur de la voie) et le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , inhibiteur de la voie) pendant 24 à 48 h. Après 24 et 48 h d'exposition, les hémocytes ont été analysés suivant trois méthodes couramment utilisées en biologie cellulaire pour étudier l'autophagie chez les mammifères. (1) Le pourcentage de cellule possédant des autophagosomes a été suivi par cytométrie en flux. (2) La microscopie à fluorescence a été utilisée pour déterminer la quantité d'autophagosomes au sein de chaque cellule analysée. (3) La présence de vacuoles autophagiques a été recherchée au sein des hémocytes par microscopie électronique à transmission.

Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'il était possible de détecter et caractériser des structures autophagiques au sein des hémocytes de l'huître creuse. A l'aide des méthodes de cytométrie en flux et de microscopie à fluorescence, nous avons montré que le nombre de cellules présentant des autophagosomes et le nombre de vacuoles autophagiques au sein de la cellule augmente en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $\text{NH}_4\text{Cl}$ +carbamazépine. L'approche en microscopie électronique à transmission a permis d'identifier des vacuoles autophagiques au sein des hémocytes dans différentes conditions après 24 h d'exposition aux molécules. D'après ces résultats, l'autophagie existe et peut être modulée au sein des hémocytes. L'ensemble de ces résultats a été publié dans le journal *Autophagy*.

---

## Article 1

---

### A study of autophagy in haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Sandy Picot<sup>1</sup>, Benjamin Morga<sup>1\*</sup>, Nicole Faury<sup>1</sup>, Bruno Chollet<sup>1</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Marie-Agnès Travers<sup>1</sup>, Tristan Renault<sup>2</sup>, Isabelle Arzul<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

<sup>2</sup> Ifremer, Département Ressources Biologiques et Environnement, Nantes, France.

Corresponding author:

Benjamin Morga

E-mail address: Benjamin.morga@ifremer.fr

Tel +33 5 46 76 26 49

Fax +33 5 46 76 26 11

Funding details: This work received financial support from the European project VIVALDI (H2020 n°678589)

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Abstract

Macroautophagy is a mechanism that is involved in various cellular processes, including cellular homeostasis and innate immunity. This pathway has been described in organisms ranging in complexity from yeasts to mammals, and recent results indicate that it occurs in the mantle of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. However, the autophagy pathway has never been explored in the haemocytes of *C. gigas*, which are the main effectors of its immune system and thus play a key role in the defence of the Pacific oyster against pathogens. To investigate autophagy in oyster haemocytes, tools currently used to monitor this mechanism in mammals, including flow cytometry, fluorescent microscopy and transmission electron microscopy, were adapted and applied to the haemocytes of the Pacific oyster. Oysters were exposed for 24 and 48 h to either an autophagy inducer (carbamazepine, which increases the production of autophagosomes) or an autophagy inhibitor (ammonium chloride, which prevents the degradation of autophagosomes). Autophagy was monitored in fresh haemocytes withdrawn from the adductor muscles of oysters using a combination of the three aforementioned methods. We successfully labelled autophagosomes and observed them by flow cytometry and fluorescence microscopy, and then used electron microscopy to observe ultrastructural modifications related to autophagy, including the presence of double membrane-bound vacuoles. Our results demonstrated that autophagy occurs in haemocytes of *C. gigas* and can be modulated by molecules known to modulate autophagy in other organisms. This study describes an integrated approach that can be applied to investigate autophagy in marine bivalves at the cellular level.

**Keywords:** autophagosome, autophagy, *Crassostrea gigas*, flow cytometry, fluorescence microscopy, haemocytes, transmission electron microscopy

**Abbreviations:** ATG, autophagy-related gene; AVd, late autophagic vacuole; AVi, early autophagic vacuole; DNA, deoxyribonucleic acid; MCA, multiple correspondence analysis; NH<sub>4</sub>Cl, ammonium chloride; IP<sub>3</sub>, myo-inositol-1.4.5-triphosphate; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; PI, propidium iodide; RNA : ribonucleic acid; TEM, transmission electron microscopy

## Introduction

Autophagy is a process that controls the quality and quantity of intracellular biomass by autodigesting cytoplasmic components that range in complexity and size from individual proteins to whole organelles[1]. Different types of autophagy have been identified, such as microautophagy, chaperone-mediated autophagy, and macroautophagy. The present study focused on macroautophagy[2], which is more commonly simply called autophagy and acts as a bulk process that captures large portions of cytosol or sequesters organelles like mitochondria or peroxisomes[1], which then fuse with lysosomes. Autophagy is a constitutive process that contributes to the turnover of cytoplasmic components in the cell (e.g., protein aggregations, organelles, ribosomes). This pathway is also involved in other key processes, including microorganism elimination, adaptation to starvation, and cell death[3]. Autophagy comprises three main steps[4]: (1) in the initiation step, phagophores are formed by the association of membranes suspected to come from the endoplasmic reticulum, trans-Golgi, and late endosomes[2]; (2) during the elongation step, the phagophore's double membrane is extended and encloses cytoplasmic components to form an autophagosome; (3) finally, the fusion between the autophagosome and a lysosome leads to the degradation of the enclosed cytoplasmic components by lysosomal enzymes. Degradation products then return to the cytoplasm, where they can be reused to build new molecules or in metabolism[5]. These different steps are regulated by various proteins that are encoded by autophagy-related genes (*ATGs*).

To investigate whether this process occurs and is working in the tissues or cells of different organisms[6, 7, 8, 9], a wide range of inhibitors and inducers of the autophagy pathway have been identified[10, 11]. In the present study, the effects of an inducer (carbamazepine) and an inhibitor (ammonium chloride;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) of the autophagy pathway were investigated. These molecules were previously reported to modulate the incidence of autophagy in the mantle of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[12]. Autophagy can be induced by carbamazepine, which acts on the inositol metabolism and provokes a decrease in the level of myo-inositol-1.4.5-triphosphate (IP3)[6]. Ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) is a lysosomotropic compound that neutralizes the lysosomal pH[7, 8, 9] and inhibits the degradation of autophagosomes.

Several tools have been developed to investigate the effects of drugs and monitor autophagy at a cellular level in vertebrates. Transmission electron microscopy (TEM) is one of the principal methods used to detect and quantify autophagic compartments in mammalian

cells[13, 14, 15, 16], and is notable because it allows autophagic structures in the cytoplasm to be observed. Fluorescence microscopy and flow cytometry are powerful and complementary tools that are used to observe autophagy in vertebrate cells, including those of the mouse[17], Chinese hamster[18], and human[19]. Western blotting and immunohistochemistry are other methods that can also be used to investigate autophagy in organisms. Most of these tools rely on the detection and quantification of the protein MAP1LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), which is a key marker of the autophagy flow[7].

Recently, Moreau *et al.*[12] detected the presence of MAP1LC3 in the mantle of *C. gigas* by western blotting. The expression level of the MAP1LC3 protein appeared to be modulated by an inducer and an inhibitor of the autophagy pathway, which were carbamazepine and NH<sub>4</sub>Cl, respectively. Furthermore, an accumulation of vesicular structures considered to likely be autophagosomes was observed in the mantle of the Pacific oyster in the presence of NH<sub>4</sub>Cl by TEM. These results demonstrated the occurrence of autophagy in the mantle of *C. gigas* and suggested that this process can be modulated by incubating oysters in water baths with NH<sub>4</sub>Cl or carbamazepine. However, no information is available about the occurrence or characteristics of autophagy in haemocytes, which are circulating cells present in the haemolymph of molluscs that play a key role in their immune response[20] against such pathogens as protozoans, bacteria, and viruses[21].

Based on preliminary results obtained by Moreau *et al.*[12] and considering the importance of haemocytes in the defence mechanisms of bivalve molluscs, in this study we developed a multi-tool approach to monitor autophagy in haemocytes using a combination of fluorescence microscopy, TEM and flow cytometry. Combining complementary approaches is needed to provide robust conclusions [7] and demonstrate that a mechanism like autophagy occurs in a new species or new targets. This approach was then used to investigate the effects of NH<sub>4</sub>Cl and carbamazepine, which are known to inhibit and induce autophagy in mammals, respectively, on autophagy in *C. gigas* haemocytes.

## Materials and methods

### *Oysters farming*

*C. gigas* spat was produced at the Ifremer hatchery in La Tremblade, Charente-Maritime, France. Spawning occurred in March 2015, after which larvae and spat were cultured as

described by Dégremont *et al.*[22] and Azéma *et al.*[23]. Prior to the experiment, spat were acclimatized to a constant flow of filtered and UV-treated seawater enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis suecica*) in 120 L tanks at 19 °C for at least two weeks.

### ***Experimental design***

Three treatments were used to test the modulation of autophagy in oyster spat. Groups of spat were maintained for 24 or 48 h in seawater supplemented with dissolved (1) NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich, A9434) at a concentration of 0.53 g/10 L of seawater, (2) carbamazepine (Sigma-Aldrich, C4024) at a concentration of 0.071 g/10 L seawater, or (3) carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl at concentrations of, respectively, 0.071 g/10 L of seawater and 0.53 g/10 L of seawater [12]. One control condition was also used, which consisted of spat maintain only in the seawater. For each of the four conditions tested (three treatments and one control), six tanks were used containing 13 oysters each. At each sampling time (24 and 48 h), three tanks of 13 animals were sampled per condition. At T0 (the time before oysters were incubated in the different test conditions), three pools of 13 oysters were sampled to record the basal level of autophagy in their haemocytes.

### ***Haemolymph collection***

Haemolymph was withdrawn from the adductor muscles of oysters using a 1 mL syringe equipped with a needle (0.6×32 mm). Haemolymph was kept on ice to limit cellular aggregation, and was filtered through a 74 µm nylon filter to eliminate debris. The haemolymph of the 13 oysters in each tank was pooled.

### ***Flow cytometry approach***

#### ***Haemocytes with autophagy activity***

Percentages of haemocytes with autophagy activity were quantified using the commercial Cyto-ID<sup>®</sup> autophagy detection kit (ENZO Life Sciences, ENZ-51031-K200), while following the manufacturer's protocol. This kit contains a 488 nm excitable green fluorescent detection reagent that becomes brightly fluorescent when incorporated into the vesicles produced during autophagy. For each condition at each sampling time, 3 pools of haemolymph (4 mL) were centrifuged for 10 min at 1500×g and 4°C. The supernatant was discarded, and the pellet containing the haemocytes was then suspended in 1 mL of buffer containing the Cyto-ID<sup>®</sup>



green detection reagent. Cells were then incubated for 90 min in the dark at room temperature (21°C). Cells that contained autophagosomes were stained by Cyto-ID® and emitted green fluorescent light (FL1: 500 – 550 nm).

#### *Haemocyte mortality/viability*

As previously described by Gagnaire[24], haemocyte mortality was measured in 200 µL of cell suspension sampled from each condition (3 replicates) and at each sampling time. Cells were incubated in the dark for 30 min at 4 °C with 10 µL of propidium iodide (PI, 1 mg/mL; ThermoFisher Scientific, P3566). PI is a fluorescent DNA/RNA-specific dye that only permeates the membranes of dead cells and stains their nucleic acids. Cells that emit red fluorescent light (FL3: 560 – 670 nm) when stained by PI were thus considered to be dead.

#### *Flow cytometry analysis*

For each sample, 5000 events were counted using an EPICS XL 4 particle counter (Beckman Coulter, USA). Size discrimination was used to ensure that small particles or bacteria were not counted, so that only haemocytes were taken into account when measuring cell activity. Results were depicted as cell cytograms and reported as log-scale fluorescence levels of each marker used. The results were expressed as ratios between the percentage of haemocytes that positively presented autophagosomes for each condition and the percentage of haemocytes labelled at T0. Flow cytometry data were analysed with flowing software 2.5.1 (University of Turku, Finland). To detect any effects of the test conditions, a Kruskal-Wallis test was carried out in R studio software version 3.3.2 using the package PMCMR (version 4.1). Results were expressed as means ± standard deviations.

#### *Fluorescence microscopy*

Haemocytes were labelled as previously described for flow cytometry (cf. 'Haemocytes with autophagy activity' above). For each condition at each sampling time, six replicates of 100 µL haemocyte suspensions (around  $1 \times 10^5$  cells) were deposited on glass slides and cytocentrifuged for 1 min at 100×g and 4°C. Haemocytes were observed under a fluorescence microscope at 100× magnification using immersion oil (Leica DMI6000 B, Germany). Useful images were extracted from LAS AF software (Leica application suite advanced fluorescence software, Leica Microsystems, Germany) and analysed with ImageJ software (National Institutes of Health, USA). The fluorescence intensity of thirty haemocytes was measured per condition and sampling time. For each picture, three background intensities of fluorescence

were used to obtain a mean fluorescence intensity for the image. The corrected cell fluorescence was then measured by subtracting the mean fluorescence intensity of the background from the fluorescence intensity of the haemocytes. Box plots were made and statistical analyses were performed using the packages *ggplot2* (version 2.2.1) and *PMCMR* (version 4.1) in R studio software (version 3.3.2).

### ***Transmission electron microscopy***

For each condition at each sampling time, two replicates of 1 mL haemocyte suspension ( $1 \times 10^6$  cells) were centrifuged at  $500 \times g$  for 8 min at 4 °C, and the supernatants were then discarded. Samples were fixed in 3% glutaraldehyde solution (Sigma-Aldrich, G5882) for 24 h at 4 °C. Cells were washed 3 times with 0.4 M cacodylate buffer (C0250, Sigma-Aldrich) and post-fixed with a solution of 1% osmium tetroxide (75632, Sigma-Aldrich) for 1 h at 4°C. Cells were washed again in 0.4 M cacodylate buffer twice. After dehydration in successive baths of ethanol and treatment with two baths of propylene oxide, samples were progressively impregnated and embedded in Epoxy embedding medium (45345, Sigma Aldrich). After polymerization at 60 °C, semi-thin sections were cut to 1  $\mu$ m thickness for quality control and then to 80–85 nm thickness for examination using a Leica Ultracut (EM UC6, Leica, Germany), and then were floated on copper electron microscopy grids and stained with uracil acetate/lead citrate[25]. The sections were examined using a transmission electron microscope (JEM 1000, JEOL, USA) at 80 kV. Thirty haemocytes per condition were observed on micrographs taken by TEM. The presence of ultrastructural modifications and autophagic structures of the haemocytes was examined based on the criteria described in the literature[13, 26, 27]. Ultrastructural modifications included characteristics associated with apoptosis (loss of pseudopodia, nuclear fragmentation and/or chromatin condensation, and the presence of apoptotic bodies or membrane blebbing) and necrosis (chromatin condensation, cytoplasmic and/or mitochondrial swelling, and damage to the cytoplasmic membrane) were also investigated. Double membrane-bound autophagic structures were identified based on the presence of a double membrane with a lumen between the two lipid bilayers, with contents resembling the cytoplasm around the structure in their density and composition. Single membrane-bound autophagic structures were identified based on the presence of a single membrane and partially degraded or intact contents. A multiple correspondence analysis (MCA) was performed to determine the association among variables related to these ultrastructural and autophagic characteristics, including cell condition, the presence or absence of a double or single membrane-bound structure and of ultrastructural modifications.

The packages FactoMineR (version 1.39) and factoextra (version 1.0.5) were used to plot the results of the MCA in R studio software (version 3.3.2).

## Results

### *Analysis of autophagic modulation in haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry*

Prior to measuring the autophagy activity, haemocyte mortality was evaluated using PI. Mean cell mortality never exceeded 9.2% in any treatment, and showed low variation among replicates (CV=3.0%, n=9).

Two haemocyte populations were identified: (1) negative haemocytes, i.e., those not stained by Cyto-ID<sup>®</sup>, and (2) positive haemocytes, i.e., those that were stained by Cyto-ID<sup>®</sup> (Fig. 1A). The percentage of haemocytes stained by Cyto-ID<sup>®</sup> differed among oyster exposure conditions.

These cell populations were further used to determine the autophagy activity of haemocytes by calculating the ratios between the percentage of cells with autophagosomes in the tested condition and that at T0 (Fig. 1B). At T0, 34±10% of haemocytes were found to be positive for staining by flow cytometry. No significant difference was observed between the ratio at T0 and those ratios at 24 and 48 h from oysters in the control condition. However, the ratio significantly decreased from 24 to 48 h ( $p<0.01$ ) in the control condition, at which point it returned to the ratio at T0 (Fig. 1B). Ratios were significantly higher for the NH<sub>4</sub>Cl condition than for the control condition at 24 and 48 h (both  $p<0.01$ ). In the presence of carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl, a significant increase in the ratio was also observed compared with the control condition, but only at 48 h after exposure ( $p<0.01$ ). With carbamazepine alone, the ratios at 24 and 48 h were similar to those observed in the control condition at the same sampling times.

Based on density plots, three haemocyte groups were identified (Fig. 1C). Regardless of the conditions tested, group I haemocytes were significantly less abundant than those belonging to groups II and III ( $p\leq 0.001$ ) (Fig. 1D). With the exception of the NH<sub>4</sub>Cl condition at 48 h, the proportion of haemocytes representing group II was significantly higher than that of group III ( $p\leq 0.05$ ). Moreover, the proportions of haemocytes in groups I and II decreased significantly in the presence of the autophagy modulators tested compared to those at T0

( $p \leq 0.001$ ). The relative proportion of group III haemocytes concurrently increased in all of the tested conditions compared to those at T0 ( $p \leq 0.05$ ).

For all conditions, the percentage of cells in group I was labelled very low ( $< 0.2\%$ ) (Fig. 1E). The percentage of haemocytes that were positive was always higher in group III than that in group II ( $p \leq 0.0001$ ). Significantly more positive cells were observed in groups II and III in oysters exposed for 48 h to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  than in the control condition at the equivalent sampling times ( $p \leq 0.05$ ). In contrast, the percent of cells positive significantly decreased in groups II and III in oysters maintained for 24 h with carbamazepine.

### ***A fluorescence microscopy approach to visualize and analyse autophagic vesicles in haemocytes***

In parallel, the presence of autophagic vesicles in haemocytes was evaluated in the different conditions using fluorescence microscopy by measuring the mean fluorescence intensity of thirty cells per condition (Fig. 2A). The mean fluorescence intensity decreased significantly after 24 h in the control condition ( $p = 0.05$ ) and then returned to the initial (T0) level at 48 h. The mean fluorescence intensity significantly increased in haemocytes from oysters exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $p \leq 0.01$ ) and carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $p \leq 0.01$ ) in comparison to that in the control condition at 24 and 48 h. No significant difference was observed between the carbamazepine condition and the control condition. Figure 2B shows haemocytes from oysters exposed to the four conditions after 24 and 48 h. Low green fluorescence was observed at T0 and at all times in the control condition, while in the  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  conditions an increase in the fluorescence intensity was observed at 24 and 48 h (Fig. 2B).

### ***Identification of ultrastructural modifications related to autophagy in haemocytes of *C. gigas* by transmission electron microscopy***

Autophagic structures in haemocytes were observed by TEM. After 24 h of exposure to different modulators, double and single membrane-bound vacuoles resembling autophagic structures were observed in all conditions (Fig. 3A). The majority (from 61 to 81%) of the structures identified had a lumen between two membranes in all conditions. All of the structures had contents resembling the cytoplasm around the double membrane-bound structure. The single membrane-bound structures each had a single membrane with partially degraded or intact contents.

In the control condition, haemocytes showed a normal nucleus with no cytoplasmic modifications, organelles were not swollen, and few vacuoles were present (Fig. 3A). An

accumulation of vacuolar structures presenting double membranes with cytoplasmic contents and condensation of the chromatin to a variable extent were noted in haemocytes from spat that were in contact with autophagy modulators (carbamazepine or  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Fig. 3A). In the carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition, the ultrastructural modifications generally included variable condensation of the chromatin, swelling of the mitochondria, and large vacuoles in the cells (Fig. 3A).

A qualitative approach was carried out to assess the results based on a MCA (Fig. 3B). The two first dimensions of the MCA were selected for plotting and interpretation because they represented the majority of the total variance (35.7%) in the data that could be explained based on the variables examined. The presence/absence of double or single membrane-bound structures and of ultrastructural modifications to the cell was represented by axis 1. The second axis took into account the effects of the condition (treatments or control). Figure 3Biii shows the distribution of the different variables examined as defined by these two dimensions. The position of the variables in the plotted two-dimensional space indicates the mutual association among variables. Each point represents several cells that showed the same profiles. The T0 condition was plotted close to the origin of the graph, and there was no difference between T0 points and those at later sampling times in the control condition. Results for the autophagy inducer (carbamazepine) and inhibitor ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) conditions were plotted at opposite positions along the second axis, showing the effect of these molecules on the autophagy pathway. The carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition was plotted at an intermediate position along the second axis.

Cells plotted on the left side of the graph were similar in terms of the detection of double and single membrane-bound structures and the absence of ultrastructural modifications in them. On the right side of the graphs, the absence of double and single membrane-bound structures was clustered with the appearance of ultrastructural modifications. This demonstrates that cells in the control condition presented double and single membrane-bound structures but few ultrastructural changes, whereas cells in the carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition did not present double or single membrane-bound structures but did show ultrastructural modifications. Cells in the inducer or inhibitor conditions had an intermediate state between that of cells in the two other conditions.

## Discussion

Macroautophagy, herein referred to simply as autophagy, is used by organisms as a defence strategy against a wide range of extra- or intracellular stressors[28, 29, 30]. This mechanism has been described as one of the most important intracellular pathways for the degradation and recycling of proteins and organelles, and relies on the sequestration of organelles into double membrane-bound vesicles. Although autophagy was previously measured in the digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to monitor the impact of different environmental stressors on this process[31, 32], very few studies have investigated this key mechanism in haemocytes, which are the main cellular effectors of the immune system in bivalve molluscs. However, bivalve molluscs are particularly exposed to environmental changes, including changes in climate, pollution, and pathogens that might modulate autophagy in their haemocytes.

In this study, we combined complementary tools to demonstrate, at the cellular level, that autophagy can be modulated in haemocytes of Pacific oysters (*C. gigas*) by known autophagy modulators (i.e., the inhibitor NH<sub>4</sub>Cl and the inducer carbamazepine). We used Cyto-ID<sup>®</sup> green dye, which labels autophagic compartments[33], to detect and observe autophagy modulation in the haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry and fluorescence microscopy, respectively. Flow cytometry is a particularly powerful tool for performing quantitative analyses of cell populations[34, 35]. In addition, ultrastructural modifications were also observed by TEM.

Interestingly, the level of haemocytes with autophagosomes in the control condition trend to increased from T0 to 24 h, and then returned close to the T0 level at 48 h. The increase observed at 24 h might correspond to an increase in the basal physiological autophagy level.

Although carbamazepine has been reported to induce autophagy[6, 11], flow cytometry results obtained in the present study did not show an increase in levels of autophagosomes in haemocytes of *C. gigas* exposed to this molecule. Hidvegi et al.[36] observed a dose-dependent increase in the MAP1LC3-II to MAP1LC3-I ratio in mouse hepatic cells, indicating that carbamazepine elicits increased autophagy flux in these cells. Moreau *et al.*[12] also observed that autophagy was induced in the mantle of the Pacific oyster by carbamazepine. Interestingly, carbamazepine did not induce the activation of autophagy at all in haemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[37]. These results, together with results obtained in the present study, suggest that autophagic responses differ among cell types.

In contrast to carbamazepine,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  is known to inhibit autophagy, and more specifically to inhibit autophagosome degradation[7]. In rat[8] and human cell cultures[38, 39], this molecule has been shown to induce an accumulation of MAP1LC3-II and prevent the degradation of autophagosomes[34, 38, 39]. Consequently, exposure to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  is expected to induce an accumulation of autophagosomes, resulting in an increase in the numbers of Cyto-ID<sup>®</sup>-labelled cells detected by flow cytometry. Since we found that the percentage of haemocytes with autophagosomes increased significantly in oysters exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  compared with that in control condition, our results are in accordance with the literature.

The combination of the two modulator drugs (carbamazepine and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) led to a greater induction of autophagy at 48 h relative to that in the control condition. This induction was significantly less than that induced by the inhibitor alone. Our results show that there is no significant effect of the combination of carbamazepine and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  on the haemocytes of *C. gigas*. Carbamazepine alone also did not have an effect on haemocyte autophagy. However, perhaps carbamazepine can impact other cellular pathways in haemocytes that moderate the induction of autophagy expected in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  alone. It has been reported by Klionsky et al.[7] that several pharmacological molecules used to induced or inhibit the autophagy pathway are not specific, and can impact several other cellular pathways as well. Cyto-ID<sup>®</sup>-labelled cells were also analysed in this study using fluorescence microscopy. Intense fluorescent dots similar to the autophagic compartments reported in mammalian cells[33] maintained in conditions of starvation[17, 38] were observed in the cytoplasm of oyster haemocytes. An increase in the abundance of these intracytoplasmic autophagic structures was observed in haemocytes from oysters exposed for 24 and 48 h to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ . This observation confirms the results obtained by flow cytometry.

Flow cytometry also revealed changes in morphological features (size and complexity) of the haemocytes of oysters exposed to autophagy modulators. Higher percentages of cells with greater structural complexity were observed after oysters were exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and to a lesser extent in the cells of oysters exposed to carbamazepine. This increased haemocyte complexity might be related to increased numbers of autophagic vesicles in the cytoplasm.

TEM is an informative approach that can be used to observe and identify autophagic structures in tissue sections and cell cultures[7, 14, 15, 16, 40, 41]. In mammals, two categories of autophagic vacuoles are commonly described[13, 14, 16, 26, 42]: (i) the early autophagic vacuoles (AVi) or autophagosomes, and (ii) the late autophagic vacuoles (AVd), also corresponding to autolysosomes or amphisomes. In our study, ultrastructures observed in

oyster haemocytes were similar to both types of autophagic vacuoles described in the literature. Analyses of Pacific oyster haemocytes showed that a greater proportion of the haemocytes contained autophagosomes than autolysosomes in all of the conditions tested. Similar observations have been reported in mammals, and can be explained by the fact that autolysosomes are short-lived structures, so that it is difficult to observe them by TEM[14]. The presence of autophagic structures was found herein to be variable, and dependent on the exposure condition. More autophagic structures bound with double or single membranes were observed in the control condition, and fewer were observed in the carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl condition. The NH<sub>4</sub>Cl and carbamazepine conditions demonstrated that haemocytes react differently depending on the molecule with which they are treated. The detection of the presence of autophagic structures is strongly associated with ultrastructural modifications to the cell.

Specific ultrastructural features related to autophagy were observed in our study, including a slight condensation of the chromatin, significant vacuolization of the cytoplasm, and degradation of the cytoplasmic contents[43, 44]. These modifications appeared to increase in frequency and extent when oysters were exposed to NH<sub>4</sub>Cl or carbamazepine compared to those in the control condition. However when combining both modulators (carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl) more ultrastructural modifications related to necrosis and apoptosis were observed than in the other conditions. The interactions between cell death and autophagy remain unclear[45, 46]. Indeed, there is controversy, as autophagy can be interpreted as either a form of programmed cell death or as a step that occurs before apoptosis or necrosis that promotes cell survival. Carbamazepine and NH<sub>4</sub>Cl in combination were harmful to haemocytes and induced more characteristic modifications associated with the programmed cell death response than the autophagy response. Moreau *et al.*[12] also observed autophagic structures in mantle cells of the Pacific oyster by TEM. Herein, we demonstrated the presence of autophagic structures interpreted as autophagosomes or autolysosomes in oyster haemocytes. These structures were similar to the autophagic vacuoles previously described in mussel haemocytes[37].

In the present study, we not only confirmed that autophagy occurs in the haemocytes of *C. gigas*, but also showed the importance of combining different approaches (flow cytometry, optical microscopy, and TEM) to monitor autophagy at the cellular level. The guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[7] highlight the importance of using a multi-tool approach to investigate autophagy. By following these recommendations,



we demonstrated that  $\text{NH}_4\text{Cl}$  can inhibit autophagy and that carbamazepine has no effect on autophagy in the haemocytes of *C. gigas*. This study described an integrated approach that can be applied in marine bivalves, including but not limited to the Pacific oyster, to investigate the potential effects on autophagy of various biotic and abiotic factors, including chemicals or pathogenic organisms.

## References

1. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host & Microbe*. 2009;5(6):527-549. doi: 10.1016/j.chom.2009.05.016.
2. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697.
3. Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12 Suppl 2:1535-1541. doi: 10.1038/sj.cdd.4401728.
4. Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):375-382. doi: 10.1016/j.coi.2006.05.019.
5. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861-2873. doi: 10.1101/gad.1599207.
6. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*. 2005;170(7):1101-1111. doi: 10.1083/jcb.200504035.
7. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016 2016;12(1):1-222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
8. Seglen PO, Grinde B, Solheim AE. Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur J Biochem*. 1979;95(2):215-225.
9. Sun R, Luo Y, Li J, et al. Ammonium chloride inhibits autophagy of hepatocellular carcinoma cells through SMAD2 signaling. *Tumour Biol*. 2015;36(2):1173-1177. doi: 10.1007/s13277-014-2699-x.
10. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 2012/09//;11(9):709-730. doi: 10.1038/nrd3802.
11. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, et al. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(4):304-312. doi: 10.1038/nrd2272.
12. Moreau P, Moreau K, Segarra A, et al. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy*. 2015;11(3):516-526. doi: 10.1080/15548627.2015.1017188.
13. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, et al. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Meth Enzymol*. 2009;452:143-164. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03610-0.

14. Eskelinen E-L. Fine structure of the autophagosome. *Methods Mol Biol.* 2008;445:11-28. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4\_2.
15. Eskelinen E-L. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy.* 2008;4(2):257-260.
16. Martinet W, Timmermans J-P, De Meyer GRY, et al. Chapter Five - Methods to Assess Autophagy In Situ—Transmission Electron Microscopy Versus Immunohistochemistry. *Methods in Enzymology. Cell-wide Metabolic Alterations Associated with Malignancy.* Vol. 543: Academic Press; 2014. p. 89-114.
17. Yakoub AM, Shukla D. Autophagy stimulation abrogates herpes simplex virus-1 infection. *Scientific Reports.* 2015;5:9730. doi: 10.1038/srep09730.
18. Lee JS, Lee GM. Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods.* 2012;56(3):375-382. doi: 10.1016/j.ymeth.2011.11.006.
19. Klappan AK, Hones S, Mylonas I, et al. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(1):25-36. doi: 10.1007/s00418-011-0869-0.
20. Fisher WS. Structure and Functions of Oyster Hemocytes. *Immunity in Invertebrates. Proceedings in Life Sciences:* Springer, Berlin, Heidelberg; 1986. p. 25-35.
21. Allam B, Raftos D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology.* 2015;131:121-136. doi: 10.1016/j.jip.2015.05.005.
22. Dégremont L, Bédier E, Soletchnik P, et al. Relative importance of family, site, and field placement timing on survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* 2005;249:213-229.
23. Azema P, Lamy JB, Boudry P, et al. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetic Selection Evolution.* 2017;49:23. doi: 10.1186/s12711-017-0297-2.
24. Gagnaire B. Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses: Université de la Rochelle; 2005.
25. Lewis PR, Knight DP. Staining methods for sectioned material. North-Holland; 1977.
26. Eskelinen E-L, Kovács AL. Double membranes vs. lipid bilayers, and their significance for correct identification of macroautophagic structures. *Autophagy.* 2011;7(9):931-932.
27. Silva MT, Vale Ad, Santos NMNd. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis.* 2008;13(4):463-482. doi: 10.1007/s10495-008-0187-8.

28. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, et al. Metabolic Control of Autophagy. *Cell*. 2014;159(6):1263-1276. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.006.
29. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43:67-93. doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
30. Paul P, Münz C. Autophagy and Mammalian Viruses: Roles in Immune Response, Viral Replication, and Beyond. *Adv Virus Res*. 2016;95:149-195. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.02.002.
31. Moore MN. Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy*. 2008;4(2):254-256.
32. Moore MN, Viarengo A, Donkin P, et al. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat Toxicol*. 2007;84(1):80-91. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.06.007.
33. Guo S, Liang Y, Murphy SF, et al. A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications. *Autophagy*. 2015;11(3):560-572. doi: 10.1080/15548627.2015.1017181.
34. Eng KE, Panas MD, Karlsson Hedestam GB, et al. A novel quantitative flow cytometry-based assay for autophagy. *Autophagy*. 2010;6(5):634-641. doi: 10.4161/auto.6.5.12112.
35. Demishtein A, Porat Z, Elazar Z, et al. Applications of flow cytometry for measurement of autophagy. *Methods*. 2015;75:87-95. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.12.020.
36. Hidvegi T, Ewing M, Hale P, et al. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science*. 2010;329(5988):229-232. doi: 10.1126/science.1190354.
37. Balbi T, Cortese K, Ciacci C, et al. Autophagic processes in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Effects of *Vibrio tapetis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2017;73:66-74. doi: 10.1016/j.fsi.2017.12.003.
38. Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, et al. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2010;17(6):962. doi: 10.1038/cdd.2009.200.
39. Castino R, Fiorentino I, Cagnin M, et al. Chelation of Lysosomal Iron Protects Dopaminergic SH-SY5Y Neuroblastoma Cells from Hydrogen Peroxide Toxicity by Precluding Autophagy and Akt Dephosphorylation. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):523-541. doi: 10.1093/toxsci/kfr179.
40. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*. 2010;140(3):313-326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
41. Perrotta I. The use of electron microscopy for the detection of autophagy in human atherosclerosis. *Micron*. 2013;50:7-13. doi: 10.1016/j.micron.2013.03.007.

42. Eskelinen E-L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*. 2005;1(1):1-10.
43. Cabon L, Martinez-Torres A-C, Susin SA. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire [Programmed cell death does not lack vocabulary]. *Med Sci (Paris)*.29(12):1117-1124. doi: 10.1051/medsci/20132912015. French.
44. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*. 2005;73(4):1907-1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
45. Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation*. 2015;22(3):367-376. doi: 10.1038/cdd.2014.143.
46. Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J*. 2015;282(22):4279-4288. doi: 10.1111/febs.13515.

## Figure captions

**Figure 1.** Detection and monitoring of autophagy in haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry. (A) FL1 histogram overlay of haemocytes stained with Cyto-ID<sup>®</sup> in normal condition (at T0) and presenting signs of autophagy inhibition (NH<sub>4</sub>Cl condition). The horizontal axis represents the fluorescence intensity, while the vertical axis represents the number of haemocytes. Based on Cyto-ID<sup>®</sup> staining, two populations are defined: a negative cell population situated on the left of the histogram, and a positive cell population situated on the right of the histogram and only observed in the induced condition. (B) Ratios between percentages of haemocytes with autophagosomes in the different test conditions (control, NH<sub>4</sub>Cl, carbamazepine, carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl) after 24 or 48 h to those at T0. Values are means of nine replicates, and error bars represent standard deviation. a: significant difference between a treatment and the control condition at the respective time ( $p < 0.01$ ). b: significant difference between control conditions at different times ( $p < 0.01$ ). c: significant difference between a treatment and the NH<sub>4</sub>Cl condition at the respective time ( $p < 0.01$ ). The red line represents the basal level of autophagy (T0 condition). (C) Forward scatter (FSC) vs. side scatter (SSC) density plot distinguishing three haemocyte populations. In order to define the haemocyte populations, 30 000 events were counted. Group I corresponds to haemocytes with low complexity and size, group II corresponds to haemocytes with moderate size and complexity, and group III corresponds to haemocytes with high complexity and size. (D) Proportion of haemocytes represented by each of the three populations at T0 and after 24 or 48 h post-exposure with different reagents (NH<sub>4</sub>Cl and/or carbamazepine). The control condition represents oysters only in seawater, without reagents. (E) Proportion of haemocytes represented by each of the three populations labelled with Cyto-ID<sup>®</sup> at T0 and after 24 or 48 h post-exposure with different reagents (NH<sub>4</sub>Cl and/or carbamazepine). Values are means of nine replicates, and error bars represent standard deviation. a: significant difference among respective cell populations relative to proportions of population I cells ( $p \leq 0.0001$ ). b: significant difference among respective cell populations relative to proportions of population II cells ( $p \leq 0.0001$ ). c: significant difference among respective cell populations relative to the control condition ( $p \leq 0.05$ ). d: significant difference among respective cell populations relative to T0 ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Observation and measurement of the fluorescence intensity of haemocytes stained with Cyto-ID<sup>®</sup>. (A) Difference in the mean fluorescence intensity of haemocytes stained with Cyto-ID<sup>®</sup> between each condition at different times and T0. Each blue cross represents the difference in the mean fluorescence intensity of the haemocytes of the selected condition. The red line represents the difference in the mean fluorescence intensity of haemocytes from that at T0. Grey stars represent outliers. Each boxplot was made with  $n=30$ ; \*  $p \leq 0.01$ . (B) Haemocyte pictures from different test conditions (NH<sub>4</sub>Cl, carbamazepine, carbamazepine+NH<sub>4</sub>Cl, and control) labelled with Cyto-ID<sup>®</sup> (FITC) (column 3) and counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (blue) (column 2). A combined image merging results with DAPI and FITC is presented in column 4. The edges of haemocytes can be observed in white light (DIC) (column 1). White arrows show the accumulation of autophagosomes in the haemocytes' cytoplasm. Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Figure 3.** Detection of autophagic structures in haemocytes by transmission electron microscopy. (A) TEM observations of morphological modifications and autophagic structures in haemocytes of *C. gigas*; scale bar =1  $\mu\text{m}$ . i. haemocytes without ultrastructural modification (control condition); ii. haemocytes exposed to carbamazepine+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  presenting ultrastructural modifications; iii. haemocytes treated with an inhibitor of autophagy ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) presenting autophagic structures; iv. haemocytes treated with an inducer of autophagy (carbamazepine) presenting autophagic structures. v. autophagic structures with double or single membrane-bound structures in all of the different conditions tested; scale bar = 200 $\mu\text{m}$ . Arrow: presence of the double or single membrane-bound structure. (B) Results of the MCA of the different variables examined with the TEM approach. i. histogram of the percentages of variiances explained by each dimension of the MCA; ii. variables' contributions to each of the two first dimensions; iii. MCA plot representation of the tested variable (cells with double or single membrane-bound structures, changed ultrastructural state, and condition).

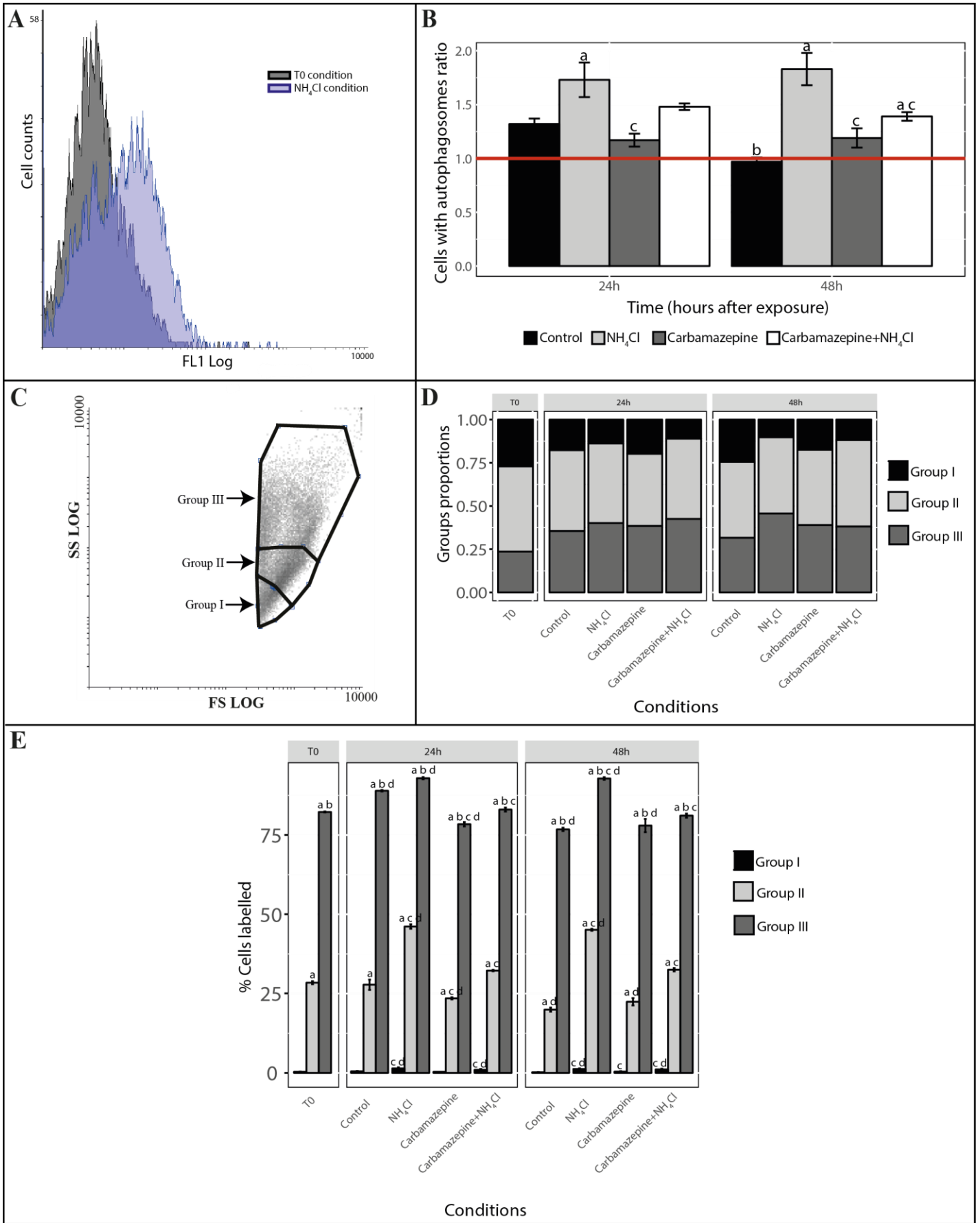


Figure 1



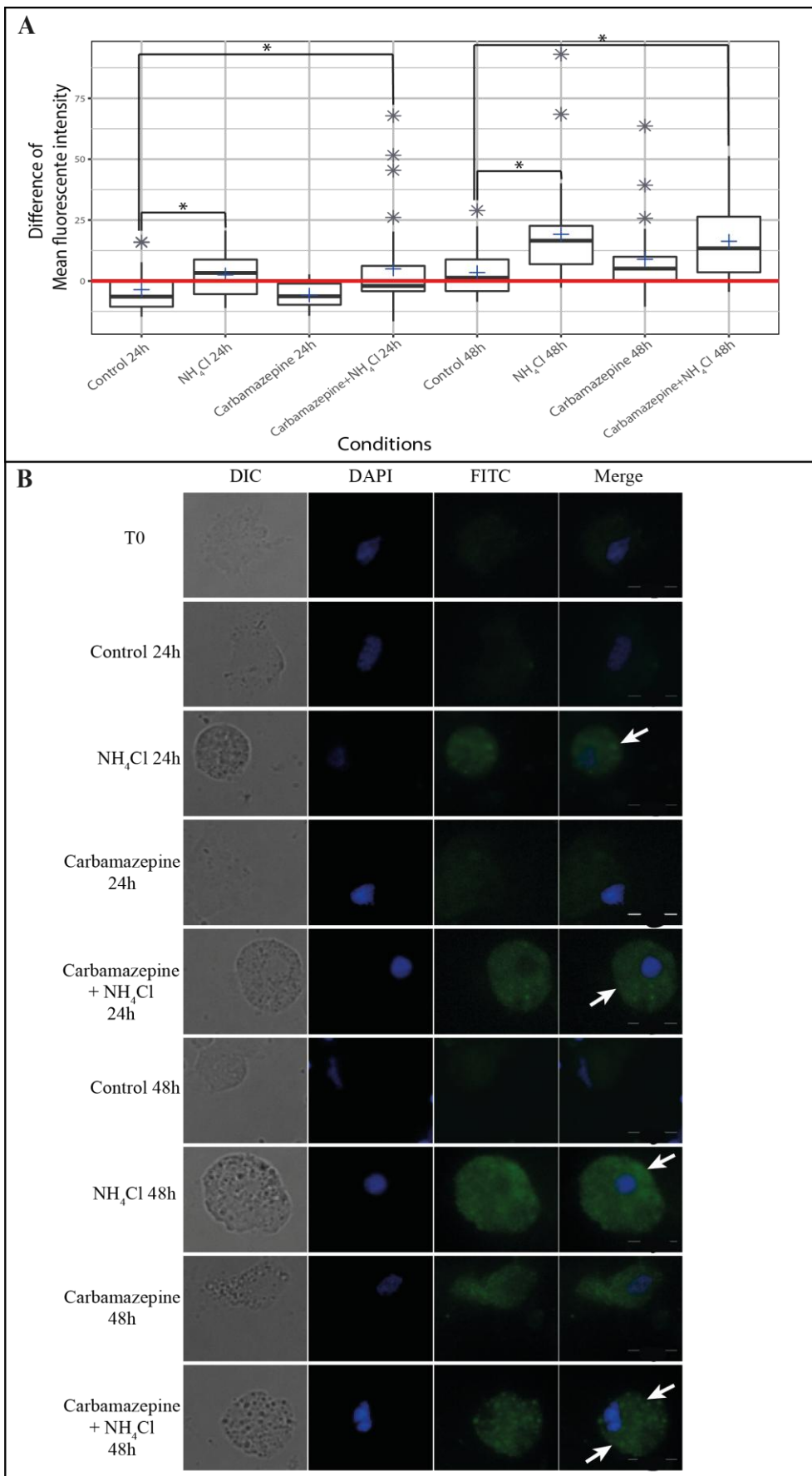


Figure 2

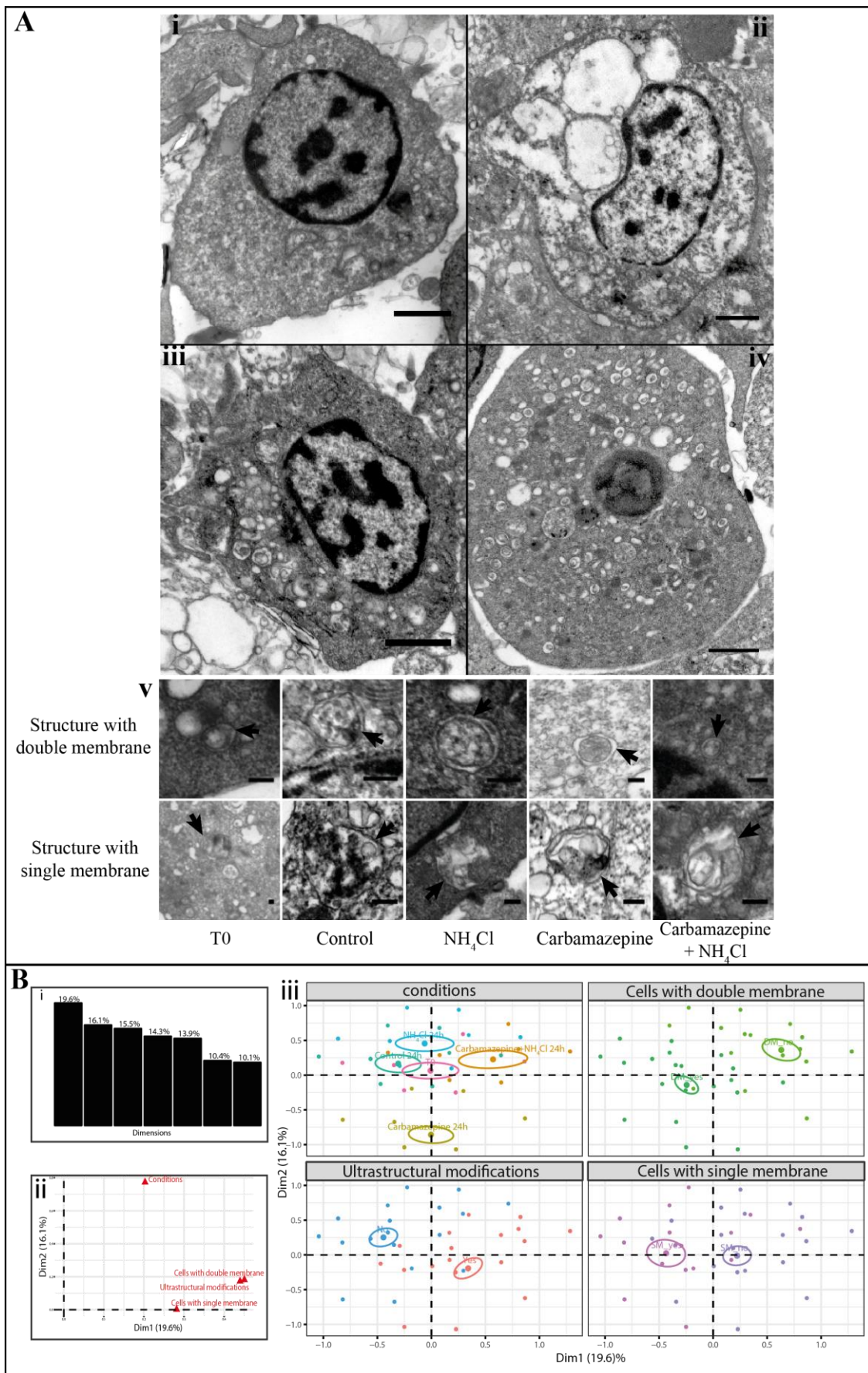


Figure 3

### 3. Caractérisation de l'autophagie chez *C. gigas* au niveau moléculaire et protéique

La détection et la caractérisation de structures autophagiques dans la première partie de ce chapitre nous a conduit dans le cadre de cette seconde partie à analyser et caractériser cette voie au niveau moléculaire. En 2012, le génome de *C. gigas* a été séquencé et annoté (Zhang *et al.* 2012) et les travaux entrepris par Moreau et ses collaborateurs (Moreau *et al.* 2015) ont permis de déterminer la présence de certains gènes de la voie de l'autophagie (related autophagy genes, *ATG*) dans le génome de l'huître creuse. Cependant, l'ensemble des gènes constituant la voie de l'autophagie ne sont pas connus et l'expression des gènes et protéines clés de la voie de l'autophagie n'a jamais été étudiée dans différents compartiments tissulaires de l'huître creuse.

Dans un premier temps, un inventaire le plus exhaustif possible des protéines de la voie de l'autophagie a été dressé chez *C. gigas* à l'aide de bases de données publiques (NCBI et UniProt). Les séquences protéiques de quatre *ATG* de l'huître creuse et de plusieurs organismes eucaryotes ont été alignées et analysées au niveau phylogénétique.

Puis, une approche par PCR en temps réel a été développée pour suivre l'expression de plusieurs gènes clés de la voie de l'autophagie (*BECN1*, *mTOR*, *MAP1LC3* et *SQSTM1*) dans différents compartiments tissulaires de l'huître creuse (manteau, branchies, gonade, muscle, palpes labiaux, cœur, hémocytes, glande digestive). L'expression et la localisation des protéines *mTOR*, *SQSTM1*, *BECN1* et *MAP1LC3* ont également été suivies par western blot et immunohistochimie.

D'après les résultats obtenus, la voie de l'autophagie est structurellement et constitutionnellement conservée chez l'huître creuse. Les compartiments tissulaires de *C. gigas* explorés révèlent la présence de l'autophagie de manière constitutive.

---

## Article 2

---

### **First identification and functional characterization of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, *Crassostrea gigas***

Sandy Picot<sup>1</sup>, Nicole Faury<sup>1</sup>, Isabelle Arzul<sup>1</sup>, Bruno Chollet<sup>1</sup>, Tristan Renault<sup>2</sup>, Benjamin Morga<sup>1</sup>

#### Affiliations

<sup>1</sup> Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

<sup>2</sup> Ifremer, Département Ressources Biologiques et Environnement, Nantes, France

Corresponding author:

Benjamin Morga

E-mail address: Benjamin.morga@ifremer.fr,

Tel +33 5 46 76 26 49

Fax +33 5 46 76 26 11

Funding details: This work received financial support from the European project 15 VIVALDI (H2020 n°678589)

## Abstract

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a mollusk bivalve commercially important as a food source. Pacific oysters are subjected to stress and diseases during culture. The autophagy pathway is involved in numerous cellular processes, including responses to starvation, cell death, and microorganism elimination. Autophagy also exists in *C. gigas*, and plays a role in the immune response against infections. Although this process is well-documented and conserved in most animals, it is still poorly understood in mollusks. To date, no study has provided a complete overview of the molecular mechanism of autophagy in mollusk bivalves. In this study, human and yeast ATG protein sequences and public databases (Uniprot and NCBI) were used to identify protein members of the *C. gigas* autophagy pathway. A total of 36 autophagy-related proteins were found in the Pacific oyster. RACE-PCR was performed on several genes. Using molecular (real-time PCR) and protein-based (Western blot and immunohistochemistry) approaches, the expression and localization of BECN1, MAP1LC3, mTOR, and SQSTM1, was investigated in different tissues of the Pacific oyster. Comparison with human and yeast counterparts demonstrated a high homology with the human autophagy pathway. The results also demonstrated that the four key autophagy genes and their protein products were expressed in all the analyzed tissues of *C. gigas*. This study allows the characterization of the complete *C. gigas* autophagy pathway for the first time.

## Introduction

Autophagy is an important mechanism that contributes to the maintenance of cellular homeostasis and different cellular processes, including adaptation to starvation, microorganism elimination, and cell death. Three main categories of autophagy are commonly described: microautophagy, chaperone-mediated autophagy, and macroautophagy [1,2]. During microautophagy, cytoplasmic compounds are taken up by invagination of the lysosomal membrane. In chaperone-mediated autophagy, the targeted proteins are translocated across the lysosomal membrane. Macroautophagy, more commonly referred to simply as autophagy, acts as a bulk process that captures large portions of cytosol or sequesters organelles such as mitochondria or peroxisomes, which then fuse with lysosomes [1]. Each stage of the cellular mechanism of autophagy is regulated by several autophagy-related proteins (ATG).

The autophagy molecular pathway was first described in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, in the 1990s [3]. Forty-one *ATG* have since been identified in yeast [4]. Since 1990, the research of *ATG* to better understand the autophagy molecular mechanism in other organisms has started. Homologs of *ATG* genes have been found in *Homo sapiens*, worms, flies, and mammals [1], and many have similar roles as in yeast [5]. The core molecular machinery of the autophagy pathway, which corresponds to ATG proteins essential for autophagosome formation [6,7], is highly conserved in eukaryotic cells including plants, yeast, and mammals [6,8–10]. In yeast, this core mechanism consists of 18 ATG proteins, classified into several functional groups: the Atg1/unc-51-like kinase (ULK) complex, class III phosphatidylinositol-3-kinase (PtdIns3K) complex, ATG12 and LC3 conjugation systems, and Atg9/mATG9 and its cycling system [5]. However, in many organisms, the molecular machinery of autophagy remains unknown.

In mollusks, relatively few studies have aimed at identifying autophagy proteins and to analyze their responses in the presence of pathogens, or at different developmental stages. The GABARAP protein has been identified in the small abalone *Haliotis diversicolor*, and the relative expression of the relevant gene have been characterized at different stages of development or in presence of the bacteria, *Vibrio tapetis* [11]. In *C. gigas*, several autophagy-related proteins, including MAP1LC3, Beclin 1 (BECN1), ATG4, ATG5, ATG7, ATG9A, and ATG16L1 have been identified [12]; moreover, the relative expression of BECN1 and MAP1LC3 has been evaluated in presence of the virus OsHV-1 [12]. However,

the complete pathway has not been characterized in bivalves.

Therefore, the aim of our study was to decipher the autophagy pathway in the Pacific oyster, *C. gigas*, the most important shellfish farming resource in France which has been affected by several diseases since the 1990s. Young and adult Pacific oysters have been regularly affected by outbreaks of mass mortality caused respectively by ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) and the bacteria *Vibrio aestuarianus* [13]. The Pacific oyster genome was sequenced in 2012 [14], which allowed us to screen the Pacific oyster genes for the presence of autophagy related proteins. These sequences were then compared to ATG homolog present in others organisms. Some proteins that present incomplete sequences were re-sequenced using RACE-PCR. The expression of the beclin 1 (*BECN1*), microtubule associated protein 1A/1B light chain (*MAP1LC3A*), serine/threonine protein kinase TOR (*mTOR*), and sequestosome-1 (*SQSTM1*) genes was detected in different tissues of *C. gigas* by real-time PCR. Finally, four human heterolog antibodies targeting BECN1, MAP1LC3A, mTOR, and SQSTM 1 were selected according to their high protein sequence homology with the *C. gigas* ATG counterparts, allowing us to confirm the presence of these four proteins in different tissues of *C. gigas* by Western blotting and immunohistochemistry. In this study, we identified and characterized the ATG proteins in a mollusk bivalve, *C. gigas*, for the first time. Moreover, new protein-based and molecular approaches were described. These approaches can be used to further investigate the modulation of autophagy in *C. gigas* in response to various biotic and abiotic factors, including environmental stressors and pathogenic organisms.

## Materials and Methods

### *Identification of autophagy proteins in C. gigas*

A preliminary search for *C. gigas* ATG homologs was performed in the universal protein resource, Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). As a second approach, we used the BLASTp program of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) to search for *C. gigas* ATG homologs using *H. sapiens* and *S. cerevisiae* ATG protein sequences collected from the Uniprot database. Conserved domain analysis of each *C. gigas* ATG was performed using the CD-search module of NCBI. The percent identity of each *C. gigas* ATG sequence with the human and yeast sequences was evaluated using the “Needleman-Wunsch Global Align Nucleotide Sequences” tool in NCBI.

All the protein sequences of the three organisms are provided in Supplementary file n°1 (Annexe B).

### ***Oysters***

One-year-old Pacific oysters, *C. gigas*, were produced at the Ifremer facilities in Argenton, Finistère, France. Animals were maintained in raceways supplied with a constant flow of seawater at 19 °C, enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis suecica*).

### ***Total RNA extraction and cDNA synthesis***

Pieces of mantle, gills, labial palps, muscle, digestive gland, heart, and gonad were collected from Pacific oysters (100 mg). A 1 mL pool of haemolymph was withdrawn from the adductor muscle of four animals.

For each tissue, total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Ambion) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was treated with TURBO™ DNase (Invitrogen) to remove genomic DNA. The quality and quantity of the RNA were determined using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A mock reverse transcription was performed after each DNase treatment to control for the absence of oyster and/or viral genomic DNA. First-strand cDNA synthesis was carried out using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with 500 ng of treated RNA.

### ***Identification and characterization of autophagy-related genes***

To obtain full-length cDNAs for *ATG7*, *ATG12* and *ATG9*, RACE-PCR reactions were carried out using the SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Clontech Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Primers were designed using the open-source Primer3 software ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) and synthesized by Eurogentec (Table 1). First-strand cDNAs synthesis, ligation, and cloning were performed with the TA Cloning Kit (Invitrogen) and transformation was performed with Top10 competent bacteria (Invitrogen). Several clones were sequenced from both ends using the BigDye® Terminator v3.1 sequencing kit with an ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), a 36 cm capillary array, and POP 7 polymer. Open reading frames and protein conserved domains were identified (ORF finder and Conserved Domain, NCBI). Complete sequences were deposited in GenBank and assigned under the accession numbers MK069430



(*ATG9*), MK069431 (*ATG12*), and MK173046 (*ATG7*). The isoelectric point and molecular mass were calculated in [http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html).

### ***Protein sequence alignment and phylogenetic analysis***

Multiple amino acid sequence alignments were performed with sequences from ten species: human (*H. sapiens*), eastern oyster (*Crassostrea virginica*), chicken (*Gallus gallus*), zebrafish (*Danio rerio*), fly (*Drosophila melanogaster*), worm (*Caenorhabditis elegans*), mouse (*Mus musculus*), sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*), lamp shell (*Lingula unguis*), and European honey bee (*Apis mellifera*). The ATG protein sequences of the ten species were obtained from the Uniprot or NCBI databases. Alignments were performed using ClustalW [15] with the BioEdit sequence alignment editor version 7.0.5.3. The phylogenetic trees were constructed with MEGA 7 software version 7.0.26, using the Neighbor joining method (bootstrap = 1000). The amino acid sequences from the ten species used to perform the alignments and the phylogenetic analysis are listed in supplementary file n°2 (Annexe C).

### ***Real-time quantitative PCR and relative expression***

Real-time quantitative PCR was performed in duplicate using an Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). All forward and reverse primers used in the present study were designed using Primer3 software ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) and synthesized by Eurogentec. Real-time quantitative PCR was used to evaluate autophagy-related gene expression (*BECN1*, *MAP1LC3A*, *mTOR*, and *SQSTM1*). Amplification reactions were performed in a total volume of 20  $\mu$ L. Each well contained 5  $\mu$ L cDNA (diluted 1:30), 10  $\mu$ L Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> green qPCR Master Mix (Agilent), 2  $\mu$ L of each primer (3  $\mu$ M) and 1  $\mu$ L distilled water. The cycling conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. Melting curves were also plotted to ensure that a single PCR product was amplified for each set of primers. In all cases, negative controls (without cDNA) were included to rule out DNA contamination.

Four specific primer pairs were designed for unique gene sense or antisense sequences and validated by real-time PCR (Table 2). Standard curves were generated for each primer pair using serial dilutions of total cDNA, and PCR efficacy ( $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ ) was calculated based on these curves [16]. Thus, the four ATGs were normalized using the oyster housekeeping gene of *C. gigas*, elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) (GenBank, Accession N°. AB122066). A pool of the different tissues of *C. gigas* tested in this experiment was used for calibration. The relative quantification value (ratio R) was calculated using the method described by Pfaffl,

2001 [17]:  $R = [(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control-sample})}] / [(E_{\text{ref}})^{\Delta CT_{\text{ref}}(\text{control-sample})}]$ . All amplification obtained by real-time PCR was validated by sequencing using the ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 XL-Avant Genetic Analyzer with a 36 cm capillary array and POP 7 polymer (data not shown).

### *Western blotting*

Pieces of mantle, gills, labial palps, muscle, digestive gland, heart, and gonad were collected from one Pacific oyster (20 to 25 mg). A pool of 10 mL of haemolymph from 12 animals was withdrawn from the adductor muscle and centrifuged for 10 min at  $1500 \times g$  at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet containing the haemocytes was used for protein extraction.

For each tissue sample, protein extraction was carried out in 200  $\mu\text{L}$  cell extraction buffer (Invitrogen). Samples were ground using a pellet piston and lysed on ice for 30 min in cell extraction buffer with 1 mM PMSF (Euromedex) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Lysates were centrifuged at 13000 rpm for 10 min at 4 °C, and supernatant fractions were recovered. All the extracted samples were quantified using the commercial Pierce<sup>™</sup> BCA protein assay kit (Thermo Scientific).

From each tissue, 30  $\mu\text{g}$  of protein extract was loaded and migrated on an 8-16 % SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad). For haemocytes, only 22  $\mu\text{g}$  was loaded. Proteins were transferred onto a PVDF membrane and blocked in TBS 0.1 % Tween 20 containing 5 % BSA (5 % TBST) for 45 min. The membrane was then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: MAP1LC3 at 1:200 (#3738, Cell Signaling Technology<sup>®</sup>), BECN1 at 1:1000 (#3738, Cell Signaling Technology<sup>®</sup>), mTOR at 1:1000 (PA5-13263, Thermo Fisher Scientific), actin at 1:500 (A4700, Sigma-Aldrich), and SQSTM1 at 1:6000 (P0067, Sigma-Aldrich), diluted in TBST 5 %. The actin antibody was used as a loading control. Membranes were washed three times for 10 min at room temperature with TBS 0.1 % Tween 20 containing 1 % BSA (1 % TBST). Membranes were then incubated with anti-rabbit at 1:2500 (NA934, GE Healthcare) or anti-mouse at 1:5000 (NA931, GE Healthcare) HRP-conjugated secondary antibodies for 45 min at room temperature. Each membrane was washed three times for 10 min with 1 % TBST. Immunoreactive bands were then detected by enhanced chemiluminescence using the Amersham ECL Western Blotting Analysis system (GE Healthcare).

### ***Immunohistochemistry***

Whole oysters were preserved in Davidson's fixative (22 % formaldehyde, 33 % ethanol 95°, 12 % glycerol, 33 % filtered sea water [0.2 µm filters], and 10% acetic acid) for 48 h and then stored in ethanol before being embedded in paraffin wax blocks. Sections 5-µm thick were cut and mounted on silane-coated slides (100003, Dutscher, France). The tissues were deparaffinized in xylene twice for 10 min, rinsed twice for 10 min with absolute ethanol, and unmasked in citrate buffer for 30 min at 90 °C. After cooling, slides were washed in 1X PBS for 10 min. Non-specific binding was blocked using PBS containing 1 % dried skimmed milk, for 30 min at ambient temperature. The slides were then incubated overnight at 4 °C with the polyclonal primary antibody diluted in 1X PBS, supplemented with 0.5 % dried skimmed milk (1:10 for anti-mTOR [PA5-13263], 1:20 for anti-MAP1LC3A [AP1805a, Abgent primary antibody company], 1:100 for anti-SQSTM1 [P0067] and 1:50 for anti-BECN1[GTX55535, GeneTex]). Unbound primary antibodies were removed with five washes in PBS 1X. The slides were then incubated for 45 min with the secondary anti-rabbit antibody (A0545, Sigma-Aldrich) diluted 1:200 in 1X PBS supplemented with 0.5 % dried skimmed milk at ambient temperature in the dark. Unbound secondary antibody was removed with five washes in 1X PBS in the dark.

Using the SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) tablet set (Sigma-Aldrich), one DAB tablet and one Urea-Hydrogen Peroxide tablet were dissolved in 1 mL of water. This solution was added to each tissue section, and the sections were then incubated for 10 min in the dark at room temperature. The reaction was stopped by rinsing the slides with distilled water. Sections were stained for 10 s in Mayer hematoxylin (VWR International S.A.S.), then 30 s in water, 1 min in absolute ethanol, and finally soaked in xylene before mounting with Eukitt resin for microscopic observation. For negative controls, the same protocol was used but without adding the primary antibodies.

## **Results**

### ***Protein mining of the *C. gigas* autophagy pathway***

All the ATG protein sequences for *C. gigas*, *S. cerevisiae*, and *H. sapiens* were obtained (supplementary file n°1, AnnexeB) and compared using the Uniprot and NCBI databases. The results demonstrated that in *C. gigas*, 36 ATG proteins belonging to the five complexes

implicated in initiation, nucleation, elongation, completion, and fusion of the autophagosome were identified (Table 3).

As in other eukaryotes, the ATG proteins involved in the core molecular mechanism of autophagy are present in *C. gigas* and their amino acid sequences are conserved compared to *S. cerevisiae* and *H. sapiens*. The *C. gigas* LC3 family members GABARAP, GABARAP protein-like 2 (GABARAPL2), and MAP1LC3A share respectively, 93, 74, and 73 % identity with the human counterpart sequences. The yeast counterpart sequences share respectively, 55 and 61 % identity with the GABARAP and GABARAPL2 protein sequences of *C. gigas*. Most of the ATG proteins that constitute the two conjugation systems, ATG12 and LC3, as well as the Atg9/mATG9 system, appear to be well conserved between human and Pacific oyster. Several proteins of the Atg1/ULK and PtdIns 3K complexes of *C. gigas*, including mTOR (62 %), phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PI3KC3) (63 %), and BECN1 (62 %), share a high percentage of sequence identity with *H. sapiens* counterparts.

Nevertheless, several ATG proteins identified in *S. cerevisiae* or *H. sapiens* are not present in *C. gigas*. This is the case for Atg17, Atg19, Atg20, Atg23, Atg24 (Sorting nexin-4), Atg27, Atg29, and Atg31 that are present only in yeast; and WIPI1 and MAP1LC3B, present only in *H. sapiens*.

### ***Molecular characterization and phylogenetic analysis of incomplete genes***

Due to the importance of *ATG7*, *ATG9*, *ATG12*, and *ULK1* in the core molecular machinery of the autophagy pathway, the complete sequences of these four genes were obtained by 5'/3' RACE-PCR and deposited in GenBank (Table 1).

The complete *ATG7* sequence (MK173046) contains 2334 nucleotides and 778 amino acids (Fig. 1). We found an open reading frame (ORF) of 2091 nucleotides and 696 amino acids, containing the two entire *ATG7\_N* and *Apg7* domains (Fig. 1A). The hypothetical isoelectric point is at 5.43 and the estimated molecular mass is 78.1 kDa. Nine homologous *ATG7* protein sequences from different animals were used for multiple sequence alignments (Fig. 1B). The results demonstrated that the two domain regions seem to be well conserved between all the species tested. The phylogenetic tree (Fig. 1C) based on the *ATG7* amino acid sequence from the same species showed that this protein is close to other mollusk species, and shares similarities with human *ATG7* protein. *Crassostrea virginica* shares 85 % identity (query cover of 99 %), and *Mizuhopecten yessoensis* 67% identity (query cover of 96 %), with our *ATG7* sequence. Moreover, the *H. sapiens* *ATG7* homolog shares 54 % identity with

*C. gigas* ATG7. The protein sequence seems to be different to other species like *C. elegans*, *D. melanogaster*, and *A. mellifera*.

The complete *ATG12* sequence (MK069431) comprises 309 amino acids and 929 nucleotides. This sequence presents one ORF of 357 bp and 118 amino acids, and contains the APG12 domain (Fig. 2A). The hypothetical isoelectric point is at 6.72 and the estimated molecular mass is 13.1 kDa. Alignment of the protein sequences from *ATG12* homolog species showed that the APG12 domain is highly conserved between all the tested species (Fig. 2B). The phylogenetic tree showed that all the mollusks are classified in the same group (Fig. 2C). This sequence shares high identity with *C. virginica* (94 %, query cover of 100 %) and *M. yessoensis* (64 %, query cover of 99 %). The *C. gigas* sequence is more similar to the *H. sapiens* than the *C. elegans* and *S. purpuratus* sequences. The *H. sapiens* sequence shares 62 % identity with *C. gigas*.

The sequence of *ATG9* (MK069430) comprises 3032 bp and 1010 amino acids. One ORF was found, consisting of 2409 nucleotides and 802 amino acids, and contains the entire APG9 domain (Fig. 3A). The hypothetical isoelectric point is at 5.88 and the estimated molecular mass is 91.9 kDa. Sequence alignment of the *ATG9* protein of different species showed that the APG9 domain is highly conserved (Fig. 3B). The phylogenetic tree demonstrated that the *C. gigas* *ATG9* sequence is similar to bivalves, like those from *C. virginica* (88 %, query cover of 97 %) and *Lingula anatina* (52 %, query cover of 99 %). This sequence is also similar to vertebrates. *H. sapiens* *ATG9A* shares 43 % identity with *C. gigas* (Fig. 3C).

The *ULK1* sequence was analyzed by RACE PCR, and a sequence of 1745 bp was obtained. However, no specific domains of the *ULK1* gene were identified in the sequence. The *ULK2* sequence was identified in *C. gigas* (Uniprot number: K1PNL8). This sequence consists of 2808 bp and 936 amino acids, and contains the entire STKc\_ULK1\_2-like domain (Fig. 4A). The hypothetical isoelectric point is at 8.64 and the estimated molecular mass is 103 kDa. The alignment of eight protein sequences from different organisms demonstrated that the STKc\_ULK1\_2-like domain situated in the first part of the sequence seems to be well conserved between the different species (Fig. 4B). The phylogenetic tree showed that the *ULK2* sequence is similar to vertebrate *ULK2* sequences (Fig. 4C). The *H. sapiens* sequence shares 34 % identity with the *C. gigas* sequence, and our sequence shares a high identity with other bivalve *ULK2* proteins, like those from *C. virginica* (94 %, query cover 100 %), *M. yessoensis* (60 %, query cover 99 %), and *L. anatina* (50 %, query cover 99 %).

### ***Expression of four ATG genes in C. gigas tissues***

The relative expression of key *ATG* genes of the two initiation complexes (*mTOR* and *BECN1*) and the LC3 conjugation system (*SQSTM1* and *MAP1LC3A*) was measured to determine in which *C. gigas* tissues autophagy occurs. All the tissues tested constitutively expressed *BECN1*, *mTOR*, *SQSTM1*, and *MAP1LC3A* (Fig. 5). However, the level of expression of each gene varied among the analyzed tissues.

### ***Detection of autophagy proteins in C. gigas***

Western blotting and immunohistochemistry approaches were used to confirm the presence of key *ATG* proteins of the two initiation complexes (*mTOR* and *BECN1*) and the LC3 conjugation system (*SQSTM1* and *MAP1LC3*) in *C. gigas* tissues.

The Western blot analysis revealed that the autophagy proteins *BECN1*, *MAP1LC3*, *mTOR*, and *SQSTM1* were abundant in all the tested tissues of the Pacific oyster (Fig. 6). While *MAP1LC3-I* appeared to be expressed in all the tissues tested, the *MAP1LC3-II* form was strongly detected in the mantle and gills.

The immunohistochemistry results obtained from *C. gigas* tissues confirmed the results obtained by Western blot and allowed to better detect the localization of autophagy proteins in the tissues (Fig. 7). No labelling was observed in the negative control *C. gigas* tissues (Fig. 7a-f). In contrast, in the presence of the four primary antibodies, labelling (corresponding to the formation of brown precipitates) was observed in the mantle, gills, gonad, and digestive gland. Each protein exhibited a specific localization pattern. The *SQSTM1* protein was detected in the epithelium of the mantle and gills (Fig. 7g,i), nervous tissue, connective tissue (Fig. 7h), and glandular cells of the digestive tubules (Fig. 7j). Spots of strong *MAP1LC3A* staining were observed in vesicular cells of connective tissue, mantle (Fig. 7k), and digestive epithelium (Fig. 7m). A diffuse labelling was observed in muscular fibers (Fig. 7l) and in granular cells of the digestive tubules (Fig. 7n). For the *BECN1* protein, positive staining was observed in glandular cells of the digestive tubules (Fig. 7r), some cells of the gill filament (Fig. 7q), nervous tissue (Fig. 7o), and mantle and gonad epithelia (Fig. 7p). *mTOR*-specific antibodies stained the muscle, nervous tissue, and some nuclei of mantle epithelial cells (Fig. 7s), connective tissue in gills and gonad (Fig. 7u,t), nuclei of oocytes, and glandular cells in the digestive tubules (Fig. 7v).

## Discussion

Macroautophagy, more commonly simply called autophagy, is a mechanism widely conserved in eukaryotes and has been described for model organisms like yeast, humans, worms, and insects [1,9]. However, in many organisms like mollusks, autophagy is still poorly understood. Although several ATG proteins have been reported in mollusks, information on the components of the molecular machinery of the autophagy pathway in this phylum remains scarce. Moreover, the localization of autophagy activity in bivalve tissues has not been explored.

Mollusk bivalves are generally exposed to numerous biotic (pathogens) and abiotic (tide, pollution) stressors. Initial studies demonstrated that the autophagy pathway can play an important role in the response to these different stress factors [12,18,19], highlighting the importance of elucidating the autophagy pathway in mollusk bivalves. In this study, we characterized the autophagy pathway by data mining of the Pacific oyster genome [14]. Real-time quantitative PCR, Western blotting, and immunohistochemistry were used to study the ATG proteins that constitute the *C. gigas* autophagy pathway, and the expression of four key genes and proteins were analyzed in different tissue compartments of the Pacific oyster.

The core molecular machinery of autophagy comprises five complexes containing ATG proteins conserved from yeast to mammals [5,7]. Our results showed that the major ATG proteins and the different complexes of the core molecular machinery are present and expressed in the Pacific oyster (Fig. 8). The autophagy pathway in *C. gigas* is conserved among eukaryotes, from the initiation of autophagy by ULK and the PtdIns3K complex to autophagosome formation by the Atg9/mATG9 cycling system and two conjugation systems, ATG12 and LC3.

Our results also showed conserved sequences and conserved domains in some proteins of the autophagy pathway. Several key ATG proteins of the two complexes of the initiation step (BECN1 and ULK2) and the LC3 conjugation system (GABARAP/LC3 family members, SQSTM1) were highly conserved. BECN1 plays a role as a platform for assembly and stimulation of activity [20], whereas ULK2 mediates membrane targeting, vesicle tethering, and co-assembly of subunits [21–23]. LC3 family members and SQSTM1 are important for membrane isolation during the elongation step [24] and cargo recognition of polyubiquitinated proteins, respectively [25–28]. Except for ULK2, the domains that comprise these proteins are the same as for their *H. sapiens* counterparts [20,24,29,30]. These data

suggest that the role of these proteins is conserved between mollusks and mammals. In support of these results, the ATG proteins BECN1 and MAP1LC3 were reported to be phylogenetically close to their human orthologs [12]. Moreover, higher eukaryotes of different phyla (worms, insects, plants, mammals) have essentially similar roles compared to yeast [31,32].

Some other *C. gigas* ATG protein sequences were incomplete and some were not found. The sequences of several proteins implicated in the LC3 and ATG12 conjugation systems (ATG7 and ATG12) and the Atg9/mATG9 cycling system (ATG9) were incomplete. However, these proteins that are conserved in other invertebrates like the crustacean *Macrobrachium rosenbergii* [10], play important roles in the mechanism of autophagy. In our study, we obtained the complete sequences for *ATG7*, *ATG12*, and *ATG9* by RACE-PCR. The amino acid sequences of these three proteins are highly conserved with their eukaryotic counterparts. Moreover, the domains are also conserved and similar to *H. sapiens* protein counterparts, suggesting a conserved function for these proteins as with the other eukaryotes. *ATG7* and *ATG12* mediate the tethering of a phosphatidylethanolamine on the MAP1LC3 protein, and *ATG9* regulates/participates in the delivery of membrane for the formation of autophagosomes [33,34]. The full characterization of *ATG7*, *ATG12* and *ATG9* by RACE-PCR demonstrated that the genome assembly of *C. gigas* by Zhang *et al.* [14] is not reliable or have annotation problems.

We did not find MAP1LC3B, ULK1, and WIPI 1 proteins in *C. gigas*. Nevertheless, these proteins play important roles in the mechanisms of autophagy [35–37]. MAP1LC3B is the more commonly described and studied LC3/GABARAP family member [37]. Schaff [37] reported that this protein is implicated in phagophore elongation, promotes tethering and membrane fusion. ULK1 is involved in the phosphorylation of BECN1, activation of the PtdIns3K complex, and promotion of autophagy [38]. WIPI1 is known to play an essential function in mammals [36]. Meanwhile, WIPI1, WIPI2, and WIPI4 are redundant PtdIns3P downstream effectors of PI3KC3-mediated PtdIns3P production at the onset of autophagy [36]. Nevertheless, the specific role of each ULK1 homolog and each WIPI and LC3/GABARAP families members remains unclear [24,36,39]. We do not know if the absence of these proteins can affect the autophagy machinery, or if their function is replaced by redundancy with other family members. In addition, we cannot conclude whether the proteins are simply not present in *C. gigas*, or whether the absence is due to issues with the annotation or assemblage of the *C. gigas* genome.



Moreover, other ATG proteins (Atg17, Atg19, Atg20, Atg23, Atg24, Atg27, Atg29, and Atg31) specific to other autophagy-related pathways defined in yeast (starvation-induced autophagy, cytoplasm vacuole targeting, and pexophagy pathways) [40] were not found in *C. gigas*. These proteins are not essential for the functioning of the core molecular machinery and are not required for the formation of the autophagosome [40].

Using real-time PCR, Western blotting, and IHC, we detected the expression of four genes and proteins, namely, mTOR, SQSTM1, BECN1, and MAP1LC3A in different tissues of the Pacific oyster. According to the real-time PCR and Western blotting results, MAP1LC3A, SQSTM1, mTOR, and BECN1 were constitutively expressed in the mantle, gills, muscle, labial palps, digestive gland, gonad, heart, and haemolymph at both the gene and protein levels. Similar results were obtained for the abalone *Haliotis diversicolor* [11]. The presence of the MAP1LC3, SQSTM1, and BECN1 proteins was also detected by Western blot in various tissues of the giant freshwater prawn *M. rosenbergii* including in the hepatopancreas, ovary, muscle, brain, eyestalk, and thoracic glands [10].

The IHC analysis using the four antibodies revealed diffuse staining in the mantle, gills, gonad, and digestive gland of the Pacific oyster, *C. gigas*. This phenomenon has been frequently reported for mammal tissues labelled with MAP1LC3 and BECN1-specific antibodies [41,42]. With IHC, a diffuse staining is more commonly observed in tissues than a characteristic spot staining pattern [41]. In *M. rosenbergii*, the MAP1LC3 and SQSTM1 proteins were detected in the gonad by IHC [10].

The results showed that autophagy is constitutively detected at both the molecular and protein levels in the tested tissues of the Pacific oyster. Several studies have already reported that autophagy is implicated in a variety of cellular processes like innate immunity, response to environmental stressors (like anoxia and hyperthermia), and embryonic and larval development in mollusks [11,12,18,19,43]. However, in *C. gigas*, the cellular functions of autophagy need to be further investigated.

## Conclusion

We identified and characterized for the first time the core molecular machinery of the autophagy pathway in a mollusk bivalve, the Pacific oyster, *C. gigas*. We demonstrated that this machinery is conserved with other eukaryotic organisms (Fig. 8). The Pacific oyster autophagy pathway proteins are more similar to the mammal than insect and yeast Atg

proteins. However, some key genes could not be identified, highlighting that a more complete genome sequence for *C. gigas* is required. Through a combination of different approaches including real-time quantitative PCR, Western blotting, and immunohistochemistry developed in this study, we have shown that the autophagy pathway is constitutively expressed in the different tested tissues of the Pacific oyster. In the future, these findings and the different molecular approaches used will be applied to elucidate the role of the autophagy pathway in *C. gigas* and other bivalves in response to biotic and abiotic stimuli, such as environmental stressors or pathogenic organisms.

## References

- [1] D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod, Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *J. Pathol.* 221 (2010) 3–12. doi:10.1002/path.2697.
- [2] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in Mammalian Autophagy Research, *Cell.* 140 (2010) 313–326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028.
- [3] Y. Ohsumi, Historical landmarks of autophagy research, *Cell Res.* 24 (2014) 9–23. doi:10.1038/cr.2013.169.
- [4] A. Kuma, M. Komatsu, N. Mizushima, Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice, *Autophagy.* 13 (2017) 1619–1628. doi:10.1080/15548627.2017.1343770.
- [5] Z. Yang, D.J. Klionsky, An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335 (2009) 1–32. doi:10.1007/978-3-642-00302-8\_1.
- [6] H. Suzuki, T. Osawa, Y. Fujioka, N.N. Noda, Structural biology of the core autophagy machinery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 43 (2017) 10–17. doi:10.1016/j.sbi.2016.09.010.
- [7] Z. Yang, D.J. Klionsky, Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014.
- [8] X. Zhou, P. Zhao, W. Wang, J. Zou, T. Cheng, X. Peng, M. Sun, A comprehensive, genome-wide analysis of autophagy-related genes identified in tobacco suggests a central role of autophagy in plant response to various environmental cues, *DNA Res.* 22 (2015) 245–257. doi:10.1093/dnares/dsv012.
- [9] Z. Xie, D.J. Klionsky, Autophagosome formation: core machinery and adaptations, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1102–1109. doi:10.1038/ncb1007-1102.
- [10] S. Suwansa-Ard, W. Kankuan, T. Thongbuakaew, J. Saetan, N. Kornthong, T. Kruangkum, K. Khornchatri, S.F. Cummins, C. Isidoro, P. Sobhon, Transcriptomic analysis of the autophagy machinery in crustaceans, *BMC Genomics.* 17 (2016) 587. doi:10.1186/s12864-016-2996-4.
- [11] R. Bai, W. You, J. Chen, H. Huang, C. Ke, Molecular cloning and expression analysis of GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) from small abalone, *Haliotis diversicolor*, *Fish Shellfish Immunol.* 33 (2012) 675–682. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.003.
- [12] P. Moreau, K. Moreau, A. Segarra, D. Tourbiez, M.-A. Travers, D.C. Rubinsztein, T. Renault, Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-

- 1 and *Vibrio aestuarianus* infections, *Autophagy*. 11 (2015) 516–526. doi:10.1080/15548627.2015.1017188.
- [13] V. Barbosa Solomieu, T. Renault, M.-A. Travers, Mass mortality in bivalves and the intricate case of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, *J. Invertebr. Pathol.* 131 (2015) 2–10. doi:10.1016/j.jip.2015.07.011.
- [14] G. Zhang, X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, et al., The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation, *Nature*. 490 (2012) 49–54. doi:10.1038/nature11413.
- [15] J.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 4876–4882.
- [16] R. Rasmussen, Quantification on the LightCycler, in: S. Meuer, C. Wittwer, K.-I. Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR Methods Appl.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001: pp. 21–34. doi:10.1007/978-3-642-59524-0\_3.
- [17] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [18] T. Balbi, K. Cortese, C. Ciacci, G. Bellese, L. Vezzulli, C. Pruzzo, L. Canesi, Autophagic processes in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Effects of *Vibrio tapetis*, *Fish Shellfish Immunol.* 73 (2018) 66–74. doi:10.1016/j.fsi.2017.12.003.
- [19] M.N. Moore, A. Viarengo, P. Donkin, A.J.S. Hawkins, Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels, *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 84 (2007) 80–91. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.007.
- [20] E. Wirawan, S. Lippens, T. Vanden Berghe, A. Romagnoli, G.M. Fimia, M. Piacentini, P. Vandenabeele, Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond, *Autophagy*. 8 (2012) 6–17. doi:10.4161/auto.8.1.16645.
- [21] Y.-Y. Yeh, K.H. Shah, P.K. Herman, An Atg13 protein-mediated self-association of the Atg1 protein kinase is important for the induction of autophagy, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 28931–28939. doi:10.1074/jbc.M111.250324.
- [22] M.J. Ragusa, R.E. Stanley, J.H. Hurley, Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis, *Cell*. 151 (2012) 1501–1512. doi:10.1016/j.cell.2012.11.028.
- [23] E.Y.W. Chan, A. Longatti, N.C. McKnight, S.A. Tooze, Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 157–171. doi:10.1128/MCB.01082-08.

- [24] Y.-K. Lee, J.-A. Lee, Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy, *BMB Rep.* 49 (2016) 424–430. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.8.081.
- [25] T. Lamark, V. Kirkin, I. Dikic, T. Johansen, NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets, *Cell Cycle Georget. Tex.* 8 (2009) 1986–1990. doi:10.4161/cc.8.13.8892.
- [26] M. Komatsu, Y. Ichimura, Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1374–1378. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.017.
- [27] M. Komatsu, S. Waguri, M. Koike, Y.-S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J.-I. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S.-I. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice, *Cell.* 131 (2007) 1149–1163. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035.
- [28] G. Bjørkøy, T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, T. Johansen, p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 603–614. doi:10.1083/jcb.200507002.
- [29] X. Lin, S. Li, Y. Zhao, X. Ma, K. Zhang, X. He, Z. Wang, Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy, *DNA Cell Biol.* 32 (2013) 220–227. doi:10.1089/dna.2012.1915.
- [30] X. Wang, E.J.M. Terpstra, Ubiquitin receptors and protein quality control, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 55 (2013) 73–84. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.09.012.
- [31] Z. Xie, D.J. Klionsky, Autophagosome formation: core machinery and adaptations, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 1102–1109. doi:10.1038/ncb1007-1102.
- [32] T. Yorimitsu, D.J. Klionsky, Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2 (2005) 1542–1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765.
- [33] Z. Yang, D.J. Klionsky, Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014.
- [34] D.J. Klionsky, B.A. Schulman, Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 336–345. doi:10.1038/nsmb.2787.
- [35] E.-J. Lee, C. Tournier, The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy, *Autophagy.* 7 (2011) 689–695.

- [36] T. Proikas-Cezanne, Z. Takacs, P. Dönnès, O. Kohlbacher, WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome, *J Cell Sci.* 128 (2015) 207–217. doi:10.1242/jcs.146258.
- [37] M.B.E. Schaaf, T.G. Keulers, M.A. Vooijs, K.M.A. Rouschop, LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 30 (2016) 3961–3978. doi:10.1096/fj.201600698R.
- [38] R.C. Russell, Y. Tian, H. Yuan, H.W. Park, Y.-Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T.P. Neufeld, A. Dillin, K.-L. Guan, ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase, *Nat. Cell Biol.* 15 (2013) 741–750. doi:10.1038/ncb2757.
- [39] F. McAlpine, L.E. Williamson, S.A. Tooze, E.Y.W. Chan, Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2, *Autophagy.* 9 (2013) 361–373. doi:10.4161/auto.23066.
- [40] H. Nakatogawa, K. Suzuki, Y. Kamada, Y. Ohsumi, Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 458–467. doi:10.1038/nrm2708.
- [41] D.J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, M.J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena, H. Adachi, et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy.* 12 (2016) 1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356.
- [42] W. Martinet, L. Roth, G.R.Y. De Meyer, Standard Immunohistochemical Assays to Assess Autophagy in Mammalian Tissue, *Cells.* 6 (2017). doi:10.3390/cells6030017.
- [43] M.N. Moore, Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress, *Autophagy.* 4 (2008) 254–256.

## Figure captions

**Figure 1.** Phylogenetic analysis of autophagy protein ATG7 of the Pacific oyster. A. Schematic annotation of the ORF protein sequence. B. Global alignment of counterpart proteins sequences of ATG7 from animals of different part of the animal kingdom. Dashes (-) indicate gaps. C. Neighbour-joining tree (bootstrap=1000 replications) of the different autophagy proteins.

**Figure 2.** Phylogenetic analysis of autophagy protein ATG12 of the Pacific oyster. A. Schematic annotation of the ORF protein sequence. B. Global alignment of counterpart proteins sequences of ATG12 from animals of different part of the animal kingdom. Dashes (-) indicate gaps. C. Neighbour-joining tree (bootstrap=1000 replications) of the different autophagy proteins.

**Figure 3.** Phylogenetic analysis of autophagy protein ATG9 of the Pacific oyster. A. Schematic annotation of the ORF protein sequence. B. Global alignment of counterpart proteins sequences of ATG9 from animals of different part of the animal kingdom. Dashes (-) indicate gaps. C. Neighbour-joining tree (bootstrap=1000 replications) of the different autophagy proteins.

**Figure 4.** Phylogenetic analysis of autophagy protein ULK2 of the Pacific oyster. A. Schematic annotation of the ORF protein sequence. B. Global alignment of counterpart proteins sequences of ULK2 from animals of different part of the animal kingdom. Dashes (-) indicate gaps. C. Neighbour-joining tree (bootstrap=1000 replications) of the different autophagy proteins.

**Figure 5.** Relative gene expression of *BECN1*, *mTOR*, *SQSTM1* and *MAP1LC3A* in different tissues of *Crassostrea gigas* by real time PCR.

**Figure 6.** Detection of the protein BECN1, mTOR, SQSTM1 and MAP1LC3 in different tissues of *Crassostrea gigas*.

**Figure 7.** Immunohistochemical detection of BECN1, mTOR, SQSTM1 and MAP1LC3A in several tissues of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. (a) Mantle with connective tissue, nerf and muscle, (b) gonad, (c) gills, (d) digestive tubules, (e) muscle, (f) digestive gland epithelium, (g) mantle with connective tissue, (h) nerf in the mantle connective tissue, (i) gills, (j) digestive tubules, (k) mantle with connective tissue, (l) muscle, (m) digestive gland epithelium and connective tissue, (n) digestive tubule, (o) mantle with connective tissue, nerf and muscle, (p) gonad, (q) gills, (r) digestive tubules, (s) mantle with nerf and muscle, (t) gonad, (u) gills and (v) digestive tubule. Scale bar = 20  $\mu$ m.

**Figure 8.** Molecular and cellular autophagy pathway of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. RE: reticulum endoplasmic

## Table captions

**Table 1.** Gene sequences obtained by RACE PCR from autophagy genes *ATG7*, *ULK1*, *ATG12*, and *ATG9* in haemocytes of *C. gigas*. The percentage of identity were obtained by alignment of amino acid sequences.

**Table 2.** List of the oyster housekeeping and autophagy genes targeted by real-time PCR.

**Table 3.** List of the autophagy proteins in the Pacific oyster (*C. gigas*) in comparison with the human (*Homo sapiens*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteins of the autophagy pathway. (-) The protein is not present in this specie. \* Domain with incomplete sequence

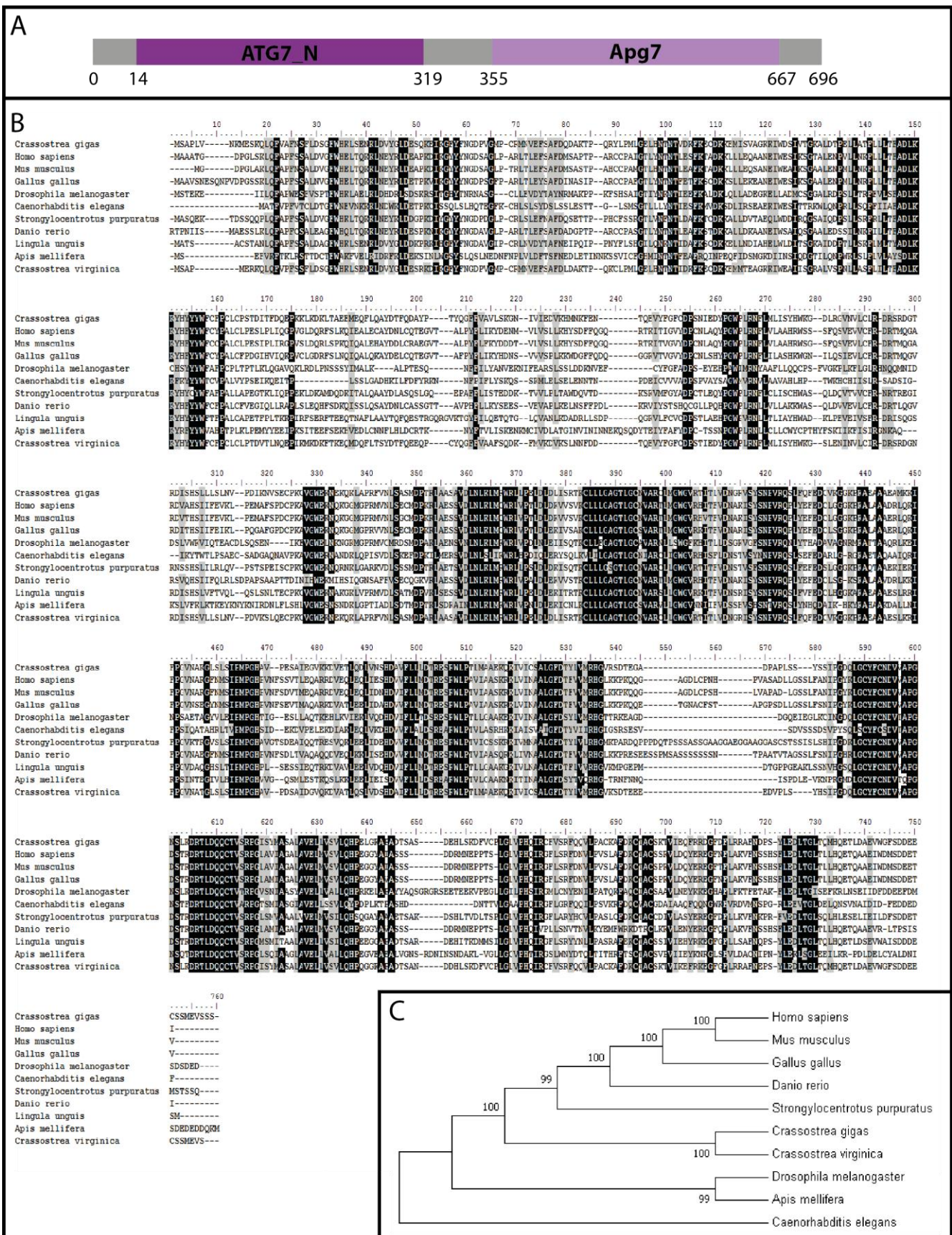
## Supplementary files (cf. Annexes)

**Supplementary file 1.** List of amino acid sequences of the three animals (*Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* and *Crassostrea gigas*) collected during the identification of the autophagy proteins in *C. gigas*. (Annexe B)

**Supplementary file 2.** List of amino acid sequences of the species used to performed phylogeny analysis of *ATG7*, *ATG9*, *ATG12* and *ULK2*. (Annexe C)



ATG7



ATG12

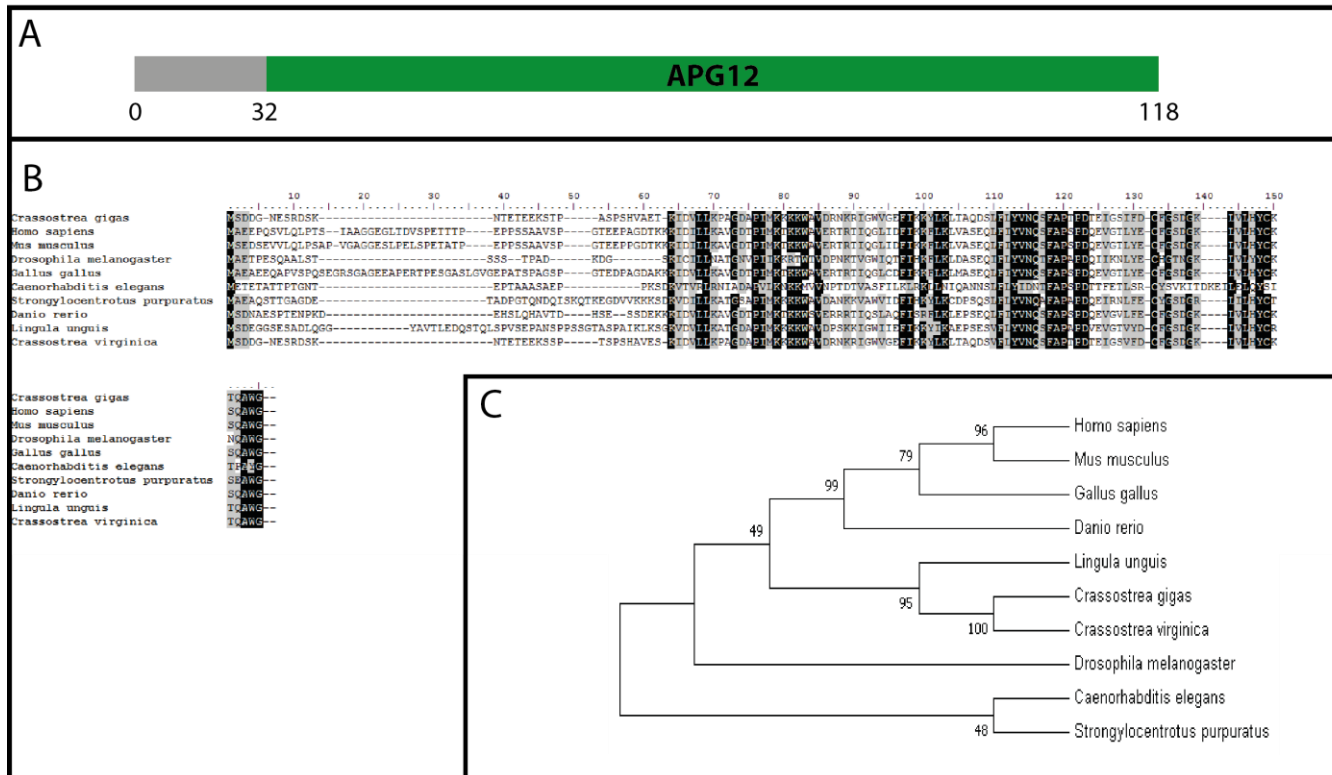


Figure 2

ATG9

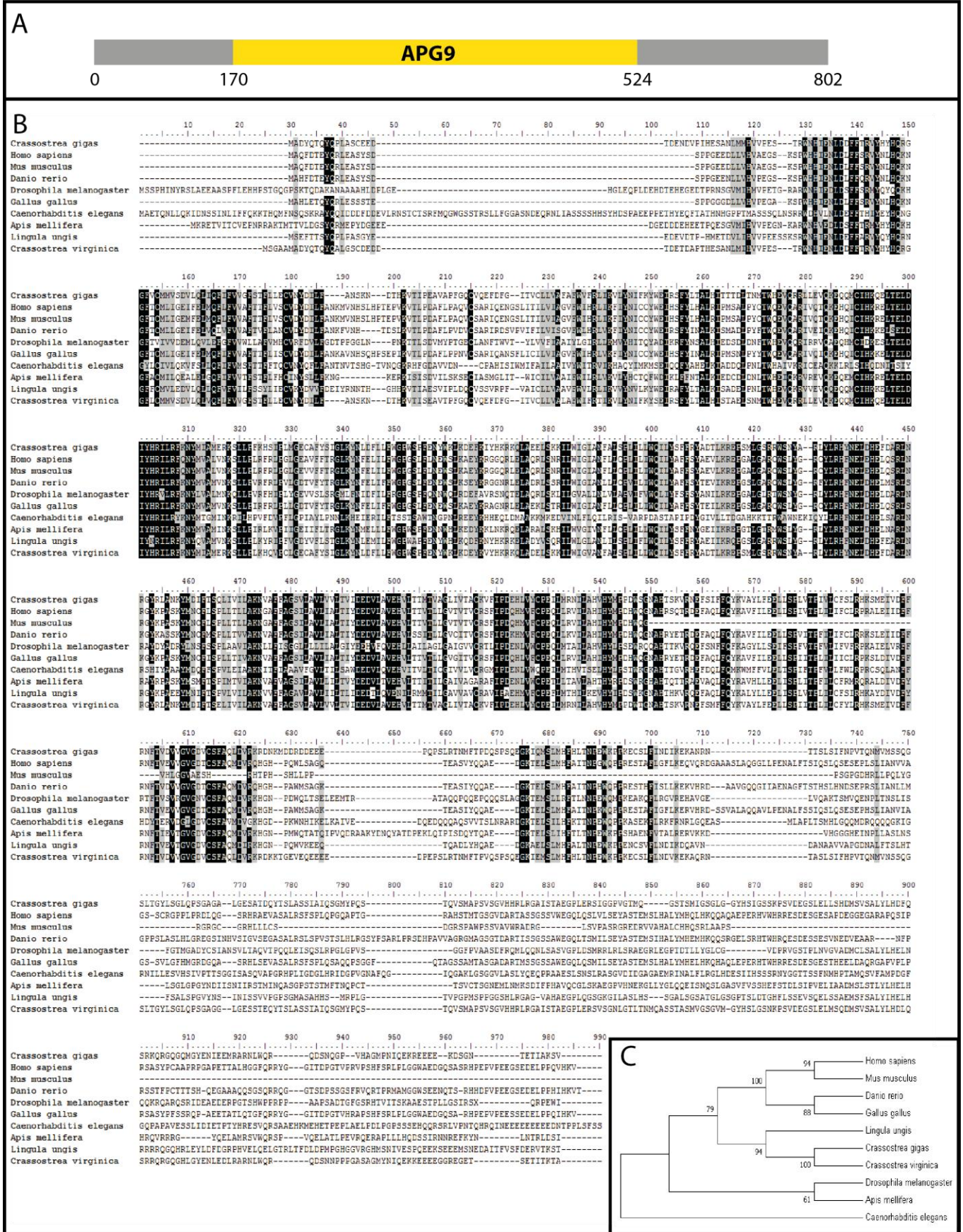


Figure 3

ULK2

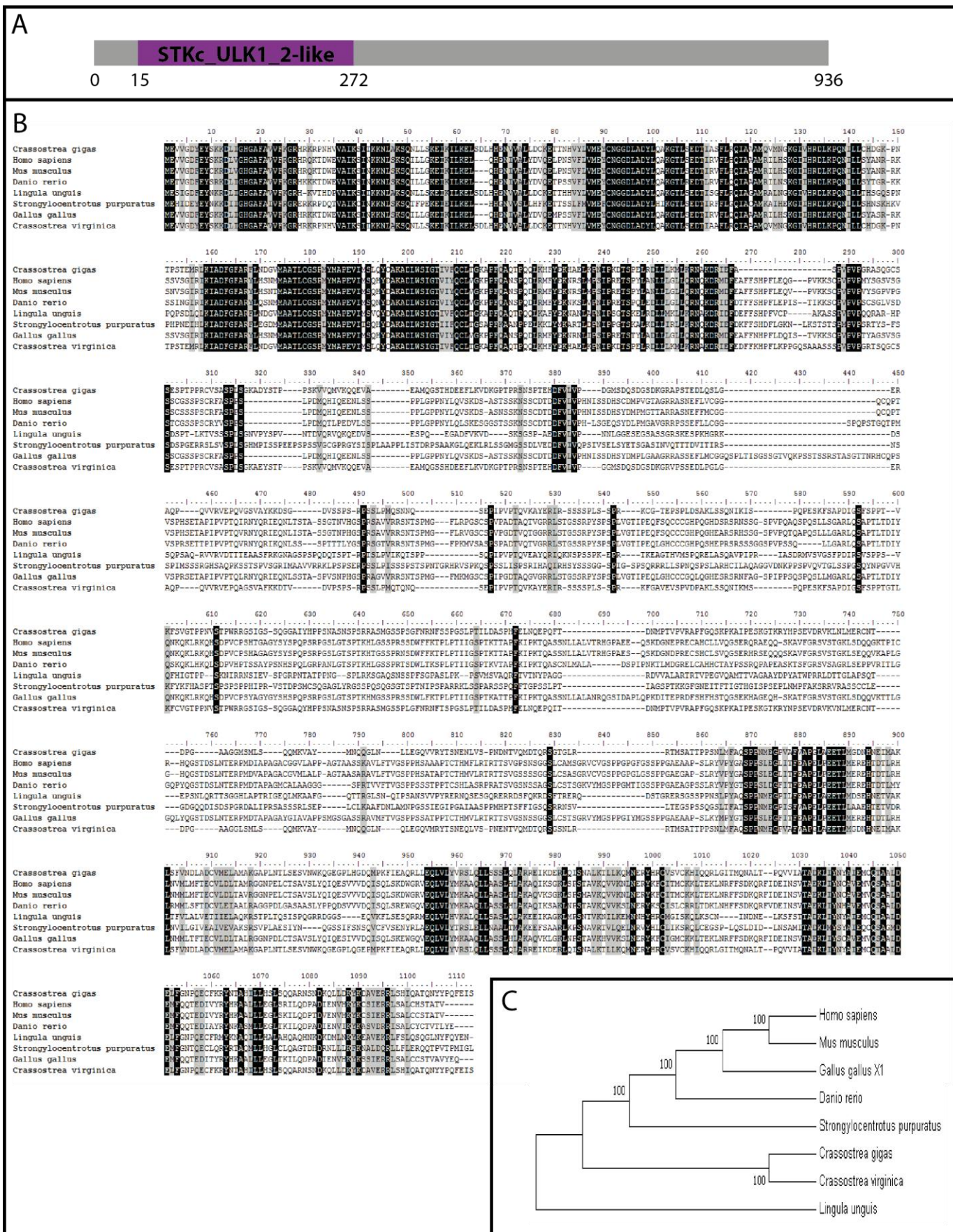


Figure 4

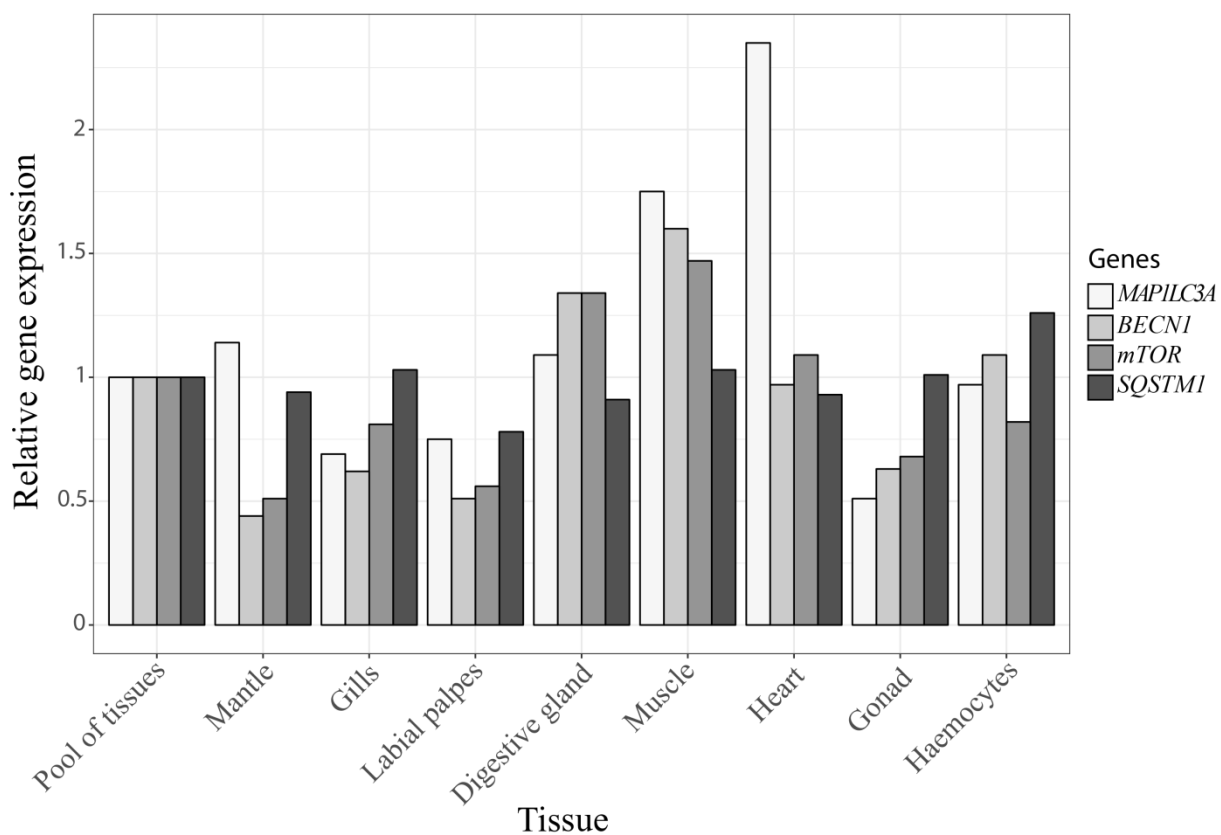


Figure 5

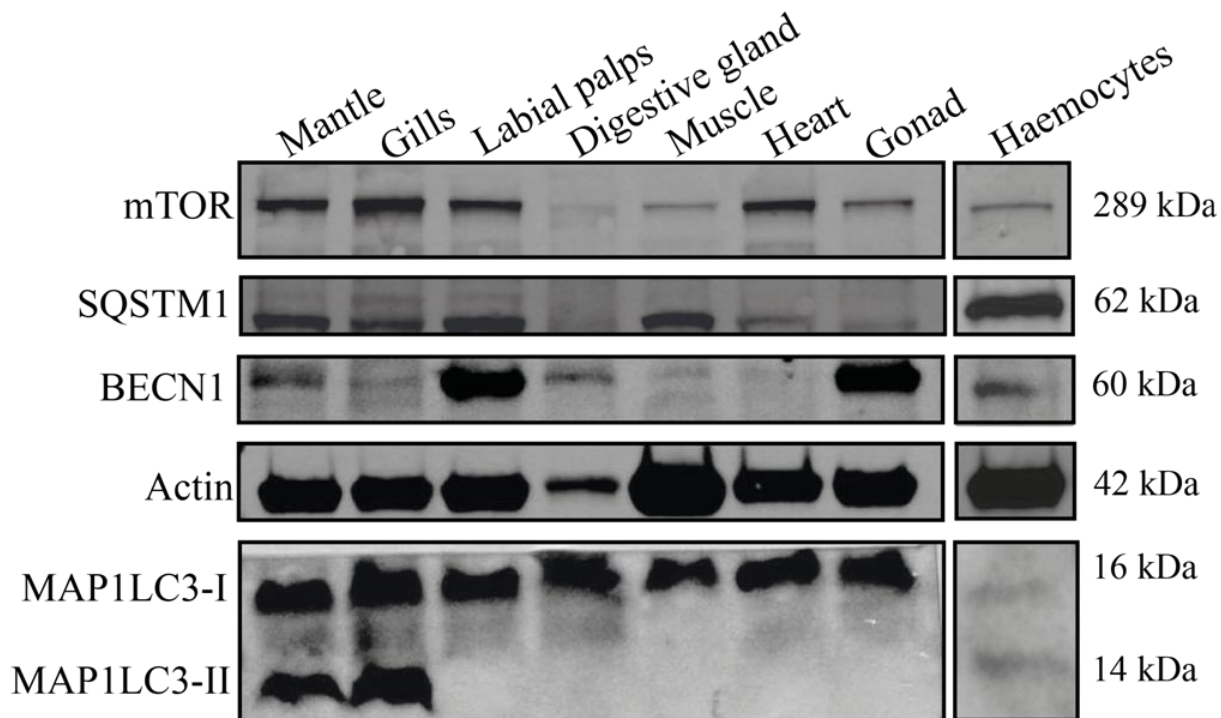


Figure 6

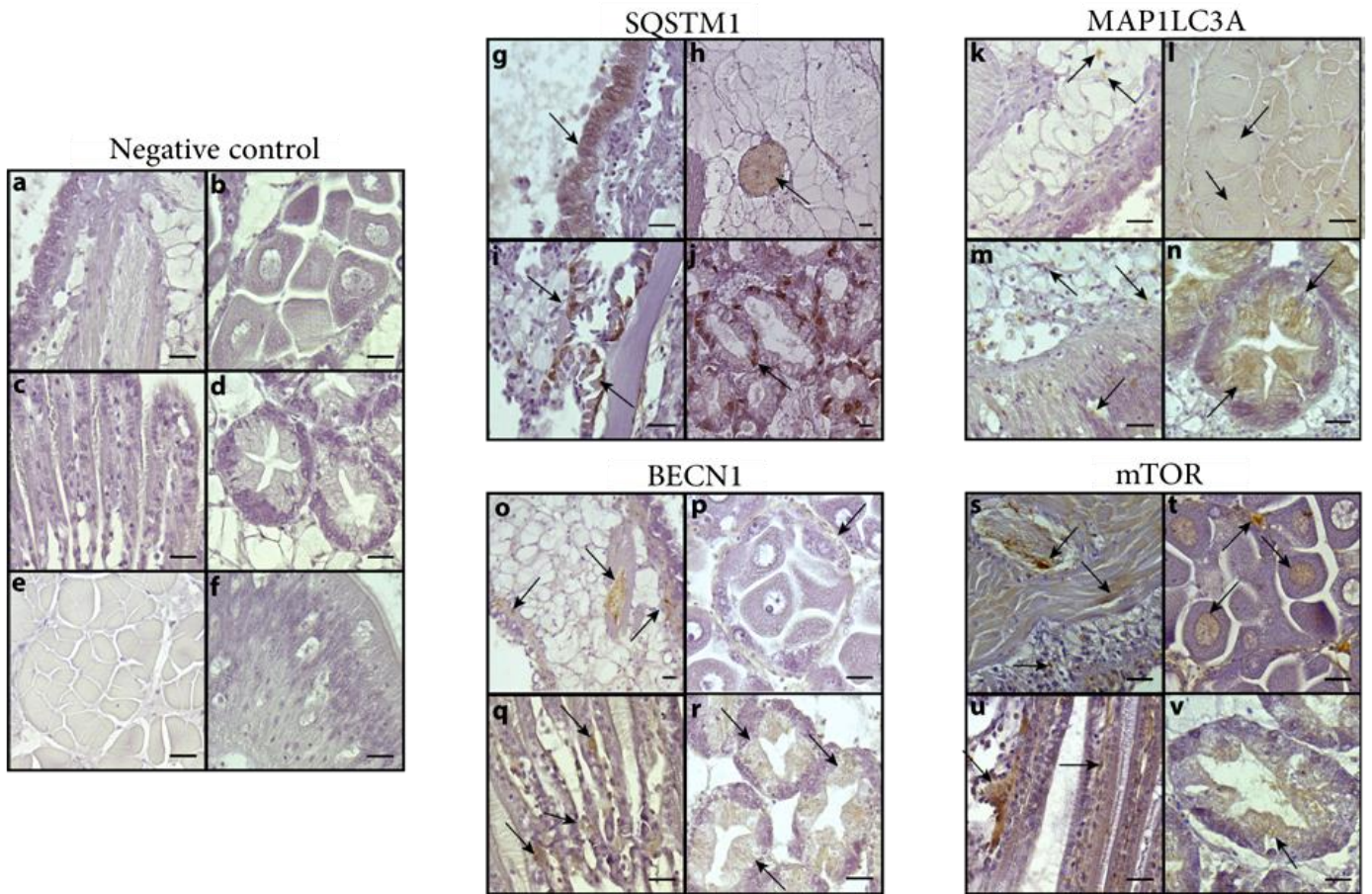


Figure 7

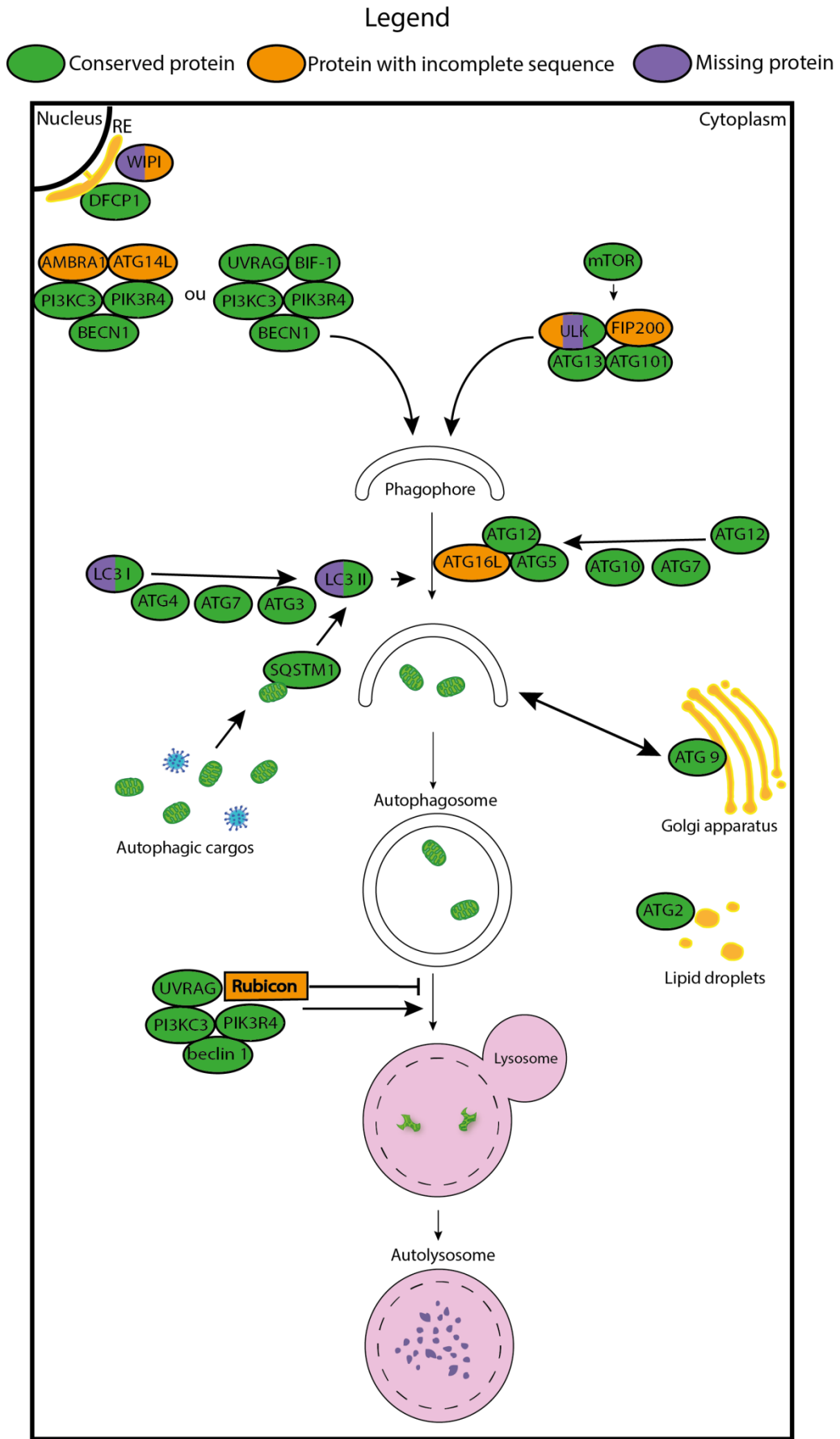


Figure 8

Table 1

Gene name	Gene Length	Protein length	GenBank accession	Identity with H. sapiens	Identity with S. cerevisiae	Isoelectric point	Molecular weight	Sequence RACE
<i>ATG 7</i>	2334	696	MK173046	54 %	39 %	5.43	78.1 kDa	3'GGACTATCCAGGCTGGCCTCTTAGG 5'GGGGGCAGACAAAGTCTTTACTCAGG
<i>ULK1</i>	1745	-	-	-	-	-	-	3'CCTGTTTTTATGGACCGGAAGTTCT 5'CTAAACACCCTCCTGCCGTACCACAT
<i>ATG12</i>	929	118	MK069431	62 %	19 %	6.72	13.1 kDa	3'ACCAGCTGGAGATGCTCCAATTATGA 5'GTTTCCATCACTCCCAAAGCAATCA
<i>ATG9</i>	3032	1010	MK069430	43 %	19 %	5.88	91.9 kDa	3'GCTCCTTTTATCTCACTGCCCTCCAC 5'CCGGTGGTATATGTCCAGCTCTGT

Table 2

Gene name	Abbreviation	Forward primer	Reverse primer	Efficiency (%)
microtubule associated protein 1A/1B light chain A	<i>MAP1LC3A</i>	CCGATGCTTGACAAGACCAA	CCGTCCTCGTCTTTCTCCTG	98.2
Beclin 1	<i>BECN1</i>	AAATGCTGCTTGGGGTCAGA	CGGAATCCACCAGACCCATA	102.2
serine/threonine protein kinase TOR	<i>mTOR</i>	GGCATGTTCTCTACCCTGGA	TCCTTGACGTTCTCTGACCT	106.7
sequestosome -1	<i>SQSTM1</i>	AGGGAATGAGAAGGCCGAAA	CCTCAAGCAACTCCTCTCCA	96.5
Elongation factor 1-alpha	<i>EF1-<math>\alpha</math></i>	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAAG	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	98.8



Table 3

Saccharomyces cerevisiae			Homo sapiens			Crassostrea gigas					
Name	NCBI Accession number	Amino acid number	Identity in comparison with C. gigas	Name	NCBI or Uniprot Accession number	Amino acid number	Identity in comparison with C. gigas	Name	NCBI or Uniprot Accession number	Amino acid number	Domains of C. gigas
Serine/threonine-protein kinase TOR1	P35169/AJR75461.1	2470	38%	serine/threonine-protein kinase mTOR	P42345	2549	62%	Serine/threonine-protein kinase TOR	K1PYM7/EKC29347	2392	PIKKc_TOR, FAT
	Serine/threonine-protein kinase TOR2	P32600	2474		39%	Serine/threonine-protein kinase ULK1	O75385		1050	11%	K1QJ91/EKC36832.1
Serine/threonine-protein kinase ATG1	-	-	-	Serine/threonine-protein kinase ULK2	O81Y18/AAH34988.1	1036	34%	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase ULK3	K1PNL8/EKC18065.1	936	STKc_UKL1_2-like, S_TKc_Pkinase, SPS1
	-	-	-		Serine/threonine-protein kinase ULK3	Q6PHR2	472		49%	XP_011415026.1	490
Autophagy-related protein 13	Q06628	738	15%	Autophagy-related protein 13	Q9C645	1275	31%	Serine/threonine-protein kinase ULK4	K1QQA6	1897	ATKc_ULK4, S_TKc_SPS1*, WSC3
	Autophagy-related protein 29	Q12092	213		-	Autophagy-related protein 13	O75143		517	35%	K1QJF8/XP_011420129.1
Autophagy-related protein 31	Q12421	196	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autophagy-related protein 20	Q07528	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorting nexin-4	P47057	423	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autophagy-related protein 17	Q06410	417	-	RBI1-inducible coiled-coil protein 1	Q81DY2/BAB69690.1	1594	8%	RBI1 inducible coiled-coil protein 1	K1QSB9/EKC24556.1	313	ATG11, Sme*, SMC, prok_A*
Autophagy-related protein 11	Q12527	1178	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Autophagy-related protein 19	P35193	415	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	Autophagy-related protein 101	Q9BSB4/NP_06753.2	218	63%	autophagy-related protein 101	K1R7A8/XP_011447317.1	218	ATG 101
-	-	-	-	Zinc finger FYVE domain-containing protein 1	Q9HBF4/NP_067083.1	777	43%	Zinc finger FYVE domain-containing protein 1	K1QVT2/EKC37743.1	652	GBP, FYVE, ZFYV1-2
Autophagy-related protein 9	Q12142	997	9%	Autophagy-related protein 9A	Q7Z3C6	839	11%	Autophagy-related protein 9	K1Q6P8/EKC24520.1	302	3 sequences containing APC9*
			4%	Autophagy-related protein 9B	Q674R7	924	8%				
			11%	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1	Q5MNZ9	446	7%				
-	-	-	-	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2	NP_056425.1	454	66%	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2	K1QZR2/EKC39143.1	438	WD40*
Autophagy-related protein 18	P45601	500	24%	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3	Q5MNZ6	343	77%	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3	K1PZL8/XP_011445706.1	344	WD40*
-	-	-	-	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	Q9Y484	360	60%	PREDICTED: WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4-like	XP_011454240.1	338	WD40*
Autophagy-related protein 2	P53855	1592	23%	Autophagy-related protein 2 homolog A	Q2TAZ0	1938	26%	Autophagy-related protein 2-like protein A	K1RS2/EKC37546.1	1351	VPS13_C*, ATG2, CAD
Autophagy-related protein 23	Q06671	453	18%	autophagy-related protein 2 homolog B	Q96BY7	2078	11%	Autophagy-related protein 2-like protein B	K1Q177/EKC37547.1	622	Chorein_N, MRS6
Autophagy-related protein 27	P46989	271	19%	-	-	-	-	Uncharacterized protein	K1QA43	236	ATG27 superfamily*

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>Homo sapiens</i>				<i>Crassostrea gigas</i>			
name	NCBI Accession number	Amino acid number	Identity in comparison with <i>C. gigas</i>	name	NCBI or Uniprot Accession number	Amino acid number	Identity in comparison with <i>C. gigas</i>	name	NCBI or Uniprot Accession number	Amino acid number	Domains of <i>C. gigas</i>
Phosphatidylinositol 3-kinase VPS 34	P22543	875	36%	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	Q8NEB9	887	63%	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	K1PVC2/EKC20235.1	897	C2_PPK_Class_III_PPK_C2_P3Ka_III_PFKC_III_PFKC_P3_P4_kinase
Serine/threonine-protein kinase VPS15	P22219	1454	25%	phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	Q99570/ NP_055417.1	1358	43%	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4	K1R976/XP_011416324.1	1360	STKc_Vps15_SPS1_WD40
Vacuolar protein sorting-associated protein 30	Q02948	557	25%	Beclin 1	Q14457	450	62%	Beclin 1	K1QHY7	454	APG6, BHD
Autophagy-related protein 14	P38270	344	15%	beclin 1-associated autophagy-related key regulator	Q6ZNE5	492	26%	Uncharacterized protein	K1QSF1/EKC39832.1	484	e = ATG14, PTZ00121*, ShcC*, DPM2*
-	-	-	-	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	Q9C0C7	1298	25%	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	K1QJ33/EKC40557.1	983	WD40*
Vacuolar protein sorting-associated protein 38	Q05919	439	16%	UV radiation resistance-associated gene protein	Q9P2Y5	699	26%	UV radiation resistance-associated protein	XP_019925412.1	556	Agl14
-	-	-	-	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	Q92622	972	31%	PREDICTED: run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	XP_011419540.1	795	RUN_ZERING_9*
-	-	-	-	Endophilin-B1	Q9Y371	365	57%	Endophilin-B1	K1Q9G3	375	BAR_Endophilin_B_SHG_Endophilin_B
Ubiquitin-like protein ATG12	P38316	186	19%	ubiquitin-like protein ATG12	Q94817	140	48%	PREDICTED: ubiquitin-like protein ATG12	XP_011416102.1	118	APG12, APG12_C
Autophagy protein 5	Q12380	294	20%	Autophagy protein 5	Q9H1Y0	275	48%	Autophagy protein 5	K1RAJ5	284	APG5
Autophagy protein 16	Q03818	150	8%	Autophagy-related protein 16-1	Q676U5	607	40%	Autophagy-related protein 16-1	K1RWG6	516	ATG16, WD40-3, WD40*, Smc*
Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10	Q07879	167	19%	Ubiquitin like conjugating protein ATG10	Q9H0Y0	220	38%	Autophagy-related protein 10	K1PT50	206	Autophagy_act_C
-	-	-	-	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Q9FH42	121	73%	Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3A	K1R9V4/XP_011447694.1	124	GABARAP, Ag8
-	-	-	-	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	Q9GZQ8/A6NCE7	125	-	-	-	-	-
-	-	-	-	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C	Q9BWX4	147	58%	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C	K1QL17/XP_011415834.1	127	GABARAP, Ag8, PTZ00380
Autophagy-related protein 8	P38182/NP_009475.1	117	55%	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	Q95166	117	93%	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	K1PXH7/XP_01143796.1	117	GABARAP, Ag8, PTZ00380
-	-	-	-	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	Q9H0R8	117	-	-	-	-	-
-	-	-	-	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	P60520	117	74%	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	K1QQ43/XP_011432603.1	117	GABARAP, Ag8, PTZ00380
-	-	-	-	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 3	Q9BY60	117	-	-	-	-	-
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	P38862	630	34% 35%	ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	Q95352	703	49% 48%	Autophagy-related protein 7	K1RAF7 K1QK12	478 632	ATG7_N*, Apg7, Thif*, E1_like_apg/*, PRK05600*
Autophagy-related protein 3	P40344	310	32%	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	Q9NTG2	314	66%	Autophagy-related protein 3	K1R934	322	Autophagy_N, Autophagy_act_C, Autophagy
-	-	-	-	Cysteine protease ATG4A	Q8WYN0	398	44%	Cysteine protease ATG4A	-	-	-
-	-	-	-	Cysteine protease ATG4B	Q9Y4P1	393	47%	Cysteine protease ATG4B	-	-	-
-	-	-	-	Cysteine protease ATG4C	Q96DT6	458	27%	Cysteine protease ATG4C	-	-	-
-	-	-	-	Cysteine protease ATG4D	Q86TL0	474	25%	Cysteine protease ATG4D	-	-	-
-	-	-	-	Sequestosome-1	Q13501	440	34% 24%	Sequestosome-1	K1QI48/XP_011452137.1	441	delta = PBI x2, ZZ_NBR1, li, Znf_ZZ, ZZ, UBA5, SQSTM

## 4. Résultats complémentaires: caractérisation de l'autophagie chez l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*

### 4.1. Introduction

Les précédents résultats obtenus dans le cadre de ce second chapitre de thèse, démontre une conservation de la voie de l'autophagie et une modulation de ce processus en présence de molécules modulatrices de la voie chez l'huître japonaise, *C. gigas* (Picot *et al.* accepted; Picot *et al.*, in prep; Moreau *et al.* 2015). Cependant, il existe d'autres espèces d'huîtres creuses phylogénétiquement proches de *C. gigas* réparties dans d'autres régions du monde, comme l'huître creuse américaine, *Crassostrea virginica*. Chez ces espèces d'huîtres creuses, l'existence et la modulation de l'autophagie n'a jamais été étudiée, ni comparée à celle mis en évidence chez l'huître japonaise. Le faible nombre de génomes de mollusques marins disponibles limite la possibilité de développer certains outils, nécessitant la connaissance des séquences des gènes de l'autophagie, pour étudier ce processus chez ces espèces. En 2015, la publication du génome de *C. virginica*, nous a permis d'entreprendre des travaux de caractérisation et de compréhension de l'autophagie chez cette espèce (Gómez-Chiarri *et al.* 2015). Les travaux ont été réalisés au sein de l'Institute of Marine and Environmental Technology (IMET) à Baltimore (USA) sous la direction du Dr Colleen Burge. Ce travail a été financé par la Direction Scientifique de l'Ifremer dans le cadre des mobilités internationales des doctorants.

Dans un premier temps, la base de données publiques National Center for Biotechnology Information (NCBI) et les séquences des protéines de la voie de l'autophagie de *C. gigas* ont été utilisées afin d'identifier les protéines de la voie de l'autophagie chez *C. virginica*. Les séquences de plusieurs protéines clés de la voie de l'autophagie de l'huître creuse américaine et de plusieurs organismes eucaryotes ont été recensées puis alignées et analysées au niveau phylogénétique.

Dans un second temps, la modulation de l'autophagie a été suivie dans deux tissus de *C. virginica* précédemment étudiés chez *C. gigas*, les hémocytes et le manteau. Pour cela, des huîtres ont été mises en contact avec deux molécules connues pour moduler la voie de l'autophagie, la carbamazépine (inducteur de la voie) et le chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , inhibiteur de la voie), pendant une durée de 16 à 24 h. Des outils précédemment développés chez *C. gigas*, ont été appliqués sur *C. virginica*. Dans les hémocytes, l'approche par cytométrie en flux mise au point par Picot *et al.* (accepted) a été utilisée. Cette méthode

permet de quantifier le pourcentage de cellules présentant des autophagosomes au sein de la population hémocytaire. Dans le manteau, une approche par western blot a été utilisée pour détecter et quantifier deux protéines clés de la voie de l'autophagie, MAP1LC3 et SQSTM1.

Ainsi les protéines clés de l'autophagie existent et présentent de fortes similarités avec les protéines identifiées chez *C. gigas*. De plus, chez *C. virginica*, l'autophagie peut être modulée par l'utilisation de molécules connues pour interférer avec cette voie à l'instar de ce qui avait été observé chez *C. gigas*.

## 4.2. Matériel et méthodes

### 4.2.1. Identification des protéines de la voie de l'autophagie chez *C. virginica*

La recherche de protéines homologues de la voie de l'autophagie chez *C. virginica* a été réalisée en utilisant la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le programme BLASTp a permis de rechercher les séquences protéiques homologues en utilisant les séquences protéiques connues de la voie chez *C. gigas*, *Homo sapiens* et *S. cerevisiae*. Dans les séquences protéiques homologues identifiées de *C. virginica* la présence de domaines conservés a été étudiée par l'outil « CD-search » de NCBI.

### 4.2.2. Analyse phylogénétique

Une analyse phylogénétique de cinq protéines clés de la voie de l'autophagie de *C. virginica* (mTOR, BECN1, MAP1LC3A, MAP1LC3C et SQSTM1) a été menée. Pour cela, les séquences homologues de ces cinq protéines ont été recherchées chez d'autres organismes eucaryotes: l'humain (*H. sapiens*), l'huître creuse japonaise (*Crassostrea gigas*), la poule (*Gallus gallus*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*), un ver (*Caenorhabditis elegans*), la souris (*Mus musculus*), l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*), le lingual (*Lingula unguis*) et l'abeille européenne (*Apis mellifera*). Les séquences protéiques de ces organismes ont été collectées à l'aide des bases de données universal protein resource (Uniprot, <https://www.uniprot.org>) et NCBI. Les alignements des séquences protéiques ont été réalisés à l'aide de Clustal W et l'éditeur de séquence BioEdit (version 7.0.5.3). Puis les arbres phylogénétiques ont été construits via le logiciel MEGA 7 (version 7.0.26) en utilisant la méthode de Neighbor Joining (1000 répliquats).

### 4.2.3. Matériel biologique

Le naissain de *C. virginica* utilisé dans cette étude, a été produit en éclosérie puis placé sur des parcs ostréicoles dans la baie de Chesapeake (Maryland, USA). Avant la mise en place de l'expérimentation, les huîtres ont été acclimatées pendant 10 jours dans un raceway contenant de l'eau de mer artificielle en renouvellement constant à une température de 20,5°C. Un apport en phytoplancton (*Tisochrysis lutea*, *Pavlova sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros calcitrans* et *Thalassiosira pseudonana*) était réalisé une fois par jour.

### 4.2.4. Plan experimental

Deux traitements différents ont été utilisés pour moduler l'autophagie. Plusieurs groupes d'huîtres ont été maintenus pendant 16 à 24 h en eau de mer artificielle additionnée avec (1) du chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) à une concentration de 0,053 g/L d'eau de mer ou (2) de carbamazépine à une concentration de 0,0073 g/L d'eau de mer (Picot *et al.* accepted; Moreau *et al.* 2015). Une condition contrôle a été réalisée en maintenant un groupe d'huîtres dans de l'eau de mer artificielle non additionnée de molécules. Pour chacune de ces conditions, quatre bacs contenant chacun 9 huîtres ont été utilisés. A chaque temps d'échantillonnage (16 et 24 h), deux bacs de 9 animaux ont été échantillonnés par condition. Au temps T<sub>0</sub>, (temps d'échantillonnage réalisé en amont de la mise en place des différentes conditions testées), deux bacs de 9 huîtres ont été échantillonnés pour définir le niveau basal d'autophagie dans les hémocytes et le manteau des huîtres américaines.

A chaque temps d'échantillonnage, l'hémolymphe a été prélevée comme précédemment décrit dans Picot *et al.* (accepted). L'hémolymphe des neuf huîtres de chaque bac a été poolée. En parallèle, des échantillons de manteau (20-25 mg) ont également été collectés sur 6 huîtres à chaque temps et pour chaque condition.

### 4.2.5. Approches en cytométrie en flux

#### 4.2.5.1. Suivi de la mortalité des hémocytes

La mortalité des hémocytes a été déterminée en utilisant du iodure de propidium (IP) suivant le même protocole décrit dans Picot *et al.* (accepted). La mortalité des hémocytes est mesurée sur un échantillon de 200 µL de suspension cellulaire pour chaque condition (n=2 réplicats) à chaque temps.

#### 4.2.5.2. Suivi du pourcentage d'hémocytes présentant des autophagosomes

Le pourcentage d'hémocytes présentant des autophagosomes a été suivi à l'aide du même protocole décrit dans Picot *et al.* (accepted) en utilisant le kit « Cyto-ID<sup>®</sup> autophagy detection kit » (ENZO Life Sciences, ENZ-51031-K200).

#### 4.2.5.3. Analyse en cytométrie en flux

Pour chaque échantillon, l'activité autophagique (20 000 évènements) et le taux de mortalité des hémocytes (10 000 évènements) ont été mesurés en utilisant un cytomètre en flux Accuri<sup>™</sup> C6 (BD Biosciences). Une discrimination par la taille a été réalisée afin de s'assurer que les petites particules et les bactéries n'étaient pas comptées, et que seuls les hémocytes étaient pris en compte. Les résultats ont été présentés sous forme de cytogrammes et reportés sous forme d'échelle logarithmique pour chacun des marqueurs utilisés. Les résultats sont exprimés en ratio représentant le pourcentage de cellules contenant des autophagosomes dans chacune des conditions divisé par le pourcentage de cellules obtenu au temps T0. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de cytométrie flowing software 2.5.1 (University of Turku, Finland). Les résultats ont été représentés via le logiciel R studio (version 3.3.2) et le package ggplot2 (version 2.2.1).

#### 4.2.6. Western blot

A partir des échantillons de manteau collectés, un dosage des protéines totales et des western blot ont été réalisés comme décrit dans Picot *et al.* (in prep).

Les ratios de MAP1LC3 II/actine et de SQSTM1/actine ont été calculés par une analyse en densitométrie réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.51 q). Chaque échantillon a été normalisé par rapport à l'actine et calibré par rapport à la condition contrôle (eau de mer) 24 h.

Le logiciel R studio (version 3.3.2) a été utilisé pour représenter les ratios obtenus (package ggplot2, version 2.2.1) et pour réaliser l'analyse statistique des données de densitométrie (package PMCMR, version 4.1).

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Identification des protéines de la voie de l'autophagie chez *C. virginica*

La recherche de protéines de la voie de l'autophagie chez *C. virginica* dans les bases de données publiques a permis d'identifier 33 protéines homologues à celles trouvées chez *C. gigas* (Tableau 2). Chez *C. virginica*, des protéines appartenant aux 5 complexes permettant l'initiation, la nucléation, l'élongation, l'achèvement et la fusion des autophagosomes ont été identifiés. La majorité des protéines ATG identifiées fait partie du cœur moléculaire de la voie de l'autophagie. Cependant, certaines protéines de la voie n'ont pas été identifiées chez *C. virginica* comme chez *C. gigas*. Aucune séquence n'a été trouvée sous NCBI pour les protéines Atg17, Atg19, Atg20, Atg23, Atg29, Atg31, sorting nexin-4, WIPI1, ULK1, MAP1LC3B, GABARAP L1 et GABARAP L3. En revanche, la protéine ATG2A présente chez l'huître japonaise, n'est pas présente chez l'huître américaine.

Chez *C. virginica*, un grand nombre de ces protéines présentent des domaines conservés en comparaison avec les domaines présents chez *C. gigas*. C'est notamment le cas des protéines BECN1, PI3KC3, mTOR et ULK2 impliquées dans l'initiation de l'autophagie. Plusieurs membres de la famille LC3/GABARAP (MAP1LC3A, MAP1LC3C, GABARAP et GABARAP L2) jouant un rôle dans l'étape d'élongation de l'autophagie possèdent également des domaines conservés. L'analyse phylogénétique réalisée a permis de confirmer que certaines protéines clés de la voie de l'autophagie chez *C. virginica* (MAP1LC3A, MAP1LC3C, BECN1, SQSTM1 et mTOR) présentaient de fortes similarités avec les protéines de la voie de l'autophagie chez d'autres mollusques et chez les mammifères (Figure 17). En effet, les protéines MAP1LC3A, MAP1LC3C et SQSTM1 partagent respectivement 84%, 98% et 79% d'identité avec leurs séquences protéiques homologues respectives chez *C. gigas*. Des pourcentages d'identité élevés sont également obtenus avec les protéines BECN1 (90%) et mTOR (94%) de *C. gigas*. En revanche, de faibles similarités ont été identifiées avec les protéines de la voie de l'autophagie chez la levure *S. cerevisiae* et les organismes invertébrés tels que la drosophile *D. melanogaster*, l'abeille *A. mellifera* et le ver *C. elegans*.

L'analyse des domaines a également démontré que plusieurs protéines ATG de *C. virginica* présentaient des domaines tronqués. C'est notamment le cas des protéines ATG7, ULK3, ULK4, FIP200, WIPI2, WIPI3, WIPI4, PIK3R4, UVRAG et ATG16L1.

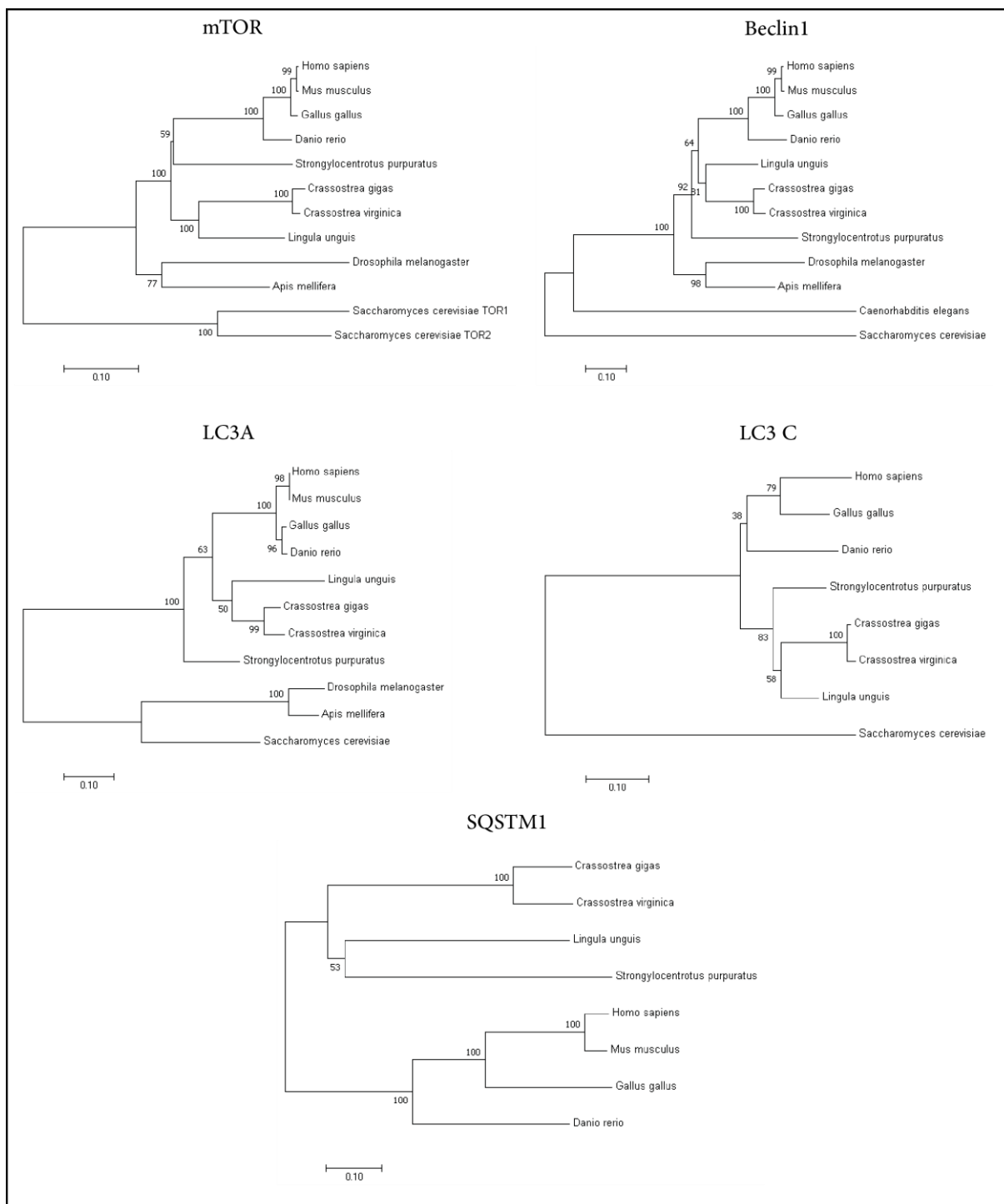
**Tableau 2.** Liste des protéines et domaines de la voie de l'autophagie identifiés chez l'huître creuse américaine (*C. virginica*) et comparée avec les protéines et domaines identifiés chez l'huître creuse japonaise (*C. gigas*). (-) Protéine non identifiée chez l'espèce concernée. (\*) Domaine tronqué.

Complexe	<i>Crassostrea gigas</i>					<i>Crassostrea virginica</i>				
	Nom abrégé de la protéine Aig	Nom	n° d'accèsion NCBI ou Uniprot	Nombre d'acides aminés	Domaines	Nom	n° d'accèsion NCBI	Nombre d'acides aminés	Domaines	
Complexe Aig1/ULK	mTOR	Serine/threonine-protein kinase TOR	K1PYM7/EKC29347	2392	PIKKc_TOR, FAT	serine/threonine-protein kinase mTOR-like	XP_022337566.1	2476 AA	PIKKc_TOR, FAT	
	ULK1	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase mtc-51-like isoform X2	XP_022286174.1	956	STKc_UKL1_2-like, S_TKc, Pkinase, SPS1	
	ULK2	Serine/threonine-protein kinase ULK2	K1PNL8/EKC18065.1	936	STKc_UKL1_2-like, S_Tk, Pkinase, SPS1	serine/threonine-protein kinase ULK2-like isoform X1	XP_022286173.1	958	STKc_UKL1_2-like, S_Tk, Pkinase, SPS1	
	ULK3	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase ULK3	XP_011415026.1	490	TKc_ULK3, S_TKc, PKinase, SPS1*, MIT>2	serine/threonine-protein kinase ULK2-like isoform X3	XP_022286175.1	887	STKc_UKL1_2-like, S_Tk, Pkinase, SPS1	
	ULK4	Serine/threonine-protein kinase ULK4	K1QQA6	1897	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*, WSC<3	serine/threonine-protein kinase ULK3-like isoform X1	XP_022328897.1	490	TKc_ULK3, S_TKc, PKinase, SPS1*, MIT>2	
	ATG13	Autophagy-related protein 13	K1QIF8/XP_011420129.1	474	ATG13	serine/threonine-protein kinase ULK3-like isoform X2	XP_022328898.1	443	TKc_ULK3, S_TKc, PKinase, SPS1*, MIT>2	
	Aig17	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase ULK4-like isoform X5	XP_022331182.1	1296	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*	
	Aig29	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase ULK4-like isoform X3	XP_022331180.1	1306	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*	
	Aig31	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase ULK4-like isoform X4	XP_022331181.1	1301	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*	
	Aig20	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase ULK4-like isoform X2	XP_022331179.1	1310	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*	
	Sorting ncm4	-	-	-	-	serine/threonine-protein kinase ULK4-like isoform X1	XP_022331177.1	1311	STKc_ULK4, S_TKc, SPS1*	
	FIP200	RB1 inducible coiled-coil protein 1	K1QSI9/EKC24556.1	313	ATG11, Snc*, SMC_prok_A*	autophagy-related protein 13-like	XP_022312001.1	476	ATG13	
	Aig11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aig19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ATG101	autophagy-related protein 101	K1R7A8/XP_011447317.1	218	ATG 101	autophagy-related protein 101-like	XP_022320304.1	218	ATG 101		
DFCP1	Zinc finger FYVE domain-containing protein 1	K1QVT2/EKC37743.1	652	GBP, FYVE_ZFYV1>2	LOW QUALITY PROTEIN: zinc finger FYVE domain-containing protein 1-like	XP_022303696.1	853	GBP, FYVE_x2		
ATG9	Autophagy-related protein 9A	MK069430	1010	APG9	autophagy-related protein 9A-like isoform X1	XP_022310215.1	819	APG9		
WIPI1	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1	-	-	-	autophagy-related protein 9A-like isoform X2	XP_022310217.1	813	APG9		
WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2	K1QZR2/EKC39143.1	438	WD40*	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2-like isoform X3	XP_022314716.1	440	WD40*		
WIPI3	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3	K1PZL8/XP_011445706.1	344	WD40*	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2-like isoform X2	XP_022314715.1	496	WD40*		
WIPI4	PREDICTED: WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4	XP_011454240.1	338	WD40*	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2-like isoform X1	XP_022314714.1	497	WD40*		
ATG6A	Autophagy-related protein 2-like protein A	K1RSP2/EKC37546.1	1351	VPS13_C*, ATG2_CAD	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3-like	XP_022317762.1	344	WD40*		
ATG6B	Autophagy-related protein 2-like protein B	K1QL77/EKC37547.1	622	Chorein_N, MR56	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4-like	XP_022316051.1	338	WD40*		
Aig23	-	-	-	-	autophagy-related protein 2 homolog B-like	XP_022329150.1	2057	Chorein_N, MR56*, VPS13_C*, ATG_C, ATG2_CAD		
Aig27	Uncharacterized protein	K1QA43	236	ATG27 superfamily*	autophagy-related protein 2 homolog B-like	XP_022329168.1	2057	Chorein_N, MR56*, VPS13_C*, ATG_C, ATG2_CAD		



Complexe	<i>Crassostrea gigas</i>					<i>Crassostrea virginica</i>				
	Nom abrégé de la protéine ATG	Nom	n° d'accèsion NCBI ou Uniprot	Nombre d'acides aminés	Domaines	Nom	n° d'accèsion NCBI	Nombre d'acides aminés	Domaines	
Complexe PtdIns 3K	PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	K1PVC2/EKC20235.1	897	C2_P13K_Class_III, P13K_C2, P13Ka_III, P13Kc_III, P13Kc_P13_P14_kinase	phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3-like	XP_022328886.1	889	C2_P13K_Class_III, P13Ka_III, P13Kc_III, P13Kc_P13_P14_kinase	
	PIK3R4	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 4	K1R976/XP_01141632.4.1	1360	STKc_Vps15, SP51, WD40	phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4-like	XP_022340487.1	1362	STKc_Vps15, SP51, WD40*	
	BECN1	Beclin 1	K1QH7	434	APG6, BH3	beclin-1-like	XP_022328161.1	442	APG6, BH3	
	ATG14	Uncharacterized protein	K1QSF1a/EKC39832.1	484	Atg14, PTZ00121*, SbcC*, DPM2*	LOW QUALITY PROTEIN: beclin-1-like	XP_022325637.1	443	APG6, BH3	
	AMBRA1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	K1QU33/EKC40357.1	983	WD40*	beclin 1-associated autophagy-related key regulator-like	XP_022328964.1	474	Atg14, PTZ00121*, SbcC*, Mplasa_alpha_reh*	
	UVRAG	UV radiation resistance-associated protein	XP_019925412.1	556	Atg14	uncharacterized protein LOC111103567	XP_022292624.1	1005	WD40*	
						UV radiation resistance-associated gene protein-like	XP_022336200.1	711	Atg14, PspA*, C2D*×2	
	RUBICON	PREDICTED: run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein	XP_011419540.1	795	RUN, ZF-RING_9*	run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein-like isoform X3	XP_022343883.1	926	RUN, ZF-RING_9	
						run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein-like isoform X1	XP_022343881.1	955	RUN, ZF-RING_9	
						run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein-like isoform X2	XP_022343882.1	935	RUN, ZF-RING_9	
Système de conjugaison ATG12	BIF-1	Endophilin-B1	K1Q963	375	BAR_Endophilin_B, BAR×2, SH3_Endophilin_B, SH3_2, SH3	LOW QUALITY PROTEIN: endophilin-B1-like	XP_022334278.1	390	BAR_Endophilin_B, BAR×2, SH3_Endophilin_B, SH3_2, SH3	
	ATG12	Ubiquitin-like protein ATG12	MK069431	118	APG12, APG12_C	ubiquitin-like protein ATG12 isoform X2	XP_022317493.1	118	APG12, APG12_C	
	ATG5	Autophagy protein 5	K1RAJ5	284	APG5	ubiquitin-like protein ATG12 isoform X1	XP_022317492.1	121	APG12, APG12_C	
	ATG16L1	Autophagy-related protein 161	K1RWG6	516	ATG16, WD40×3, WD40*, Sme*	LOW QUALITY PROTEIN: autophagy protein 5-like	XP_022291501.1	272	APG5	
						autophagy-related protein 161-like	XP_022335410.1	549	ATG16, WD40×3, WD40*, Sme*	
						ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 isoform X2	XP_022315749.1	205	Autophagy_act_C	
						ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 isoform X1	XP_022315748.1	213	Autophagy_act_C	
					ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 isoform X3	XP_022315750.1	192	Autophagy_act_C		

Complexe	Crassostrea gigas					Crassostrea virginica				
	Nom abrégé de la protéine ATG	Nom	nr d'accension NCBI ou Uniprot	Nombre d'acides aminés	Domaines	Nom	nr d'accension NCBI	Nombre d'acides aminés	Domaines	
Système de conjugaison LC3	MAP1LC3A	Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3A	K1R9V4/XP_011447694.1	124	GABARAP, Atg8	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A-like	XP_022303890.1	135	GABARAP, Atg8	
	MAP1LC3B	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MAP1LC3C	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C	K1QLL7/XP_011415834.1	127	GABARAP, Atg8, PTZ00380	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C-like	XP_022335038.1	127	GABARAP, Atg8, PTZ00380	
	GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	K1PXL7/XP_011437796.1	117	GABARAP, Atg8, PTZ00380	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	XP_022341258.1	117	GABARAP, Atg8, PTZ00380	
	GABARAP L1	-	-	-	-	-	-	-	-	
	GABARAP L2	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	K1QQ43/XP_011432603.1	117	GABARAP, Atg8, PTZ00380	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	XP_022340074.1	117	GABARAP, Atg8, PTZ00380	
	GABARAP L3	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ATG7	Autophagy-related protein 7	MK173046	638	ATG7_N, Apg7, Thif*, E1_like_apg7	ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7	XP_022296278.1	689	ATG7_N, Apg7, Thif*, E1_like_apg7	
	ATG3	Autophagy-related protein 3	K1R934	322	Autophagy_N, Autophagy_act_C, Autophagy_	ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3	XP_022337406.1	322	Autophagy_N, Autophagy_act_C, Autophagy_	
	ATG4A	Cysteine protease	K1QKP1	405	Peptidase_C54	-	-	-	-	
	ATG4B					cysteine protease ATG4B-like	XP_022345570.1	406	Peptidase_C54	
	ATG4C					-	-	-	-	
	ATG4D	-	-	-	-	-	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC111120188	XP_022316625.1	919	Peptidase_C54, LRR_9*, ACD_sHsps_p23-like
	SQSTM1	Sequestosome-1	K1QI43/XP_011452137.1	441	PB1_x2, ZZ_NBR1_like, Znf_ZZ_ZZ, UBA-SQSTM1, PB1_p62, UBA_5	sequestosome-1-like	XP_022327687.1	444	PB1_x2, ZZ_NBR1_like, Znf_ZZ_ZZ, UBA-SQSTM1, PB1_p62, UBA_5	



**Figure 17.** Analyse phylogénétique des protéines clés de la voie de l'autophagie (mTOR, BECN1, MAP1LC3A, MAP1LC3C et SQSTM1) chez l'huître américaine, *C. virginica* (1000 répliquats, Neighbor Joining).

### 4.3.2. Modulation de l'autophagie dans les hémocytes de *C. virginica*

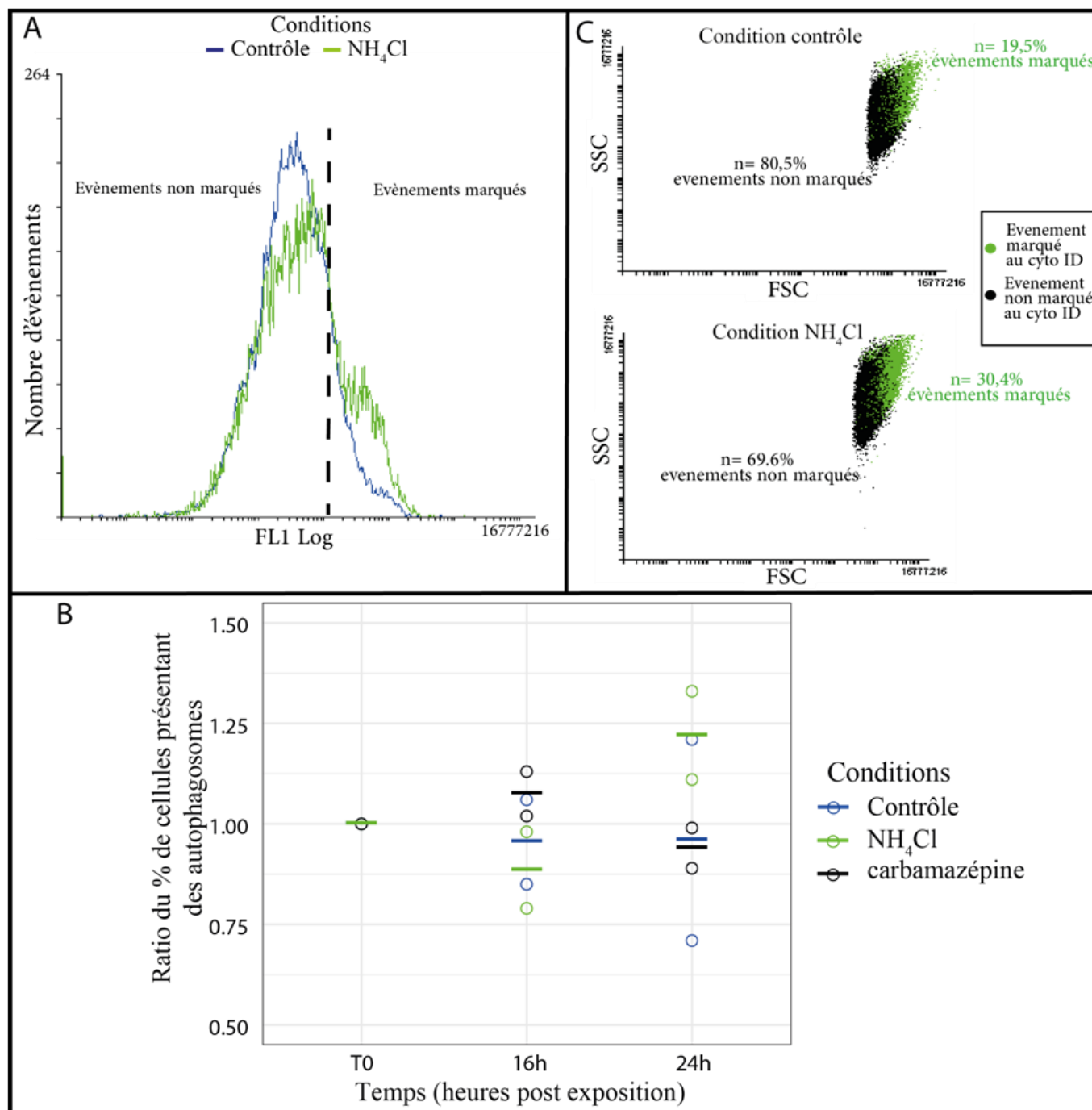
Un suivi de la mortalité hémocytaire a été réalisé en utilisant de l'iodure de propidium (IP). Le pourcentage moyen de mortalité cellulaire ne dépasse pas 9,2 % dans l'ensemble des conditions testées.

L'utilisation d'une sonde développée dans le kit Cyto-ID<sup>®</sup>, a permis de suivre le nombre d'hémocytes présentant des autophagosomes au sein de chacune des conditions testées. Cette sonde nous a permis d'identifier deux populations hémocytaires. Une population négative correspondant à des hémocytes non marquée par le Cyto-ID<sup>®</sup> et une population positive constituée des hémocytes marqués par le Cyto-ID<sup>®</sup> (Figure 18A). Au temps T0, 27±2,1 % des hémocytes étaient détectés comme positifs. Dans la condition contrôle (eau de mer), le ratio moyen reste relativement stable au cours du temps mais présente une grande variabilité (Figure 18B). En présence de carbamazépine, le ratio moyen semble très faiblement augmenter au temps 16 h, puis revient proche de son niveau de départ au temps 24 h. En présence de NH<sub>4</sub>Cl, le ratio moyen semble augmenter de manière importante au temps 24 h.

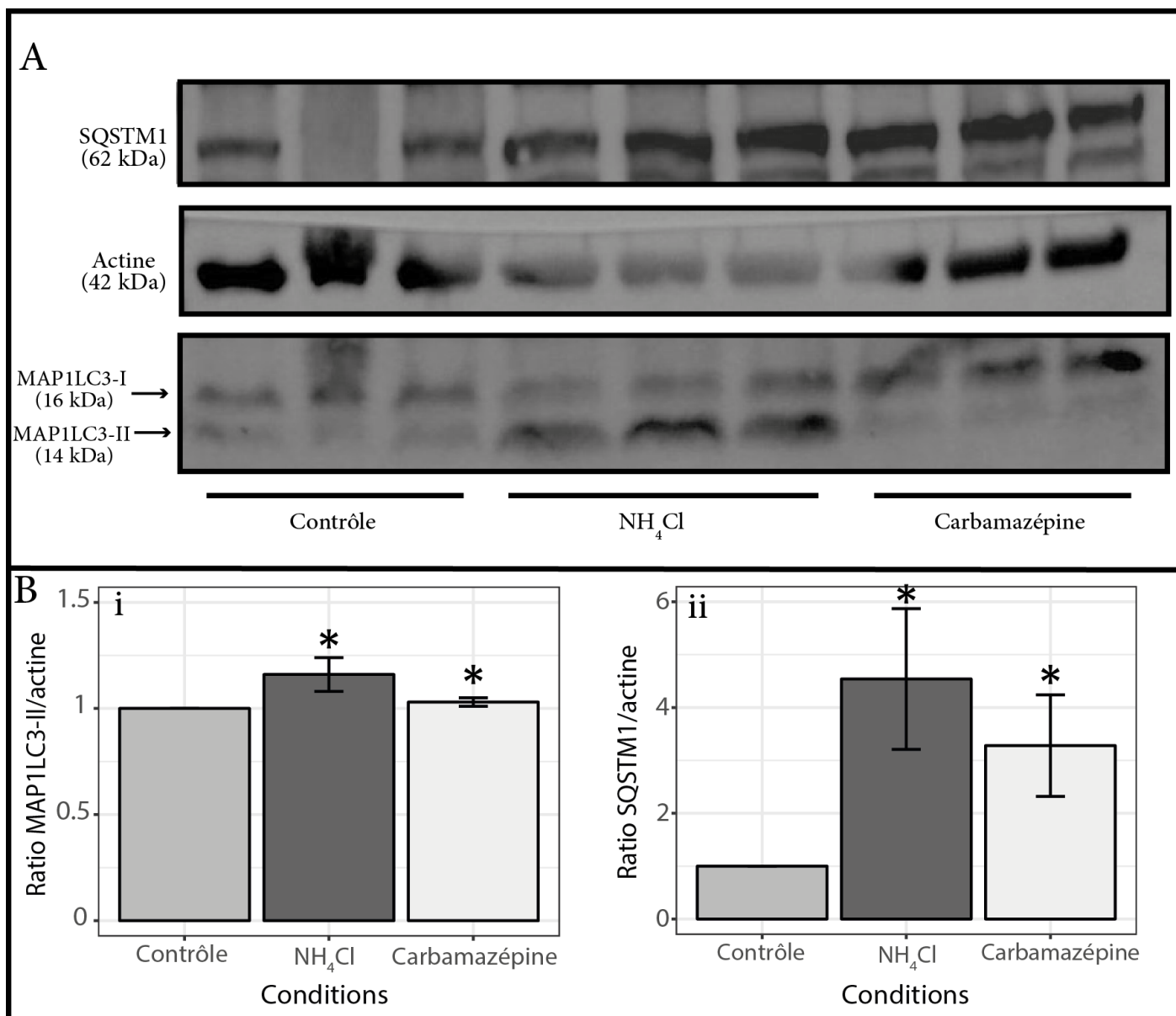
Afin de mieux cerner les caractéristiques de taille et de complexité des cellules marquées, les cytogrammes SSC/FSC ont été étudiés dans la condition contrôle et dans la condition NH<sub>4</sub>Cl au temps 24 h post exposition (Figure 18C). Dans la condition NH<sub>4</sub>Cl comme dans la condition contrôle, les hémocytes les plus marqués sont les cellules de grande taille et fortement complexes. De plus, le pourcentage de cellules marquées dans la condition NH<sub>4</sub>Cl tend à être plus important que dans la condition contrôle.

### 4.3.1. Modulation de l'autophagie dans le manteau de *C. virginica*

L'analyse par western blot a permis détecter la présence des protéines de l'autophagie SQSTM1 et des formes MAP1LC3-I et -II au sein du manteau de l'huître creuse américaine, *C. virginica*. Cependant, suivant la condition testée, l'intensité des bandes obtenues pour les trois protéines varie (Figure 19A). L'utilisation du ratio MAP1LC3-II/actine (Figure 19B) nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative de la quantité de protéine MAP1LC3-II dans les conditions NH<sub>4</sub>Cl et carbamazépine, par rapport à la condition eau de mer (p<0,05). De même, le ratio SQSTM1/actine augmente de manière significative dans les conditions NH<sub>4</sub>Cl et carbamazépine par rapport à la condition contrôle (p<0,05).



**Figure 18.** Détection et suivi de l'activité autophagique dans les hémocytes par cytométrie en flux. A. Overlay d'histogrammes en FL1 représentant des hémocytes marqués au Cyto-ID® dans la condition contrôle (eau de mer) et la condition où l'autophagie est induite (condition NH<sub>4</sub>Cl) à 24 h post exposition avec les molécules. L'axe horizontal représente l'intensité de fluorescence et l'axe vertical le nombre d'hémocytes. B. Ratios entre le pourcentage d'hémocytes présentant des autophagosomes dans les différentes conditions testées à 16 et 24 h (contrôle, NH<sub>4</sub>Cl et carbamazépine) et par rapport au pourcentage obtenu au temps T0. A chaque temps d'échantillonnage, n=2 pools de 9 individus. Le tiret représente la moyenne du ratio obtenu pour chaque condition testée à chaque temps. C. Cytogramme Forward scatter (FSC) vs. Side scatter (SSC) représentant la population hémocytaire de *C. virginica* marquée au Cyto-ID®. Chaque point vert représente un hémocyte marqué au Cyto-ID® contenant des autophagosomes. Chaque point noir représente un hémocyte ne contenant pas d'autophagosome et n'étant pas marqué par la sonde du kit Cyto-ID®.



**Figure 19.** Détection et quantification des protéines SQSTM1 et MAP1LC3 dans le manteau de l'huitre creuse américaine, *C. virginica* suivant les différentes conditions testées (contrôle, NH<sub>4</sub>Cl et carbamazépine). A. Détection des protéines SQSTM1 et MAP1LC3-I et -II sur membranes de PVDF. B. Histogrammes représentant le ratio (a) de MAP1LC3-II/actine ou (b) de SQSTM1/actine. La condition contrôle (eau de mer) a été utilisée comme calibrateur. Pour chaque condition, n=3 animaux. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type. \* représente une différence significative avec la condition contrôle ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1. Discussion

L'autophagie est un processus conservé chez les organismes eucaryotes (Levine et Deretic 2007), impliqué dans de nombreux et importants processus cellulaires (Mizushima 2005; Mizushima 2007; Levine et Kroemer 2008; Mizushima et Levine 2010). Chez les mollusques bivalves, les recherches concernant ce mécanisme en sont encore à leurs prémices. L'analyse du génome de *C. gigas*, a démontré que la voie de l'autophagie est structurellement et constitutionnellement conservée chez cette espèce et qu'elle peut être modulée en présence de molécules connues pour interférer avec la voie de l'autophagie chez les mammifères (Picot *et al.* accepted; Picot *et al.*, in prep; Moreau *et al.* 2015). Cependant, chez les mollusques bivalves marins, l'absence de données génomiques pour la majorité des espèces limite la possibilité de développer de nouvelles approches pour étudier l'autophagie. Récemment, la publication du génome de l'huître américaine a permis d'entreprendre des travaux de caractérisation et de compréhension de cette voie chez cette espèce d'huître creuse phylogénétiquement proche de *C. gigas*. La réalisation de ces travaux a été menée dans le cadre d'une collaboration avec l'IMET.

En utilisant le génome de *C. virginica* séquencé en 2015, une identification des protéines de l'autophagie a permis de caractériser cette voie chez cette espèce. Une analyse phylogénétique de certaines protéines clés de la voie de l'autophagie de *C. virginica* a également été réalisée. Dans un second temps, l'utilisation de modulateurs connus de la voie de l'autophagie chez *C. gigas* a permis de démontrer que l'autophagie peut être modulée au sein de deux tissus précédemment étudiés chez *C. gigas*.

Les analyses réalisées au niveau moléculaire ont mis en évidence que les 5 complexes et les principales protéines constituant le cœur moléculaire de la voie étaient conservées chez *C. virginica* comme chez *C. gigas*. De la levure jusqu'à l'humain, le cœur moléculaire de la voie de l'autophagie est constitué de 5 complexes contenant chacun plusieurs protéines ATG hautement conservées et essentielles pour la formation des autophagosomes (Yang et Klionsky 2009; Yang et Klionsky 2010). De plus, d'après l'analyse phylogénétique, les séquences de *C. virginica* présentent une forte similarité avec les séquences d'autres mollusques et mammifères. En revanche, elles sont plus éloignées de celles des insectes et de la levure *S. cerevisiae*. Une analyse phylogénétique utilisant les séquences protéiques d'ATG7, ATG12 et ATG9A de *C. gigas* avaient déjà permis d'observer de fortes similarités entre les séquences des espèces de mollusques (Picot *et al.*, in prep). Chez *C. gigas* plusieurs

protéines ATG présentent également de forte similarité avec les protéines ATG homologues de l'humain (Moreau *et al.* 2015).

Comme chez *C. gigas*, certaines protéines (Atg11, Atg17, Atg19, Atg20, Atg23, Atg24, Atg29, Atg27, Atg31, ULK1, WIPI1, MAP1LC3B, GABARAP L1 et GABARAP L3) n'ont pas été retrouvées (Picot *et al.*, in prep). Les protéines Atg11, Atg17, Atg19, Atg20, Atg23, Atg24, Atg29, Atg27, Atg31 sont en revanche présentes chez la levure *S. cerevisiae*. Celles-ci sont impliquées dans d'autres voies relative à l'autophagie comme la péroxysphagie, la voie Cvt (cytoplasm to vacuole targeting) et la voie de l'autophagie induite par le jeûne. Ces protéines ne sont pas essentielles pour permettre la formation des autophagosomes (Nakatogawa *et al.* 2009). Elles n'ont également pas été identifiées chez d'autres organismes comme les plantes et les mammifères, (Meijer *et al.* 2007; Hosokawa *et al.* 2009; Mizushima *et al.* 2011; Doorn et Papini 2013). En revanche, les protéines ULK1, WIPI1, MAP1LC3B, GABARAP L1 et GABARAP L3, sont présentes chez les mammifères et jouent toutes un rôle important dans le fonctionnement de la voie de l'autophagie (Picot *et al.*, in prep). Cependant, dans la majorité des cas, le rôle spécifique associé à chaque membre de chacune des familles WIPI, LC3/GABARAP et des homologues d'ULK1 reste méconnu. Il est donc aujourd'hui difficile de savoir si leur absence peut être compensée par d'autres membres de leurs familles respectives. De plus, afin de confirmer l'absence de ces protéines chez les huîtres creuses japonaises et américaines, une recherche de ces protéines devra être réalisée au sein d'autres génomes de mollusques bivalves.

Les connaissances acquises sur la voie de l'autophagie au niveau moléculaire chez *C. virginica* nous ont ensuite permis d'étudier la modulation de l'autophagie au sein de deux tissus précédemment étudiés chez *C. gigas*, les hémocytes et le manteau. Les analyses en western blot nous ont permis de détecter dans le manteau de *C. virginica* les bandes MAP1LC3-I et -II. De plus, une augmentation des quantités de protéines MAP1LC3-II et SQSTM1 est observée en présence de NH<sub>4</sub>Cl (inhibiteur de la voie) et de carbamazépine (inducteur de la voie) au temps 24 h. Chez *C. gigas*, une augmentation de la quantité de protéine MAP1LC3-II a également été observée 20 h post exposition avec les mêmes molécules (Moreau *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent l'existence d'un flux autophagique au sein du manteau de *C. virginica* comme au sein du manteau de *C. gigas*.

La cytométrie en flux nous a permis d'observer dans les hémocytes de *C. virginica* une modulation de l'autophagie similaire à celle observée chez *C. gigas* (Picot *et al.* accepted).






L'autophagie semble être modulée par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  au temps 24 h alors qu'en présence de carbamazépine, aucune modulation n'est observée. Dans les hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* (la moule méditerranéenne), la carbamazépine n'induit pas non plus de modulation de la voie (Balbi *et al.* 2018). Etant donné que la carbamazépine induit l'autophagie au sein du manteau de *C. virginica*, ces résultats suggèrent une réponse tissus spécifique. La carbamazépine pourrait également ne pas avoir d'effet spécifique sur la voie de l'autophagie dans les hémocytes de *C. virginica*. De plus, chez l'huître creuse américaine comme chez l'huître creuse japonaise (Picot *et al.* accepted), l'analyse réalisée en cytométrie en flux démontre que les cellules les plus marquées en présence ou absence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sont les cellules de grande taille et complexe. Cela suggère, comme chez *C. gigas*, que l'activité autophagique est préférentiellement réalisée par les granulocytes chez *C. virginica*.

Ainsi, les résultats obtenus démontrent que les protéines ATG de *C. virginica*, sont similaires à celles de *C. gigas* et des mammifères. Au niveau cellulaire et protéique, la voie de l'autophagie peut être modulée au sein du manteau et des hémocytes de *C. virginica* de la même manière que chez *C. gigas*. Afin de pouvoir conforter ces premiers résultats, l'utilisation d'autres outils précédemment développés chez *C. gigas* (microscopie électronique à transmission et microscopie à fluorescence) sera nécessaire. Cependant, cette première approche permet d'envisager d'étudier la voie de l'autophagie en réponse à différents stress biotiques et abiotiques incluant des organismes pathogènes chez *C. virginica*. De plus, ces travaux démontrent la nécessité d'étendre l'étude du processus autophagique à d'autres mollusques bivalves dont les génomes ont été récemment séquencés comme la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Murgarella *et al.* 2016) ou l'huître perlière (*Pinctada fucata* ou *Pinctada martensii*) (Takeuchi *et al.* 2012; Takeuchi *et al.* 2016; Du *et al.* 2017).

## 5. Conclusion



Les travaux entrepris dans le cadre de ce second chapitre ont permis de caractériser la voie de l'autophagie chez l'huître creuse japonaise au niveau cellulaire et moléculaire. Ces résultats ont également permis de travailler sur une autre espèce d'huître creuse, l'huître creuse américaine, permettant de renforcer nos résultats et hypothèses.

La première partie visait à étudier l'autophagie au niveau cellulaire au sein des hémocytes de l'huître creuse. Une approche *in vivo* a été réalisée en exposant des huîtres à des molécules connues pour inhiber ou induire l'autophagie chez les mammifères. Les hémocytes ont été analysés suivant trois approches : la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique à transmission. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que :

-  l'autophagie peut être modulée chez les hémocytes. En présence de molécules modulatrices comme le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  plus la carbamazépine, la quantité d'autophagosomes au sein de la cellule et la quantité de cellules présentant des autophagosomes augmente à 24 et 48 h après traitement.
-  dans les hémocytes, la carbamazépine dans les conditions testées, n'induit pas de modulation de la voie de l'autophagie. La même observation a été rapportée par Balbi *et al.* (2018) dans les hémocytes de la moule méditerranéenne. Cette voie pourrait répondre différemment suivant le type cellulaire étudié, puisqu'il a été montré que cette molécule avait un effet inducteur sur la voie de l'autophagie dans le manteau de l'huître creuse (Moreau *et al.* 2015). Il est aussi possible que la carbamazépine n'ait pas d'effet spécifique sur l'autophagie dans ce type cellulaire chez les mollusques bivalves. Klionsky *et al.* (2016) ont rapportés que certaines molécules pharmacologiques utilisées pour moduler la voie de l'autophagie ne sont pas spécifiques et peuvent impacter d'autres voies cellulaires au sein de la cellule. Les autres voies cellulaires pourraient empêcher l'induction de l'autophagie attendue en présence de carbamazépine.
-  des vacuoles autophagiques ont été observées dans les hémocytes. Des autophagosomes et autolysosomes ont été identifiés dans l'ensemble des conditions en microscopie électronique à transmission 24 h post-exposition avec les molécules.

L'ensemble de ces résultats indique que l'autophagie est fonctionnelle dans les hémocytes d'huître creuse et montre l'importance de combiner plusieurs approches afin de pouvoir tirer des conclusions concernant la modulation et la caractérisation de ce mécanisme au niveau cellulaire.

La seconde partie de ce chapitre a permis de caractériser la voie de l'autophagie au niveau moléculaire en identifiant les gènes la constituant chez l'huître creuse et en localisant les compartiments tissulaires où la voie de l'autophagie est exprimée. Plusieurs approches au niveau moléculaire et protéique (datamining, PCR en temps réel, western blotting et immunohistochimie) ont été utilisées pour répondre à cette problématique. Les résultats obtenus dans le cadre de cette partie montre que :

-  la voie de l'autophagie est hautement conservée au niveau structurel et constitutionnel chez l'huître creuse en comparaison avec la voie chez d'autres organismes eucaryotes. En effet, les protéines constituant le cœur moléculaire de la voie (protéines importantes pour la formation de l'autophagosome) ont été identifiées dans le génome de l'huître creuse. De plus, les ATG sont phylogénétiquement proches des ATG de la voie de l'autophagie chez les mammifères.
-  l'autophagie serait détectable de manière constitutive dans l'ensemble des compartiments tissulaires analysés de l'huître creuse. Tous les tissus de l'huître creuse expriment les gènes *mTOR*, *SQSTM1*, *MAP1LC3* et *BECN1*. Les protéines mTOR, BECN1, SQSTM1 et MAP1LC3 sont également détectables grâce à l'utilisation d'anticorps hétérologues humain dans l'ensemble des tissus testés.

Des résultats complémentaires sont présentés dans ce chapitre. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'Institute of Marine and Environmental Technology (Baltimore, USA) en se basant sur les approches précédemment développées chez *C. gigas*. Ces résultats ont permis d'étudier l'autophagie chez l'huître creuse américaine, *C. virginica*, une espèce proche de *C. gigas*. Une approche moléculaire nous a permis de rechercher des protéines de la voie de l'autophagie chez *C. virginica*. L'autophagie a également été étudiée au niveau cellulaire dans les hémocytes (cytométrie en flux) et au niveau protéique dans le manteau (western blot) en exposant des huîtres à des molécules connues pour inhiber ou induire la voie de l'autophagie chez *C. gigas*. Les résultats semblent montrés que :

- la voie de l'autophagie est présente chez *C. virginica*. L'huître creuse américaine possède les principales protéines impliquées dans la voie de l'autophagie. Ces protéines sont structurellement proches des protéines ATG de *C. gigas*.
- l'autophagie est fonctionnelle dans le manteau et les hémocytes de *C. virginica*. En présence de molécules modulatrices comme le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou  $\text{NH}_4\text{Cl}$ +carbamazépine, la voie de l'autophagie est modulée au niveau cellulaire dans les hémocytes et au niveau protéique dans le manteau à 24 h post-exposition.
- chez l'huître creuse américaine comme chez *C. gigas*, la carbamazépine n'induit pas de modulation de l'autophagie dans les hémocytes alors qu'elle induit une modulation de l'autophagie dans le manteau. Il est possible que l'autophagie réponde différemment suivant le type cellulaire étudié ou que la carbamazépine n'est pas d'effet spécifique sur l'autophagie dans ce type cellulaire chez les mollusques bivalves.

Ces travaux suggèrent une réponse similaire de l'autophagie entre *C. gigas* et *C. virginica*, cependant d'autres études seront nécessaires afin d'utiliser d'autres approches pour confirmer ces premiers résultats.

Cette caractérisation de l'autophagie au niveau cellulaire et moléculaire pourra être utilisée afin d'étudier la modulation et le fonctionnement de l'autophagie chez l'huître creuse lorsque celle-ci est soumise à un facteur de stress abiotique (salinité, jeûne,...) ou biotique (agents pathogènes,...). Dans le cadre du troisième chapitre, nous chercherons à comprendre et décrypter le rôle de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse, *C. gigas*, en réponse à une infection par le virus OsHV-1 en étudiant le processus au niveau cellulaire et moléculaire.



# CHAPITRE III

---

## **IMPLICATION DE L'AUTOPHAGIE AU COURS D'UNE INFECTION VIRALE**



## 1. Introduction

En France, le virus OsHV-1 est un organisme pathogène responsable d'épisodes de fortes mortalités observés sur les larves et le naissain de *C. gigas* depuis le début des années 1990 (Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994b; Renault *et al.* 1994a). D'importantes pertes économiques sont dues aux mortalités provoquées par ce virus. Cependant, les moyens de lutte disponibles contre OsHV-1 restent limités. L'élevage des huîtres est principalement réalisé en milieu ouvert dans lequel les animaux peuvent être exposés en permanence aux organismes pathogènes. Dans ce contexte, il reste difficile de réaliser des traitements médicamenteux afin de protéger les animaux des maladies. Une meilleure compréhension de la réponse immunitaire mise en place par l'huître creuse pour répondre à une infection virale doit permettre d'apporter de nouvelles connaissances pour envisager des voies de lutttes adaptées à cette maladie.

Comme cela a été mis en évidence dans le cadre du chapitre précédent, les protéines du cœur moléculaire de la voie de l'autophagie ont été identifiées chez *C. gigas* (Picot *et al.*, in prep), suggérant ainsi la présence de cette voie chez cette espèce. L'autophagie peut être activée en réponse à des infections d'origines bactériennes, parasitaires et virales (Schmid et Münz 2007). Suivant l'hôte et l'organisme pathogène considéré, ce mécanisme permet de séquestrer et dégrader certains éléments essentiels de l'organisme pathogène (par exemple des protéines virales) ou l'organisme pathogène dans son intégralité (Joubert *et al.* 2011).

Chez les mollusques bivalves, l'autophagie semble être l'un des mécanismes du système immunitaire impliqué en réponse à des infections par des organismes pathogènes. Ce processus a été étudié chez l'huître creuse *C. gigas* et la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* en présence de bactéries infectieuses ou non (Moreau *et al.* 2015; Balbi *et al.* 2018). Chez l'huître creuse, il a également été suggéré que l'autophagie jouerait un rôle protecteur contre une infection par OsHV-1 dans le manteau à 20 hpi (Moreau *et al.* 2015). Lorsque l'autophagie est modulée l'interprétation n'est pas toujours aisée, car certains virus sont capables de détourner l'autophagie de son rôle antiviral pour en tirer des bénéfices (Joubert *et al.* 2011; Lussignol et Esclatine 2017). Aussi, il est nécessaire de pouvoir étudier précisément le rôle joué par l'autophagie au cours d'une infection par le virus OsHV-1 à l'aide d'une approche intégrative. Dans ce cadre, plusieurs problématiques ont été posées :



- 🐚 Comment l'autophagie est-elle modulée chez *C. gigas* au cours d'une infection virale causée par le virus OsHV-1 ?
- 🐚 L'autophagie est-elle modulée de la même manière au sein de différents tissus impliqués dans la réponse à l'infection virale (l'hémolymphe et le manteau) ?
- 🐚 L'huître creuse module-t-elle l'autophagie et/ou le virus utilise-t-il ce processus pour son propre bénéfice ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons réalisé des infections expérimentales en condition *in vivo*. Des huîtres creuses ont été injectées avec le virus OsHV-1 et/ou exposées à du chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl), un inhibiteur connu de la voie de l'autophagie chez *C. gigas*. Pendant le processus d'infection, des prélèvements d'hémolymphe et de manteau ont été réalisés à différents temps (T0, 6, 10, 14, 18, 24 et 30 h). Dans un second temps, une approche par ARN interférence (ARNi) a été réalisée. Des petits ARN interférents (siRNA) ciblant le gène *ATG7* ont été utilisés afin de rendre la voie de l'autophagie non fonctionnelle. La réponse du virus et du système immunitaire de l'hôte a été étudiée dans le manteau de *C. gigas*. Dans les deux expérimentations, le développement du virus a été suivi au niveau moléculaire par des approches en PCR en temps réel. La modulation de l'autophagie a été étudiée à l'aide d'outils précédemment développés dans le second chapitre de la thèse (PCR en temps réel, cytométrie en flux et western blot).

Les résultats obtenus ont mis en évidence une réplication précoce du virus au cours de l'infection expérimentale, suivie d'une modulation de l'autophagie dans l'hémolymphe et le manteau de *C. gigas* à partir de 14 -18 h post-infection par OsHV-1. Cependant, l'autophagie est modulée de manière différente dans les deux compartiments. Une exposition combinée de *C. gigas* à du NH<sub>4</sub>Cl et au virus démontre une modulation précoce et plus forte de l'autophagie au cours de l'infection virale dans les deux tissus. Cependant, cette modulation anticipée n'a pas d'impact sur la réplication du virus. De plus, le « knock down » du gène *ATG7* semble avoir fonctionné, mais les siRNA induisent également une réponse antivirale non spécifique chez l'huître creuse, permettant de la protéger contre le virus OsHV-1. L'approche par ARNi et l'utilisation d'un modulateur connu de la voie n'ont pas permis de déterminer si l'autophagie joue un rôle antiviral ou si cette voie est manipulée par le virus. L'ensemble de ces résultats démontrent la complexité de la réponse immunitaire mise en place par l'huître creuse pour répondre à une infection par OsHV-1.

## Article 3

---

### Monitoring autophagy in *Crassostrea gigas* during an experimental Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection

Sandy Picot<sup>1</sup>, Nicole Faury<sup>1</sup>, Isabelle Arzu<sup>1</sup>, Camille Pelletier<sup>1</sup>, Bruno Chollet<sup>1</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Tristan Renault<sup>2</sup>, Benjamin Morga<sup>1\*</sup>

#### Affiliations

<sup>1</sup> Ifremer, SG2M-LGPMM, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France.

<sup>2</sup> Ifremer, Département Ressources Biologiques et Environnement, Nantes, France

Corresponding author:

Benjamin Morga

E-mail address: Benjamin.morga@ifremer.fr,

Tel +33 5 46 76 26 49

Fax +33 5 46 76 26 11

Funding details: This work received financial support from the European project 15 VIVALDI (H2020 n°678589)

## Abstract

Mortality outbreaks of young Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, have seriously affected the oyster-farming economy in several countries around the world. Although the causes of these mortality outbreaks appear complex, a viral agent has been identified as the main factor: a herpesvirus called ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1).

Autophagy is an important degradation pathway involved in the response to several pathologies including viral diseases. In *C. gigas*, recent studies indicate that this pathway is present and functional in at least haemocytes and the mantle. Furthermore, an experimental infection in combination with compounds known to inhibit or induce autophagy in mammals revealed that autophagy is involved in the response to OsHV-1 infection. In light of these results, the aim of this study was to determine the role of autophagy in the response of the Pacific oyster to infection by virus OsHV-1.

For this purpose, an experimental infection in combination with a modulator of autophagy was performed on Pacific oysters known to have intermediate susceptibility to OsHV-1 infection. In a second experimental infection, a knockdown of the *ATG7* gene was performed. In haemolymph and the mantle, the autophagy response was monitored by flow cytometry, western blotting, and real-time PCR. At the same time, viral infection was evaluated by quantifying viral DNA and RNA amounts by real-time PCR.

Although the results showed activation of autophagy in haemolymph and the mantle 14 hours post infection (after viral replication was initiated), they were also indicative of different regulatory mechanisms of autophagy in the two tissues, thus supporting an important function of autophagy in the response to virus OsHV-1. Moreover, the *ATG7* knockdown revealed that small interfering RNA induced a nonspecific antiviral state protecting the Pacific oyster from the viral infection.

**Keywords:** autophagy, *Crassostrea gigas*, Pacific oyster, innate immunity, OsHV-1

## Introduction

Increased hatchery production and livestock translocation contribute to the increasing occurrence and spread of infectious diseases among bivalves (Barbosa Solomieu *et al.* 2015). Recently, disease outbreaks significantly affected farmed Pacific oysters in Europe and in other parts of the world (Barbosa Solomieu *et al.* 2015). Since 1990, mortality of spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was observed due to a virus called ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in France and in other European and world regions (Nicolas *et al.* 1992; Hine *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b; Friedman *et al.* 1997; Cherr and Friedman 1998; Lynch *et al.* 2012; Peeler *et al.* 2012). This double-stranded DNA enveloped virus is currently the only known characterized member of the Malacoherpesviridae family, and its reference genotype was published in 2005 (Davison *et al.* 2005). In 2008, the emergence of a specific genotype of this virus called  $\mu$ Var was associated with mass mortality outbreaks among spat and juvenile *C. gigas* (Segarra *et al.* 2010). All the French oyster production areas were affected, and between 40% and 100% of Pacific oyster spat died.

Other studies have generally focused on the identification of antiviral compounds to expand the knowledge about the mechanisms underlying the resistance of the Pacific oyster to a viral infection (Bachère *et al.* 1990; Olicard *et al.* 2005; Renault *et al.* 2011; Green *et al.* 2014). Recent genome sequencing of the Pacific oyster (Zhang *et al.* 2012) opened up new perspectives on this specie and in particular on the immune-system mechanisms (He *et al.* 2015; Rosani *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2015). These studies and bioinformatic analysis of the Pacific oyster genome have indicated that several innate immune pathways of mammals seem to exist in this specie. It has been suggested that *C. gigas* can control a viral infection by means of the RNA interference (RNAi) pathway, an interferon-like pathway, apoptosis, and via autophagy (Zhang *et al.* 2011; Green and Montagnani 2013; Segarra *et al.* 2014a; Segarra *et al.* 2014c; Green *et al.* 2015; He *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2015; Martenot *et al.* 2017).

Macroautophagy, which is more commonly simply called autophagy, is a pathway widely conserved among eukaryotes. This process involves engulfment of a portion of the cytoplasm with components of the cell (from proteins to whole organelles) for their degradation by fusion with lysosomes (Levine and Deretic 2007). Autophagy participates in key cellular processes including cellular homeostasis, starvation adaptation, cell death, and immune response to pathogens (Klionsky and Emr 2000; Mizushima 2005; Deretic 2006; Schmid and

Münz 2007). This cellular mechanism can block the replication of (or infection by) different pathogens including viruses, bacteria, and parasites.

In *C. gigas*, autophagy has been characterized in the mantle and haemocytes (Picot *et al.*, in prep). In these two compartments, it has been shown that autophagy flux exists using molecules well known to modulate the autophagy pathway in mammals (Picot *et al.* accepted; Moreau *et al.* 2015). Furthermore, these tissues have been demonstrated to be affected by a viral infection. The mantle has been reported to be a target organ during OsHV-1 infection (Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 2001; Schikorski *et al.* 2011a; Segarra *et al.* 2016). The presence of viral mRNA is detected earlier in the process of viral infection (Segarra *et al.* 2014b; Segarra *et al.* 2014c). Haemocytes are the principal effectors of the oyster immune system (Allam and Raftos 2015). It has been suggested that haemocytes are carrier cells responsible for the transport of OsHV-1 to target organs by way of haemolymph during the earlier stages of viral infection (Schikorski *et al.* 2011a; Segarra *et al.* 2016; Morga *et al.* 2017). One study showed that 20 h post infection (hpi), the autophagy pathway is imply in the presence of virus OsHV-1 in the mantle of *C. gigas* (Moreau *et al.* 2015).

To clarify the role of autophagy in the response of the Pacific oyster to infection with virus OsHV-1, two experimental infections were carried out here using respectively a known inhibitor of autophagy (NH<sub>4</sub>Cl) and small interfering RNA (siRNA; used to knock down *ATG7*). Both autophagy and development of the virus were monitored concurrently in the mantle and haemolymph. Autophagy was measured by cellular (flow cytometry and western blotting) and complementary molecular approaches (real-time PCR) previously reported by Picot *et al.* (accepted) and Picot *et al.* (in prep). The viral DNA load and expression of three viral genes were monitored by real-time PCR during the experimental infection. For the first time, this study revealed (via an integrated approach) activation of autophagy in the mantle and haemolymph of *C. gigas* after replication of the virus was initiated. The results indicate different regulatory mechanisms in the two tissues in response to virus OsHV-1. Moreover, the *ATG7* knock down showed that siRNA induced a nonspecific antiviral state protecting the Pacific oyster from the viral infection.

## Materials and Methods

### *Oyster production*

For the experiment using a modulator of the autophagy pathway, *C. gigas* spat were produced at the Ifremer facilities in La Tremblade (Charente-Maritime, France) from one selected family. This family was selected on the basis of its intermediate susceptibility to the viral infection as tested under experimental conditions as described by Segarra *et al.* (2014b). Spawn occurred in May 2016 and larval and spat cultures were performed as described by Degremont *et al.* (2005) and Azéma *et al.* (2017). All growth steps involved filtered and UV-treated seawater to prevent contamination with pathogens including OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus*.

For the RNAi experiment, *C. gigas* spat were produced at the Ifremer hatchery in Argenton (Finistère, France) from standardized spat from an Ifremer family. This family was selected on the basis of its intermediate susceptibility to the viral infection as tested under experimental conditions described by Segarra *et al.* (2014b).

Prior to the two experiments, spat were acclimated via a constant flow of filtered and UV-treated seawater enriched in phytoplankton (*Skeletonema costatum*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis suecica*) in 120 L tanks at 19°C for at least 2 weeks.

### *Experimental design including pharmacological agent and virus OsHV-1*

Seven hundred fifty oysters were “anesthetized” for 4 h in a solution containing magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>, 50 g/L) in seawater mixed with distilled water (1:4, v/v) (Schikorski *et al.* 2011b). Each tank contained 15 oysters. Different conditions were tested: (1) oysters injected with 100 µL of an OsHV-1 suspension at  $1 \times 10^4$  copies of viral DNA/µL and kept in seawater (12 tanks), (2) oysters injected with 100 µL of an OsHV-1 suspension at  $1 \times 10^4$  copies of viral DNA/µL and kept in seawater supplemented with NH<sub>4</sub>Cl at 1 mM (12 tanks), (3) oysters injected with sterile artificial seawater and kept in seawater (12 tanks), or (4) oysters injected with sterile artificial seawater and kept in seawater supplemented with NH<sub>4</sub>Cl at 1 mM (12 tanks). Two tanks of each condition were sampled at 6, 10, 14, 18, 24, and 30 h post infection. At T0 (time before oysters were incubated under the different tested conditions), two pools of 15 oysters were sampled to record the basal level of autophagy in the mantle and haemolymph. At each sampling time point and for each condition, pieces of the mantle were collected from six Pacific oysters for viral DNA detection, analysis of

expression of viral and autophagy genes, and western blotting. In parallel, haemolymph was withdrawn from the adductor muscle of Pacific oysters with a 1 mL syringe equipped with a needle (0.6 × 32 mm) as described by Picot *et al.* (accepted). The haemolymph of the 15 oysters in each tank was pooled for viral DNA detection, analysis of expression of viral and autophagy genes, and flow cytometry.

Survival was monitored for 7 days after injection (three tanks of 15 oysters per condition). Percentages of cumulative survival were determined daily for the different conditions. Dead oysters were removed from tanks in the course of the experiment.

### ***The RNAi experiment: siRNA synthesis and OsHV-1 experimental infection***

Based on the sequence of *ATG7*, two siRNAs were synthesized by Genecust (Ellange, Luxembourg) along with a negative control siRNA consisting of a sequence proposed by the manufacturer. The two *ATG7* siRNA sequences were 5'-AACAACTACAGTTTGTGGCAT-3' and 5'-AATGTACTGTGTTTGCAGAT-3' and the negative control siRNA sequence was 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'.

A group of eight Pacific oyster spat was injected (into the adductor muscle) with 277 µg of *ATG7* siRNA (a mixture of 138 µg of each *ATG7* siRNA). A second group of eight oysters was injected with 277 µg of the negative control siRNA. A third group consisting of eight oysters was injected with Tris-NaCl. After injection with siRNA, the oysters were challenged with OsHV-1. Four oysters of the three groups were injected with 100 µL of a viral suspension at  $1.07 \times 10^5$  copies of viral DNA/µL per oyster into the adductor muscle. At the same time, 100 µL of artificial seawater was injected into the four other oysters of each group as a negative control. At 44 h after OsHV-1 injection, pieces of the mantle were collected from four oysters of each group with or without the virus for viral DNA detection, analysis of expression of autophagy genes, and western blotting.

### ***DNA extraction***

Total DNA was extracted from the mantle or haemolymph using the QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Elution was performed in 200 µL (for mantle extraction) and 50 µL (for haemolymph extraction) of AE buffer provided in the kit. The DNA quality and quantity were determined on a NanoDrop 2000 instrument (Thermo Scientific, <http://www.nanodrop.com>).

### ***OsHV-1 DNA quantification by real-time PCR***

OsHV-1 DNA quantification was estimated by real-time PCR in duplicate according to Pepin *et al.* (2008) on a Mx3000 Thermocycler sequence detector (Agilent). Amplification reactions were carried out in a total volume of 20  $\mu$ L. Each well contained 5  $\mu$ L of genomic DNA (5 ng/mL), 10  $\mu$ L of Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green Master Mix (Agilent), 2  $\mu$ L of each primer (5.5  $\mu$ M: OsHV-1 DPFor 5'-ATTGATGATGTGGATAATCTGTG-3', 5.5  $\mu$ M OsHV-1 DPRev 5'-GGTAAATACCATTGGTCTTGTTC-3') (Webb *et al.* 2007), and 1  $\mu$ L of distilled water. Real-time PCR cycling conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 5 s and 60°C for 20 s. The results were expressed as  $\log_{10}$  of virus DNA copy numbers per nanogram of total DNA.

### ***V. aestuarianus DNA detection by real-time PCR***

For detection and quantification of bacteria, pieces of the mantle of oysters from the NH<sub>4</sub>Cl group were individually crushed in 150  $\mu$ L of sterile seawater. Then, 100  $\mu$ L of the supernatant was diluted 100-fold and 10,000-fold, and each dilution was spread onto zobell agar in Petri dishes, which were incubated for 48–72 h at 20°C. Colonies were enumerated, and the bacterial colonies found in abundance were isolated and tested by real-time PCR for the detection of *V. aestuarianus* following the protocol described by Saulnier *et al.* (2009).

### ***Total RNA extraction and cDNA synthesis***

From each tissue, total RNA was extracted with the TRIzol™ Reagent (Ambion) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was treated with TURBO™ DNase (Invitrogen) to remove genomic DNA. The quality and quantity of the RNA were determined on the NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Mock reverse transcription was performed after each DNase treatment to verify the absence of oyster and/or viral genomic DNA. First-strand cDNA synthesis was carried out by means of SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with 500 ng of the treated RNA.

### ***Expression of Viral genes***

Real-time PCR was carried out to monitor the expression of three viral genes (ORFs 80, 87, and 99). These three ORFs were selected due to their protein functions and earlier expression during viral infection (Davison *et al.* 2005; Segarra *et al.* 2014b; Morga *et al.* 2017). ORF 80 is a putative membrane protein and ORFs 87 and 99 are protein inhibitors of apoptosis.



Expression of the three viral genes was determined by the protocol described by Segarra *et al.* (2014a) with 5  $\mu$ L of cDNA dilution (1/30) instead of genomic DNA. Normalized relative viral gene expression levels were calculated for each sample with the formula:  $\Delta C_t = C_t \text{ ORF} - C_t \text{ Elongation factor 1}\alpha \text{ (EF1-}\alpha\text{)}$ . The gene expression level ( $\Delta C_t$ ) of the initial array data was transformed as follows:  $[1 - (\Delta C_t / C_t \text{ EF1-}\alpha)] / 100$ .  $C_t$  (threshold cycle) corresponds to the PCR cycle number.

### ***Expression of Immunity genes***

Moreover, the relative expression of seven immunity genes in *C. gigas* spat was analyzed during the OsHV-1 experimental infection at T0, 6, 10, 14, 18, 24, and 30 hpi. The relative quantification value (ratio R) was calculated by the method described by Pfaffl (2001):  $R = [(E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target}(\text{control-sample})}] / [(E_{\text{ref}})^{\Delta C_t \text{ ref}(\text{control-sample})}]$ . The efficiency of each primer pair was determined by constructing a standard curve from serial dilutions (Table 1). These seven genes of the Pacific oyster were (i) myeloid differentiation factor 88 (MyD88), (ii) interferon-induced protein 44 (IFI44), (iii) sequestosome 1 (*SQSTM1*), (iv) microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3A (*MAP1LC3A*), (v) beclin-1 (*BECN1*), (vi) serine/threonine protein kinase ULK2 (*ULK2*), and (vii) autophagy-related protein 7 (*ATG7*; Table 1). Host gene expression was normalized to EF1- $\alpha$ , because no significant differences in  $C_t$  values were observed for this housekeeping gene among several conditions in the course of the experiment. The calibrator in this experiment was individuals sampled at T0.

### ***Flow cytometry***

Before autophagic activity was investigated in haemocytes, haemocyte mortality was determined. As described by Gagnaire (2005), haemocyte mortality was measured in 200  $\mu$ L of a cell suspension sampled from each condition (two replicates) and at each sampling time point. The cells were incubated in the dark for 30 min at 4°C with 10  $\mu$ L of propidium iodide (PI, 1 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, cat. # P3566).

Then, percentages of haemocytes with autophagic activity were quantified with the commercial Cyto-ID<sup>®</sup> autophagy detection kit (ENZO Life Sciences, ENZ-51031-K200) as described by Picot *et al.* (accepted).

For each sample, 5000 events were acquired on an EPICS XL 4 cytometer (Beckman Coulter, USA). Size discrimination was implemented to ensure that small particles or bacteria were not counted, so that only haemocytes were taken into account when cell activity was measured.

The results were depicted as cell cytograms and reported as log scale fluorescence levels of each marker tested. The results were expressed as differences between the percentage of haemocytes that positively presented autophagosomes for each condition and the percentage of haemocytes labeled in the artificial seawater condition at each sampling time point. Flow cytometry data were analyzed in Flowing software 2.5.1 (University of Turku, Finland).

### ***Western blot***

Pieces of the mantle were collected from Pacific oysters (20 to 25 mg). Mantle protein extraction and western blot were performed as reported by Picot *et al.* (in prep). Thirty micrograms of each pool of the mantle protein extract was loaded onto an SDS polyacrylamide gel (Bio-Rad). Primary antibodies against MAP1LC3 (#3738, Cell Signaling Technology), actin (A4700, Sigma-Aldrich), and against SQSTM1 (P0067, Sigma-Aldrich) were respectively diluted at 1/1000, 1/500, and 1/6000.

MAP1LC3-II/actin and SQSTM1/actin ratios were calculated based on densitometry analysis of the bands in the ImageJ software (v. 1.51q). Each sample was normalized to actin and calibrated in comparison with the control condition for each experiment.

### ***Data analysis***

All analyses were conducted in the R studio software (version 3.3.2). First, normality of all the datasets was tested by the Shapiro–Wilk test, and homogeneity of variances was assumed because of the results of Bartlett's test.

Kaplan–Meier survival curves and the logrank test were used to characterize and compare survival between oyster groups (packages survival, v2.39-5, and survminer, v. 0.4.3).

OsHV-1 DNA amounts were compared between groups “virus” and “virus+NH<sub>4</sub>Cl” for each tissue by the Kruskal–Wallis test (package PMCMR, v. 4.1). In haemolymph, the sampling time points were subdivided into two categories. The first category consisted of the early sampling time points (6, 10, and 14 hpi), and the second of the late sampling time points (18, 24, and 30 hpi). For the mantle, results of each sampling time point were tested separately. Scatterplots and trend curves were built with package ggplot2 (version 2.2.1).

Relative expression of oyster and viral genes are presented as scatterplots with trend curves (package ggplot2, v 2.2.1). The Kruskal–Wallis test was carried out to determine whether significant differences exist between experimental treatments at different sampling time

points. In haemolymph, the difference was tested at early (6, 10, and 14 hpi) and late time points (18, 24, and 30 hpi) of the experimental infection. For the mantle, results of each sampling time point were tested separately.

Flow cytometry data were compared between the conditions tested and the artificial seawater condition at early (6, 10, and 14 hpi) and late (18, 24, and 30 hpi) time points of the experimental infection by Student's *t* test. Scatterplots and trend curves were constructed using package ggplot2.

Western blot data were compared by the Mann–Whitney test between the conditions tested and the artificial seawater group at early and late time points of the experimental infection. Bar plots were built by means of package ggplot2.

## Results

### *Mortality*

To assess the effects of OsHV-1 and NH<sub>4</sub>Cl on Pacific oyster spat, survival was monitored for 7 days post infection (dpi). No oyster mortality was detected in the artificial seawater group (Fig. 1). In the NH<sub>4</sub>Cl group, the mean survival rate was 83% at 7 days post exposure. The presence of virus OsHV-1 and bacterium *V. aestuarianus* was investigated by real-time PCR in dead animals. The results did not allow us to detect the bacterium or the virus in any dead animal. The mean survival rates in the virus group (60%) and virus+NH<sub>4</sub>Cl group (20%) were significantly different from the results obtained for the seawater group at 7 dpi ( $p \leq 0.05$ ). At the same time, significant differences in the mean survival rate were observed between the NH<sub>4</sub>Cl and virus+NH<sub>4</sub>Cl groups ( $p \leq 0.05$ ) and the virus and virus+NH<sub>4</sub>Cl groups ( $p \leq 0.05$ ).

### *Detection of OsHV-1 DNA and RNA in the mantle and the haemolymph of C. gigas*

Viral DNA detection was conducted in the haemolymph and mantle of Pacific oysters during the process of infection (Fig. 2A). Viral DNA and RNA amounts were monitored at each sampling time point (T0, 6, 10, 14, 18, 24, and 30 hpi).

In haemolymph and the mantle, no viral DNA was detected in artificial seawater and NH<sub>4</sub>Cl groups (Fig. 2A). OsHV-1 DNA could be detected as early as 6 hpi in both tissues tested in the virus group and virus+NH<sub>4</sub>Cl group. In haemolymph (Fig. 2A), the viral DNA amount

increased from 6 to 18 hpi in the virus group ( $1.03 \times 10^6 \pm 6.21 \times 10^5$  viral DNA copies/ $\mu\text{L}$  of haemolymph) to 24 hpi in the virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group ( $4.02 \times 10^5 \pm 1.91 \times 10^5$  viral DNA copies/ $\mu\text{L}$  of haemolymph). After that, the viral DNA amount tended to stay stable until the end of the experiment in the two groups. No significant difference was observed between the virus group and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group at early (6 to 14 hpi) and late (18 to 30 hpi) time points of the experimental infection in haemolymph. In the mantle (Fig. 2A), viral DNA amounts increased from 6 until 30 hpi in virus and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  groups. The maximal viral DNA amounts were detected at 30 hpi in the virus group ( $6.57 \times 10^4 \pm 1.54 \times 10^5$  viral DNA copies/ $\mu\text{L}$  of haemolymph) and in the virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group ( $1.26 \times 10^5 \pm 2.89 \times 10^5$  viral DNA copies/ $\mu\text{L}$  of haemolymph, respectively). No significant difference was observed between the virus group and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group at any sampling time point in the mantle.

The expression of three viral ORFs was monitored by real-time PCR (Fig. 2B) to estimate viral replication in the haemolymph and mantle under the different conditions at each sampling time point. In the mantle and haemolymph, the first detection of viral RNA of the three genes was observed at 6 hpi in the virus group and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group (Fig. 2B). In haemolymph, the viral RNA amount increased exponentially at the beginning of the experiment and tended to stay stable until the end of the experiment in the virus group and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  group (Fig. 2B). In the mantle, the viral transcripts of the three ORFs were detected from 6 until 30 hpi, but their expression manifested high variation among individuals (Fig. 2B). No significant differences in the relative expression of each ORF was thus detected between the two groups in the course of the experiment in haemolymph and the mantle.

### ***Monitoring of haemocyte mortality in oyster haemolymph***

Prior to monitoring the autophagic activity by flow cytometry, haemocyte mortality was evaluated with PI. In all the tested groups at all sampling time points, the mean cell mortality never exceeded 11.9%.

### ***Monitoring of autophagic activity in oysters exposed to OsHV-1***

In the oyster haemolymph from the virus group, the autophagic activity was determined by calculating the difference in the percentages of cells containing autophagosomes between the virus group and artificial seawater group (Fig. 3A). At late (18 to 30 hpi) time points of the experimental infection, the difference significantly increased and stayed positive in comparison with early (6 to 14 hpi) time points of the experimental infection ( $p \leq 0.05$ ).

These results indicated that the percentage of cells containing autophagosomes was higher in the virus group between 18 and 30 hpi. The relative expression of five autophagy genes was monitored in the oyster haemolymph from the virus group (Fig. 3B). The results revealed that the relative expression of *ULK2*, *SQSTM1*, and *MAP1LC3A* was significantly higher in the virus group in comparison with the artificial seawater group at later time points of the experimental infection (18 to 30 hpi;  $p \leq 0.05$ ).

In the mantle, *MAP1LC3A* and *ULK2* relative expression levels were significantly higher at two time points (14 and 30 hpi;  $p \leq 0.05$ ) in the virus group (Fig. 3B). The relative expression of *SQSTM1* significantly increased from 24 to 30 hpi ( $p \leq 0.05$ ). Relative expression of *BECN1* significantly increased at 30 hpi ( $p \leq 0.05$ ). *ATG7* relative expression did not seem to vary during the experiment. At the protein level, the SQSTM1/actin ratio was determined by western blotting to follow the protein quantity of SQSTM1 in the mantle of *C. gigas* (Fig. 3C). The results indicated that the SQSTM1 protein quantity significantly increased in the virus group relative to the seawater group at the later time points of the experiment (18 to 30 hpi).

### ***Monitoring of autophagic activity in oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl***

The monitoring of autophagic activity by flow cytometry revealed a significant increase in the percentage of cells containing autophagosomes in the NH<sub>4</sub>Cl group in comparison with the artificial seawater group at late time points (18 to 30 h post exposure (hpe)) of the experimental exposure to NH<sub>4</sub>Cl ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 4A). On the other hand, in the NH<sub>4</sub>Cl group, the relative expression of *MAP1LC3A*, *ULK2*, and *SQSTM1* was higher at early (6 to 14 hpe) and late time points (18 to 30 hpe) of the experimental infection in comparison with the artificial seawater group ( $p \leq 0.05$ ). *ATG7* and *BECN1* expression showed no significant difference between the NH<sub>4</sub>Cl group and artificial seawater group.

In the mantle, genes *MAP1LC3A* and *ULK2* were significantly upregulated respectively from 10 to 30 hpe and from 6 to 30 hpe ( $p \leq 0.05$ ) in the NH<sub>4</sub>Cl group (Fig. 4B). *SQSTM1* was significantly upregulated from 10 to 30 hpe ( $p \leq 0.05$ ). The relative expression of *ATG7* and *BECN1* stayed weak in comparison with their expression levels in the seawater group. Nevertheless, *ATG7* was significantly upregulated from 6 to 24 hpe, and *BECN1* was upregulated at 30 hpe ( $p \leq 0.05$ ) in the presence of NH<sub>4</sub>Cl. Moreover, we observed an increase in the protein SQSTM1 amount by western blot analysis. In fact, the results indicated

that the SQSTM1 protein quantity was significantly higher in the NH<sub>4</sub>Cl group than the artificial seawater group during early (6 to 14 hpe) time points of the experimental infection ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 4C).

### ***Monitoring of autophagic activity in oysters exposed to virus+NH<sub>4</sub>Cl***

The monitoring of the autophagic activity by flow cytometry suggested that the percentage of cells containing autophagosomes was significantly higher in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group than in the artificial seawater group at late (18 to 30 hpi) time points of the experimental infection ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 5A). At the molecular level, the relative expression of genes *MAP1LC3A*, *SQSTM1*, and *ULK2* was significantly upregulated at early (6 to 14 hpi) and late (18 to 30 hpi) time points in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group in comparison with the artificial seawater group ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 5B). *BECN1* and *ATG7* expression showed no significant differences between the two tested groups.

In the mantle, relative expression of *MAP1LC3A* was significantly higher from 14 to 24 hpi in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group in comparison with the seawater group ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 5B). *ULK2* was significantly upregulated from 6 to 30 hpi ( $p \leq 0.05$ ). *SQSTM1* was significantly upregulated in comparison with the seawater group from 6 to 30 hpi ( $p \leq 0.05$ ). *ATG7* was statistically but weakly upregulated at 6, 10, and 18 hpi ( $p \leq 0.05$ ). Relative expression of *BECN1* did not vary during the experiment. The protein ratio SQSTM1/actin confirmed the increase in the quantity of the SQSTM1 protein in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group relative to the seawater group at early (6 to 14 hpi) and late (18 to 30 hpi) time points of the experiment ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 5C).

### ***Knockdown of ATG7 by siRNA***

To investigate the participation of autophagy in the *C. gigas* response to OsHV-1 infection, an siRNA experimental infection was conducted to reduce the expression of the *ATG7* gene involved in the two conjugation systems, LC3 and ATG12. The virus replication was monitored by detecting OsHV-1 DNA in each group in the oyster mantle (Fig. 6A). No viral DNA was detected in the three groups without the virus (Tris-NaCl, negative siRNA, and *ATG7* siRNA) and in groups negative siRNA+virus and *ATG7* siRNA+virus. Viral DNA was detected in the Tris-NaCl+virus group ( $3.86 \times 10^5 \pm 3.9 \times 10^5$  viral DNA copies/ $\mu$ g of total DNA).

Autophagy was followed by measuring the relative gene expression of three key *ATG* genes (*SQSTM1*, *MAP1LC3A*, and *ATG7*) in the different groups, with the Tris-NaCl group as a calibrator (Fig. 6B). The relative expression of the three genes did not significantly increase in the Tris-NaCl+virus group in comparison with the Tris-NaCl group. In the *ATG7* siRNA+virus group, we found that *ATG7* was not over expressed and that the expression of *MAP1LC3A* significantly increased in comparison with that in the Tris-NaCl group. In the negative siRNA+virus group, *MAP1LC3A* was significantly under expressed in comparison with the negative siRNA group.

The relative expression levels of two other immunity genes (Fig. 6B) were also studied. The results suggested that the relative expression of MYD88 was not significantly different across the tested conditions. In contrast, the relative gene expression of IFI44 increased significantly in all the tested groups in comparison with the Tris-NaCl group ( $p \leq 0.05$ ). The relative expression of IFI44 increased in the presence of negative siRNA or *ATG7* siRNA ( $p \leq 0.05$ ). A significant difference in the relative expression of IFI44 was observed between the Tris-NaCl+virus group and Tris-NaCl group and between the *ATG7* siRNA+virus group and *ATG7* siRNA group. In the negative siRNA+virus group, the relative expression of IFI44 was not significantly different from the negative siRNA group.

To confirm the results obtained by real-time PCR, autophagy was monitored at the protein level, by determining protein levels of MAP1LC3-II and SQSTM1 in different groups (Fig. 6C). The results revealed that the protein level of MAP1LC3-II tended to weakly decrease when oysters were injected with *ATG7* siRNA or *ATG7* siRNA+virus in comparison with the Tris-NaCl group (Fig. 6C). In oysters injected with negative siRNA or with negative siRNA + virus, the level of MAP1LC3-II did not change in comparison with that in the Tris-NaCl group. Moreover, in the Tris-NaCl+virus group, the level of MAP1LC3-II tended to increase. The same trend was observed for the level of SQSTM1 in the Tris-NaCl+virus group (Fig. 6C). The level of SQSTM1 did not seem to vary in groups negative siRNA, *ATG7* siRNA, and negative siRNA+virus in comparison with the Tris-NaCl group. Nevertheless, the level of SQSTM1 tended to increase in the *ATG7* siRNA+virus group in comparison with that in the Tris-NaCl group.

## Discussion

*C. gigas* is the most important aquaculture farming resource in France. This specie is widely cultivated due to its good growth capacity and resistance to environmental factors (FAO 2018b; FAO 2018a). Nonetheless, since 1990, virus OsHV-1 has been responsible for mortality events among Pacific oyster spat (Nicolas *et al.* 1992; Renault *et al.* 1994a; Renault *et al.* 1994b). Despite the impact of the mortality caused by this virus on the aquaculture economy, few countermeasures are available. The innate immunity mechanisms of *C. gigas* involved in the response to OsHV-1 need to be documented more thoroughly. Recently, autophagy, one of the innate immunity pathways of the Pacific oyster, was investigated in the mantle of *C. gigas* and was demonstrated to participate in the response to OsHV-1 infection (Moreau *et al.* 2015). In that study, autophagy was investigated in a single tissue of the Pacific oyster, the mantle, and at a single time point during the viral infection.

In the present study, we investigated the role played by autophagy in *C. gigas* during OsHV-1 infection using an integrated approach. An experimental infection was carried out in combination with a known inhibitor of the autophagy pathway, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl). During this experiment, autophagy kinetics were monitored in the mantle and haemolymph by different cellular (flow cytometry, western blot) and molecular (real-time PCR) approaches. Then, a knockdown of the *ATG7* gene was performed to study the biological function of this pathway during viral infection.

The first experimental infection was performed by intramuscular injection of a viral suspension into *C. gigas* spat. Oyster survival was monitored for 7 dpi. Higher mortality rates were observed in oysters injected with the virus and exposed to NH<sub>4</sub>Cl and to a lesser extent in oysters injected only with the virus. Similar results were obtained by Moreau *et al.* (2015). Nevertheless, these authors did not detect mortality in oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl alone. In our experiment, a low mortality rate (17%) was observed among the oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl alone. Because OsHV-1 or *V. aestuarianus* DNA were not detected, these deaths appeared to be unrelated to these pathogens generally responsible for *C. gigas* mortality. On the other hand, the presence of other pathogens that may kill *C. gigas* was not investigated here. Moreover, the animals used in the experiment were mature. *C. gigas* is highly sensitive to changes in biotic and abiotic factors during gametogenesis (Berthelin *et al.* 2000; Li *et al.* 2007; Enríquez-Díaz *et al.* 2008). Perhaps sexually mature animals are more susceptible to



NH<sub>4</sub>Cl exposure than immature oysters. Finally, exploration of autophagy in relation to viral infection was performed before first deaths were observed.

First, the modulation of autophagy was investigated in Pacific oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl. This reagent was employed in the experiment owing to its capacity to inhibit autophagy, namely, specific suppression of autophagosome degradation (Sharifi *et al.* 2015; Klionsky *et al.* 2016). In haemolymph and the mantle, our results uncovered modulation of autophagy genes starting from 6 hpe. NH<sub>4</sub>Cl induced a modulation of the autophagy genes. Moreover, the percentage of cells containing autophagosomes and expressing protein SQSTM1 significantly increased respectively since 18 and 6 hpe. SQSTM1 is a protein required for the formation and degradation of polyubiquitin-containing bodies via autophagy (Pankiv *et al.* 2007). This protein is a marker used to study autophagy flux (Bjørkøy *et al.* 2009). Our results indicated that NH<sub>4</sub>Cl induced accumulation of the SQSTM1 protein in the mantle. In the haemolymph, accumulation of autophagosomes was observed through an increase in the percentage of haemocytes containing autophagosomes. This analysis indicates that in the two tissues, autophagy was functional and was inhibited by NH<sub>4</sub>Cl. Similar results were already obtained in the haemocytes and mantle of *C. gigas* by means of the same reagent (Picot *et al.* accepted; Moreau *et al.* 2015). In haemocytes, the percentage of cells containing autophagosomes significantly increased in oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl at 24 hpe (Picot *et al.* accepted). In the mantle, accumulation of the MAP1LC3-II protein (another key protein of the autophagy pathway) revealed inhibition of autophagy at 20 hpe as determined by western blotting (Moreau *et al.* 2015). The results of our experiment suggest that in *C. gigas*, expression of autophagy genes and proteins can be induced earlier than previously reported in the literature in the presence of NH<sub>4</sub>Cl.

The autophagy modulation was also investigated in oysters injected with OsHV-1. Several key genes of the autophagy pathway were significantly upregulated at 14 and 24–30 hpi in the mantle, and at late time points (18 to 30 hpi) of the experimental infection, in haemolymph. These results suggest that the virus can induce a modulation of autophagy genes. Upregulation of several *ATG* genes has already been reported at the transcriptional level after influenza virus infection (Klionsky *et al.* 2016). In the mantle of low-susceptibility Pacific oysters injected with OsHV-1, upregulation of *BECN1* at 8 to 12 hpi was reported (Moreau *et al.* 2015). In an analysis at different time points, we demonstrated here that several autophagy genes were upregulated at two time points in the mantle, whereas in the haemolymph, they were upregulated at one time point. These results point to different modulation of autophagy

at the transcriptional level in the two tissues. Moreover, at the protein level, the expression of SQSTM1 significantly increased between 18 and 30 hpi in the mantle. In haemolymph, the percentage of cells containing autophagosomes significantly increased from 18 to 30 hpi. These results confirmed that OsHV-1 induced a modulation of the autophagy flux in the two tissues tested. In the mantle of *C. gigas*, a similar result was obtained by Moreau *et al.* (2015). Accumulation of the MAP1LC3-II protein was also demonstrated by western blotting, indicating that the autophagy flux was modulated at 20 hpi by OsHV-1. These findings are in agreement with the existing literature. For instance, induction of autophagy flux during the Sindbis virus infection in mouse embryonic fibroblasts was reported (Orvedahl *et al.* 2010; Chiramel *et al.* 2013).

In parallel, the viral replication was monitored. Viral DNA and RNA were detected in the two tissues starting from 6 hpi, indicating early replication of the virus in Pacific oysters. It has already been demonstrated that viral DNA can be detected in the mantle and the haemolymph of Pacific oyster spat since 6 hpi (Schikorski *et al.* 2011a). Moreover, viral transcripts of some OsHV-1 ORFs can be detected starting from 2 hpi in the mantle and from 1 h post contact in the haemolymph (Segarra *et al.* 2014b; Morga *et al.* 2017). By contrast, the viral replication kinetics seem to be different depending on the tissue considered. In haemolymph, the amounts of viral DNA and RNA strongly increased and reached a plateau, whereas in the mantle, the amount of viral DNA increased, and the expression levels of viral genes were stable. All our results indicate that the virus seems to start to replicate in the two tissues of *C. gigas* before the autophagy flux is modulated. Nonetheless, the autophagy modulation and the virus response are different between haemolymph and the mantle. It could be hypothesized that the two compartments regulate autophagy differently due to their different physiological functions. Dissimilar modulation of autophagy across different tissues of *Caenorhabditis elegans* in response to stress (starvation or anoxia) or aging has already been observed (Chapin *et al.* 2015). Moreover, it is also possible that in our study, the virus did not target the two compartments with the same aim and strategy. In fact, the mantle of *C. gigas* is an organ targeted by the virus, whereas in haemolymph, the haemocytes can serve as the cells transporting the virus OsHV-1 to target organs (Segarra *et al.* 2016; Morga *et al.* 2017).

Next, the autophagy modulation was followed in Pacific oysters exposed to NH<sub>4</sub>Cl and injected with the virus. In haemolymph and the mantle, autophagy gene expression levels increased starting from 6 hpi. In the presence of the virus and NH<sub>4</sub>Cl, this result means early modulation of autophagy genes in the two tissues. Moreover, the expression of protein

SQSTM1 increased earlier and more strongly. The SQSTM1 protein quantity was found to be significantly higher in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group than in the artificial seawater group at early (6 to 14 hpi) and late time points (18 to 30 hpi) of the experimental infection. In haemolymph, the percentage of cells containing autophagosomes significantly increased in the virus+NH<sub>4</sub>Cl group relative to the artificial seawater group at later time points of the experiment (18 to 30 hpi). In the two tissues, there was earlier and/or stronger induction of autophagy flux in the presence of the virus and NH<sub>4</sub>Cl than in the presence of the virus alone. This earlier and stronger autophagy induction can be partially due to the inhibition of autophagy by NH<sub>4</sub>Cl and an interaction with the infection process. It is important to remember that NH<sub>4</sub>Cl acts quite late in the autophagy process, inhibiting degradation of autophagosomes and promoting autophagosome accumulation. Moreover, autophagy is a process that is involved in the response to viral infections. This process can exert an antiviral action by degrading viral particles or viral proteins via its cellular mechanism (Tallóczy *et al.* 2006; Orvedahl *et al.* 2010; Judith *et al.* 2013; Sagnier *et al.* 2015). Nevertheless, it is known that the autophagy mechanism can be hijacked by viruses, e.g., herpesvirus among others, to enhance their replication, to be transported, or to exit the cell (Cavignac and Esclatine 2010; Miszczak and Cymerys 2014; Jackson 2015; Lussignol and Esclatine 2017).

In the mantle and haemolymph, no significant difference in viral DNA and RNA was detected between virus and virus+NH<sub>4</sub>Cl groups. In another study carried out at 20 hpi, no significant difference in viral DNA was observed in the mantle of Pacific oysters exposed to the virus and to virus+NH<sub>4</sub>Cl (Moreau *et al.* 2015). Unexpectedly, in these tissues, stronger and earlier modulation of autophagy does not induce a change in virus development. On the other hand, Moreau *et al.* (2015) demonstrated that inhibition of the autophagy pathway by NH<sub>4</sub>Cl increases the rate of mortality during OsHV-1 infection. Two hypotheses can be proposed to explain these results. Because the oyster family used here manifested an intermediate level of susceptibility to viral infection, it is possible that at the individual level, oysters can present a high level of variability in the severity of infection associated with high variability of viral DNA and RNA. This variability can conceal the effect of autophagy inhibition on viral replication. Besides, these results can suggest that inhibition of the degradation of autophagosomes by lysosomes has no effect on viral development in the two tissues. It is possible that the use of NH<sub>4</sub>Cl does not allow us to determine the role played by autophagy in the response to a viral infection. Perhaps the reason is that this compound does not inhibit the autophagic sequestration step to work.

Nevertheless, using other known inhibitors of the autophagy pathway to block autophagosome formation could be an alternative strategy to study the role played by autophagy during a viral infection. Several pharmacological agents are available to inhibit the nucleation step of autophagy (Galluzzi *et al.* 2017). Wortmannin and 3-methyladenine, two inhibitors of PIK3C3 function (class III phosphatidylinositol-3-kinase) are good candidates (Toogood 2002; Rubinsztein *et al.* 2007). Nevertheless, the majority of these pharmacological agents serving to modulate the autophagy pathway have low pharmacological specificity for their target and can influence several other cellular pathways as well (Klionsky *et al.* 2016; Galluzzi *et al.* 2017). Therefore, in addition to the tested autophagy modulators, the role of autophagy in the response to viral infection needs to be investigated via other approaches (Klionsky *et al.* 2016). Development of a gene silencing approach to determine (by inverse genetics) the role of autophagy in the response to virus infection can be another option.

To better understand the role of the autophagy pathway, we carried out a knockdown of *ATG7* by siRNA. This gene is involved in the two conjugation systems LC3 and ATG12 and is important for the elongation step of autophagy (Yang and Klionsky 2010; Klionsky and Schulman 2014). A knockdown of *ATG7* is one of the most definitive ways to demonstrate the role of autophagy (Gottlieb *et al.* 2015). In the presence of *ATG7* siRNA, a weak decrease in the MAP1LC3-II protein level was observed. We supposed that silencing of *ATG7* can reduce the MAP1LC3-II protein level by inhibiting the autophagosome production. These results suggest that *ATG7* siRNA targeted the autophagy pathway. Nonetheless, the quantity of siRNA injected per animal was not sufficient to induce complete suppression of autophagy. In the presence of the virus without siRNA, viral DNA was detected and was associated with an increase in the MAP1LC3-II and SQSTM1 protein levels. As expected, these findings pointed to modulation of autophagy in the presence of the virus. Of note, in the presence of the virus with addition of the negative or *ATG7* siRNA, no viral DNA was detected. Autophagy gene *MAP1LC3A* expression was not affected in the presence of negative siRNA, whereas in the presence of *ATG7* siRNA, *MAP1LC3A* was upregulated in comparison with the Tris-NaCl group. These results mean that autophagy genes modulation seems to differ depending on the siRNA injected in the presence of the virus. At the protein level, in the presence of the virus, MAP1LC3-II and SQSTM1 expression did not seem to change in the negative siRNA group, whereas in the *ATG7* siRNA group, the MAP1LC3-II level tended to decrease and the SQSTM1 level tended to increase. Depending on the type of injected siRNA, autophagy flux modulation seems to differ in the presence of the virus. In addition, *IFI44*

gene expression was significantly upregulated in the presence of the negative siRNA or *ATG7* siRNA. This gene is a key player of interest in the context of viral infection and has been associated with a real ability of *C. gigas* to defend itself against a viral infection (Renault *et al.* 2011; Segarra *et al.* 2014c; Morga *et al.* 2017). It has already been reported that an increase in the expression of this gene promotes an antiviral state consistent with the resistance to OsHV-1 infection. All these results seem to indicate that injection of negative siRNA seems to induce a nonspecific antiviral state preventing viral infection of Pacific oysters. By contrast, the knockdown of one gene involved in the innate immune system of the Pacific oyster has been demonstrated by means of siRNA, and a nonspecific antiviral state was not detected (Li *et al.* 2016). In contrast to our study, those authors did not look at the response of other immune pathways of *C. gigas* during their experiment. Moreover, a nonspecific antiviral state preventing mortality related to OsHV-1 infection in *C. gigas* has already been induced via an RNAi approach (Pauletto *et al.* 2017). Using dsRNA targeting an immunity gene called *IκB2*, that study revealed upregulation of several genes participating in other pathways of the antiviral defense of *C. gigas*. Those authors suggest that the use of dsRNA can activate other immune pathways by way of Rel/NF-κB and interferon-like molecules. The siRNA may in the same way have induced a nonspecific antiviral state in oysters in our experiment. Moreover, a nonspecific antiviral state preventing mortality related to OsHV-1 infection was induced by polyI:C, a nonspecific stimulant structurally similar to dsRNA (Green and Montagnani 2013). As in Pauletto *et al.* (2017) and our study, they reported upregulation of several genes taking part in several immune pathways of *C. gigas*. This RNAi approach shows the complexity of antiviral mechanisms employed by the Pacific oyster to fight against a viral infection.

## Conclusion

In this study, we demonstrated that autophagy is active during infection by OsHV-1. The results showed that viral replication was initiated before autophagy was activated (Fig. 7). Nevertheless, the autophagy modulation differs depending on the tissue being considered. Using a known inhibitor of autophagy, called NH<sub>4</sub>Cl, we found that autophagy can be inhibited beforehand in two tissues, the mantle and haemolymph, during the experiment. Because of the additive effects of NH<sub>4</sub>Cl and OsHV-1, earlier and stronger inhibition of autophagy was observed during the viral infection. Nevertheless, in the two tissues, inhibition

of autophagy does not seem to be related to viral replication. Finally, a knockdown of *ATG7* was effective but did not allow us to determine the biological function of autophagy during the viral infection. In fact, our experiment revealed that siRNA can induce a nonspecific antiviral state that protects Pacific oysters against a viral infection. Further research is needed to determine whether autophagy has an antiviral function or is manipulated by the virus for its own benefit.

## References

- Allam, B., and Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**, 121–136. doi:10.1016/j.jip.2015.05.005
- Azéma, P., Lamy, J.-B., Boudry, P., Renault, T., Travers, M.-A., and Dégremont, L. (2017). Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genetics Selection Evolution* **49**, 1–16. doi:10.1186/s12711-017-0297-2
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., and Grizel, H. (1990). Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and Comparative Immunology* **14**, 261–268.
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., and 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. doi:10.1016/j.jip.2015.07.011
- Berthelin, C., Kellner, K., and Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **125**, 359–369. doi:10.1016/S0305-0491(99)00187-X
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., and Johansen, T. (2009). Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In 'Methods in Enzymology'. Autophagy in Mammalian Systems, Part B. pp. 181–197. (Academic Press.) doi:10.1016/S0076-6879(08)03612-4
- Cavignac, Y., and Esclatine, A. (2010). Herpesviruses and Autophagy: Catch Me If You Can! *Viruses* **2**, 314–333. doi:10.3390/v2010314
- Chapin, H. C., Okada, M., Merz, A. J., and Miller, D. L. (2015). Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*. *Aging* **7**, 419–434. doi:10.18632/aging.100765
- Cherr, G. N., and Friedman, C. S. (1998). Investigation of a mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Tomales Bay, California. *California Sea Grant Report of Completed Projects 1994-1997No. R-044 California Sea Grand College System, La Jolla, CA*, 167–172.
- Chiramel, A. I., Brady, N. R., and Bartenschlager, R. (2013). Divergent roles of autophagy in virus infection. *Cells* **2**, 83–104. doi:10.3390/cells2010083
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R.-M., and Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *The Journal of General Virology* **86**, 41–53. doi:10.1099/vir.0.80382-0
- Dégremont, L., Bedier, E., Soletchnik, P., Ropert, M., Huvet, A., Moal, J., Samain, J.-F., and Boudry, P. (2005). Relative importance of family, site, and field placement timing on

- survival, growth, and yield of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* **249**, 213–229. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.046
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology* **18**, 375–382. doi:10.1016/j.coi.2006.05.019
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., and Le Pennec, M. (2008). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International* **17**, 491. doi:10.1007/s10499-008-9219-1
- FAO (2018a). Fisheries & Aquaculture - Collections Statistiques de La Pêche - Production mondiale de l'aquaculture. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/fr> [accessed 9 September 2018]
- FAO (2018b). Fisheries & Aquaculture - Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Available at: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/fr](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/fr) [accessed 19 September 2018]
- Friedman, C. S., Shamseldin, A., Pallai, M. C., Olin, P. G., and 5 others (1997). Summer mortality and the stress response of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. shellfish Res* **16**.
- Gagnaire, B. (2005). Etude des effets de polluants sur les paramètres hématologiques de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Université de la Rochelle.
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Levine, B., Green, D. R., and Kroemer, G. (2017). Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nature Reviews. Drug Discovery* **16**, 487–511. doi:10.1038/nrd.2017.22
- Gottlieb, R. A., Andres, A. M., Sin, J., and Taylor, D. (2015). Untangling Autophagy Measurements: All Fluxed Up. *Circulation research* **116**, 504–514. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303787
- Green, T. J., and 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  $\mu$ var). *Fish & Shellfish Immunology* **35**, 382–388. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.051
- Green, T. J., Raftos, D., Speck, P., and Montagnani, C. (2015). Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* **96**, 2471–2482. doi:10.1099/jgv.0.000244
- Green, T. J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O'Connor, W., and 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. doi:10.1016/j.antiviral.2014.08.010



- He, Y., Jouaux, A., Ford, S. E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., and Guo, X. (2015). Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish & Shellfish Immunology* **46**, 131–144. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.023
- Hine, M., Wesney, B., and Hay, B. (1992). Herpesviruses Associated with Mortalities among Hatchery-Reared Larval Pacific Oysters *Crassostrea-Gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms - DISEASE AQUAT ORG* **12**, 135–142. doi:10.3354/dao012135
- Jackson, W. T. (2015). Viruses and the autophagy pathway. *Virology* **479–480**, 450–456. doi:10.1016/j.virol.2015.03.042
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P.-O., Couderc, T., and Lecuit, M. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO reports* **14**, 534–544. doi:10.1038/embor.2013.51
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)* **290**, 1717–1721.
- Klionsky, D. J., and Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**, 336–345. doi:10.1038/nsmb.2787
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* **7**, 767–777. doi:10.1038/nri2161
- Li, Y., Qin, J. G., Abbott, C. A., Li, X., and Benkendorff, K. (2007). Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **293**, R2353-2362. doi:10.1152/ajpregu.00463.2007
- Li, Y., Zhang, L., Qu, T., Li, L., and Zhang, G. (2016). Characterization of Oyster Voltage-Dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Suggests Its Involvement in Apoptosis and Host Defense. *PLOS ONE* **11**, e0146049. doi:10.1371/journal.pone.0146049
- Lussignol, M., and Esclatine, A. (2017). Herpesvirus and Autophagy: “All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!” *Viruses* **9**. doi:10.3390/v9120372
- Lynch, S. A., Carlsson, J., Reilly, A. O., Cotter, E., and Culloty, S. C. (2012). A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* **139**, 1526–1532. doi:10.1017/S0031182012000881
- Martenot, C., Gervais, O., Chollet, B., Houssin, M., and Renault, T. (2017). Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection

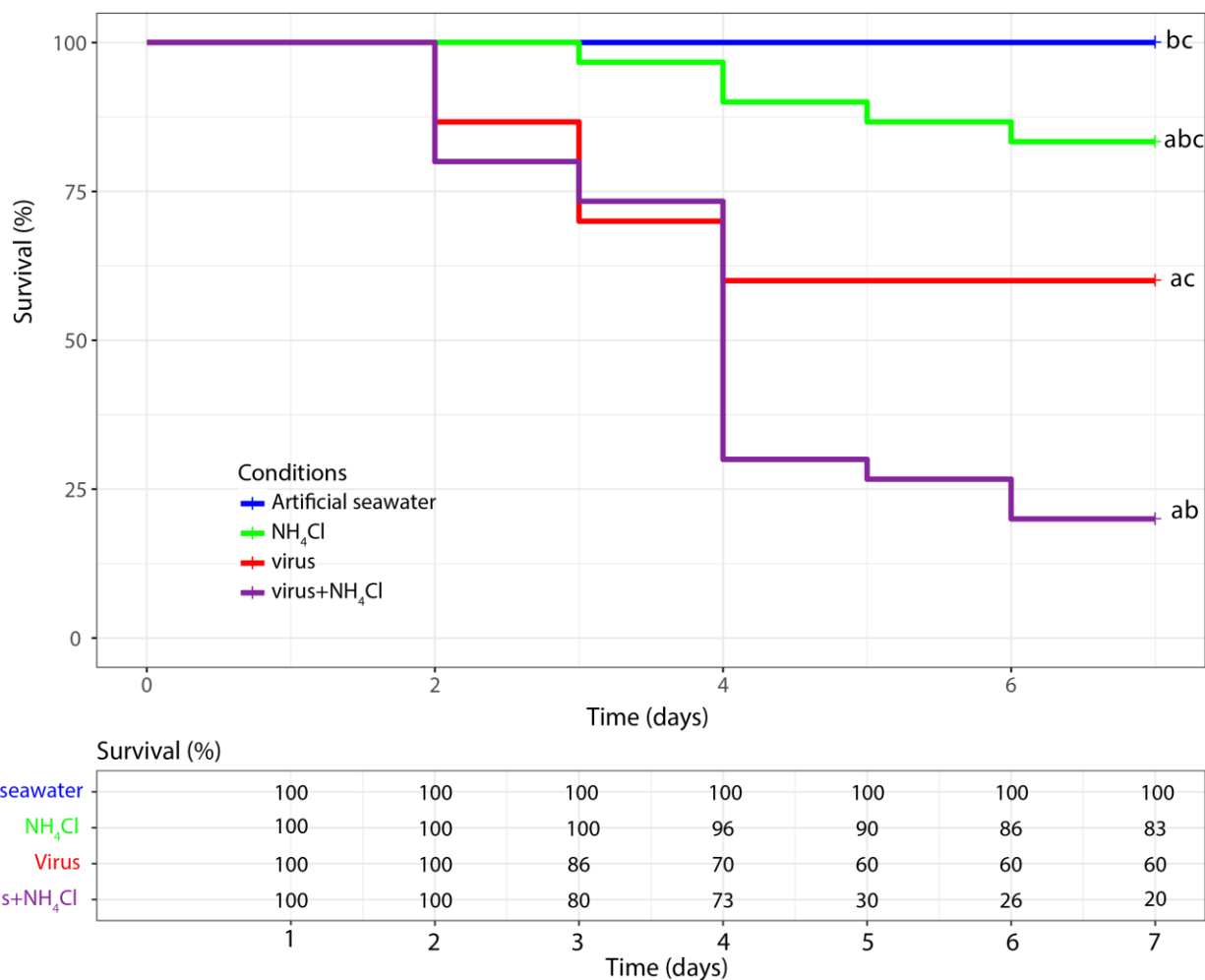
- of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *PLoS One* **12**, e0177448. doi:10.1371/journal.pone.0177448
- Miszczak, D., and Cymerys, J. (2014). A game of survival: Herpesvirus strategies of autophagy manipulation. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine* **68**, 1406–14. doi:10.5604/17322693.1130653
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation* **12 Suppl 2**, 1535–1541. doi:10.1038/sj.cdd.4401728
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.-A., Rubinsztein, D. C., and Renault, T. (2015). Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* **11**, 516–526. doi:10.1080/15548627.2015.1017188
- Morga, B., Faury, N., Guesdon, S., Chollet, B., and Renault, T. (2017). Haemocytes from *Crassostrea gigas* and OsHV-1: A promising in vitro system to study host/virus interactions. *Journal of Invertebrate Pathology* **150**, 45–53. doi:10.1016/j.jip.2017.09.007
- Nicolas, J. L., Comps, M., and Cochenec, N. (Ifremer (1992). Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., and Bourgougnon, N. (2005). Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* **66**, 147–152. doi:10.1016/j.antiviral.2005.03.003
- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., and Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host & Microbe* **7**, 115–127. doi:10.1016/j.chom.2010.01.007
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 24131–24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Pauletto, M., Segarra, A., Montagnani, C., Quillien, V., Faury, N., Le Grand, J., Miner, P., Petton, B., Labreuche, Y., Fleury, E., Fabioux, C., Bargelloni, L., Renault, T., and Huvet, A. (2017). Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *The Journal of Experimental Biology*. doi:10.1242/jeb.156299
- Peeler, E. J., Allan Reese, R., Cheslett, D. L., Geoghegan, F., Power, A., and Thrush, M. A. (2012). Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1  $\mu$ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* **105**, 136–143. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.02.001

- Pepin, J. F., Riou, A., and Renault, T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* **149**, 269–276. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.022
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Picot, S., Morga, B., Faury, N., Chollet, B., Dégremont, L., Travers, M.-A., Renault, T., and Arzul, I. (accepted). A study of autophagy in haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Autophagy*.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M., and Chollet, B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of fish Pathologists* **14**, 64–66.
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., and Moreau, K. (2011). Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Developmental & Comparative Immunology* **35**, 725–735. doi:10.1016/j.dci.2011.02.004
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N., and Maffart, P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire* **145**, 735–742.
- Renault, T., Lipart, C., and Arzul, I. (2001). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases* **24**, 369–376. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00300.x
- Rosani, U., Varotto, L., Domeneghetti, S., Arcangeli, G., Pallavicini, A., and Venier, P. (2015). Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environmental Microbiology* **17**, 4200–4212. doi:10.1111/1462-2920.12706
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., and Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**, 304–312. doi:10.1038/nrd2272
- Sagnier, S., Daussy, C. F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F. P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., and Espert, L. (2015). Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes. *Journal of Virology* **89**, 615–625. doi:10.1128/JVI.02174-14
- Saulnier, D., De Decker, S., and Haffner, P. (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: A useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* **77**, 191–197. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.021
- Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J. F., Saulnier, D., Tourbiez, D., and Renault, T. (2011a). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*:

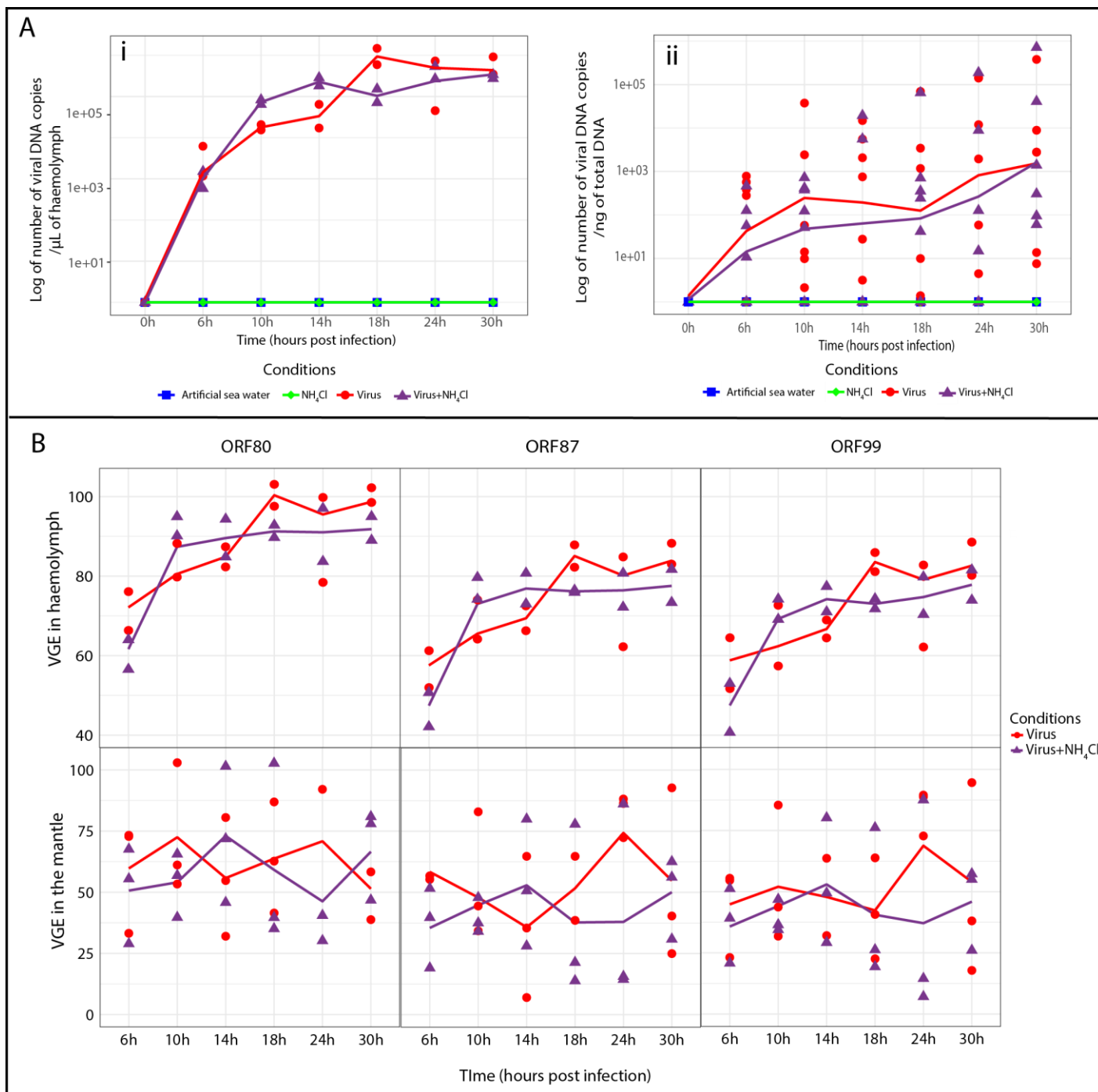
- Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* **155**, 28–34. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.031
- Schikorski, D., Renault, T., Saulnier, D., Faury, N., Moreau, P., and Pépin, J.-F. (2011b). Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* **42**, 27. doi:10.1186/1297-9716-42-27
- Schmid, D., and Münz, C. (2007). Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity* **27**, 11–21. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.004
- Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Tourbiez, D., and Renault, T. (2016). Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *Journal of Invertebrate Pathology* **133**, 59–65. doi:10.1016/j.jip.2015.11.013
- Segarra, A., Baillon, L., Tourbiez, D., Benabdelmouna, A., Faury, N., Bourgoignon, N., and Renault, T. (2014a). Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* **45**, 103. doi:10.1186/s13567-014-0103-x
- Segarra, A., Faury, N., Pépin, J.-F., and Renault, T. (2014b). Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **119**, 5–11. doi:10.1016/j.jip.2014.03.002
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., and Renault, T. (2014c). Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC genomics* **15**, 580. doi:10.1186/1471-2164-15-580
- Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., and 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. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., and Macleod, K. F. (2015). Measuring Autophagy in Stressed Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1292**, 129–150. doi:10.1007/978-1-4939-2522-3\_10
- Tallóczy, Z., Virgin, H. W., and Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24–29.
- Toogood, P. L. (2002). Inhibition of protein-protein association by small molecules: approaches and progress. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 1543–1558.
- Webb, S. C., Fidler, A., and Renault, T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*. Available at: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300838194> [accessed 13 November 2018]

- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* **22**, 124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., et al. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, L., Li, L., and Zhang, G. (2011). Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental & Comparative Immunology* **35**, 603–610. doi:10.1016/j.dci.2011.01.005

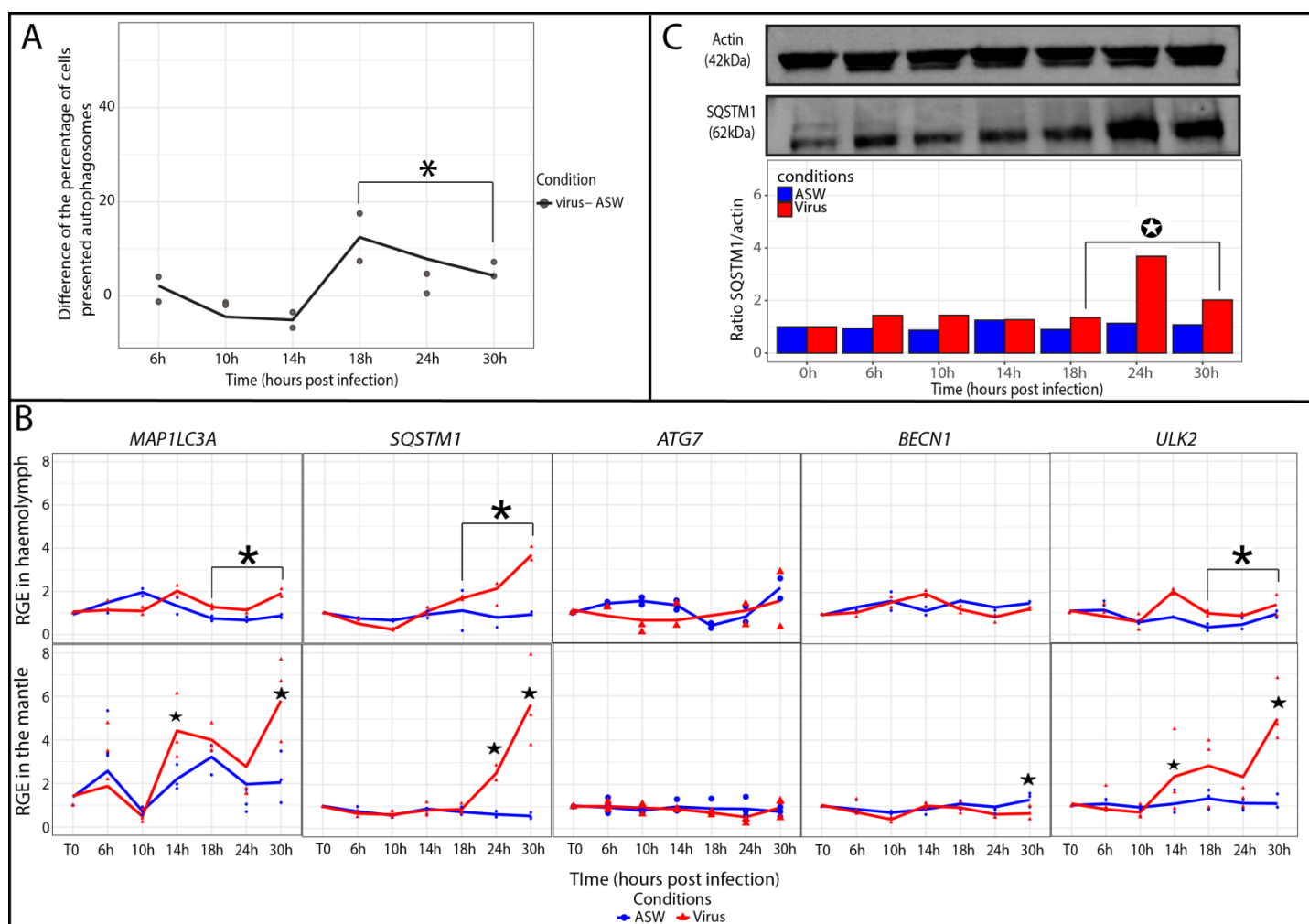
### Figures



**Figure 1.** Kaplan-Meier survival curves of the pacific oyster *C. gigas* injected with the virus OsHV-1, exposed to NH<sub>4</sub>Cl or injected with OsHV-1 and exposed to NH<sub>4</sub>Cl. The control condition corresponds to pacific oysters injected with artificial sea water. In each condition the mortality was monitored on n=30 oysters. a: significant difference with the artificial seawater condition (p < 0.05). b: significant difference with the virus condition (p < 0.05). c: significant difference with the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition (p < 0.05).

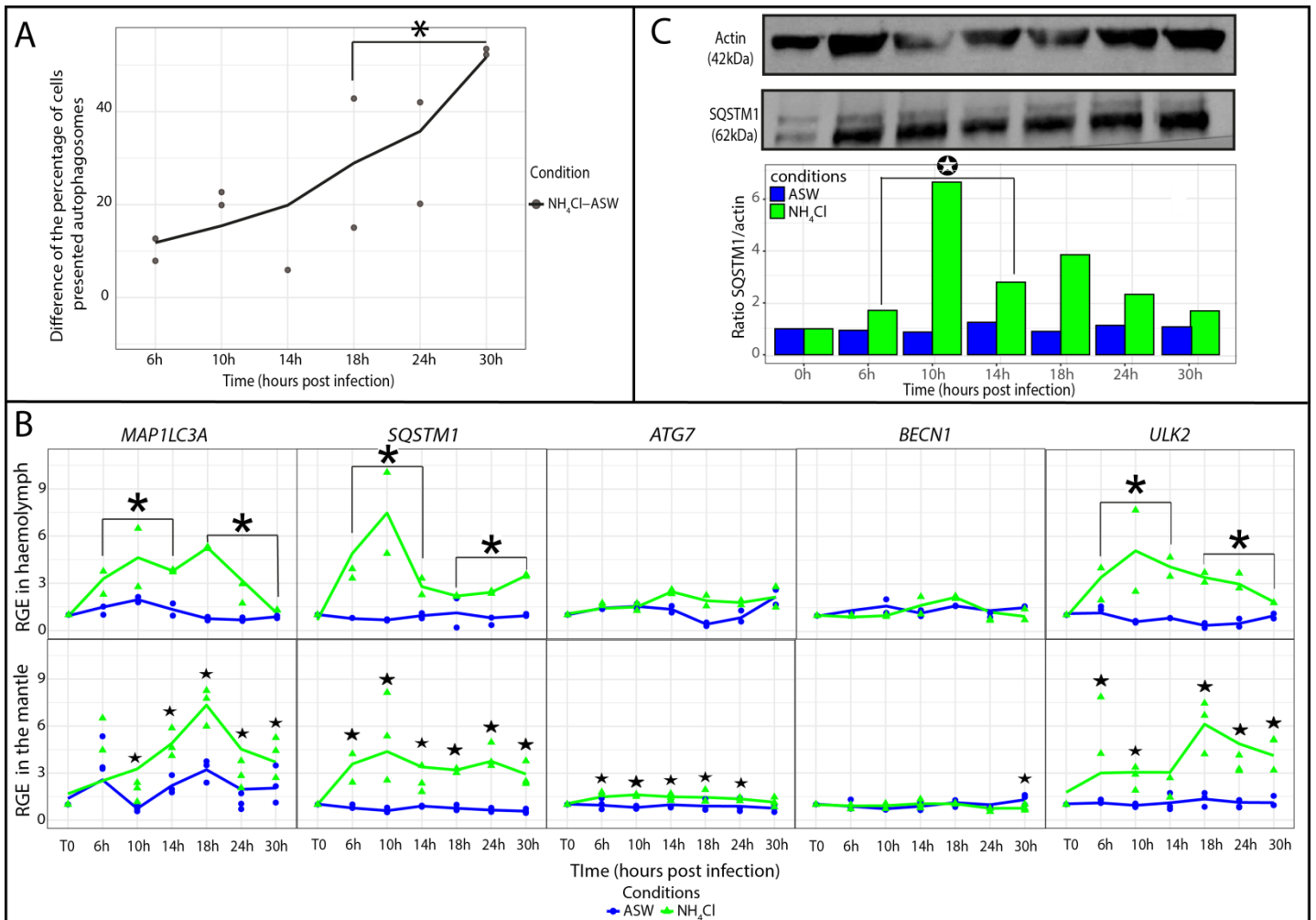


**Figure 2.** Detection of OsHV-1 DNA and RNA in haemolymph and mantle of *C. gigas*. A. Viral DNA amounts detected by real time PCR in Pacific oysters of the four different tested conditions (artificial seawater,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , virus and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) after injection by OsHV-1 (i) in haemolymph (n=2 pools of 15 animals) and (ii) in the mantle. (n=6 animals) The line represents the trend curve of viral DNA amount in the virus condition (red line) and the virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition (purple line). No significant difference was observed between the virus and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  conditions in the mantle and haemolymph. B. Relative genes expressions of ORF 80, ORF 87 and ORF 99 estimated by RT-PCR at different time of exposure for the virus and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition in haemolymph (n= 2 pools of 15 animals) and mantle (n=3 animals). The line represents the trend curve of the expression of each gene in the virus condition (red line) and the virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition (purple line). No significant difference was observed between the virus and virus+ $\text{NH}_4\text{Cl}$  condition in haemolymph and the mantle of the Pacific oyster. VGE= viral gene expression.

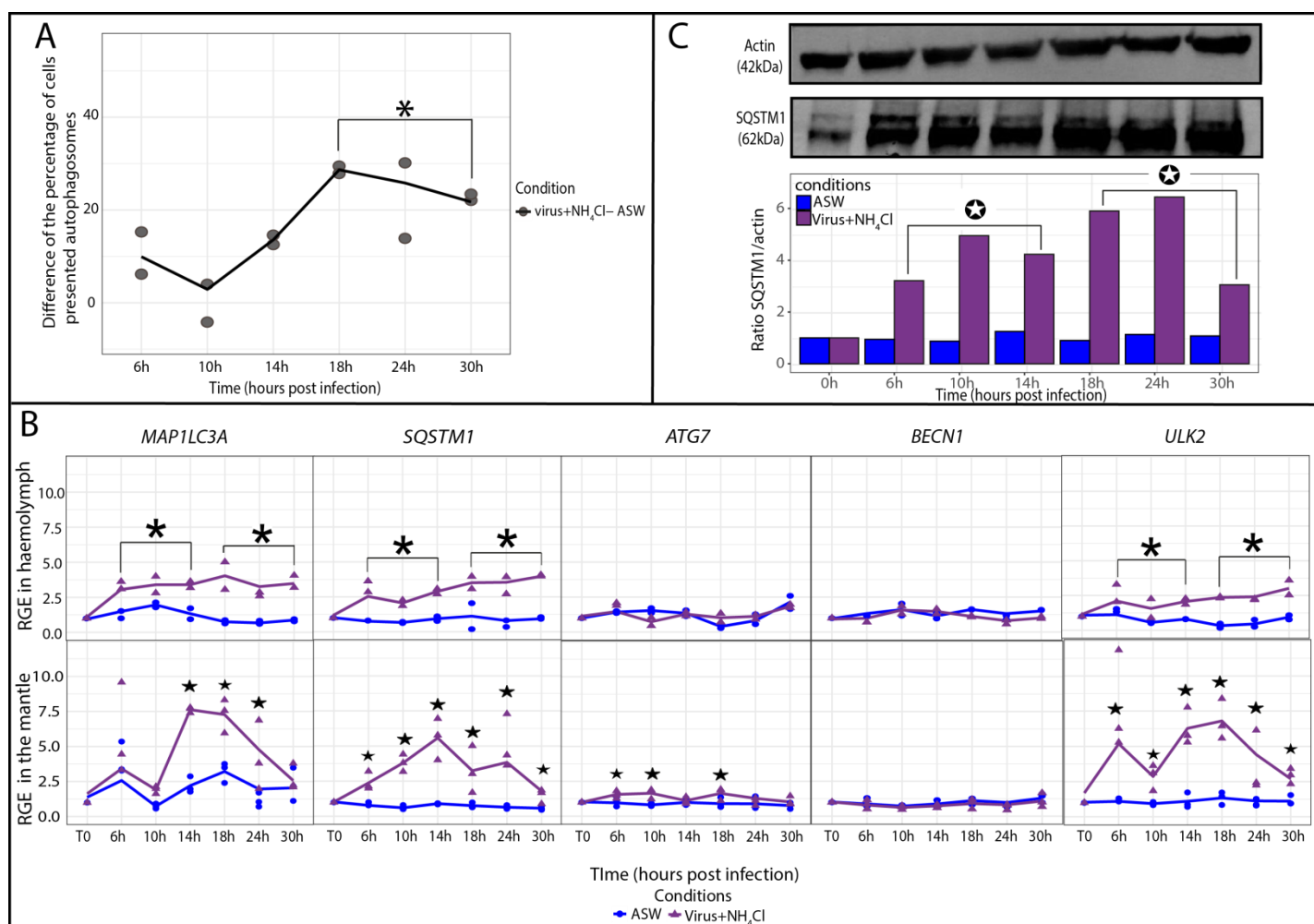


**Figure 3.** Modulation of the autophagy in Pacific oyster exposed to OshV-1. **A.** Monitoring of autophagy in haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry. Scatterplot of the difference of the percentage of haemocytes presented autophagosomes between the seawater condition (ASW) and the virus condition from 6 to 30 hpi (n=2 pools of 15 animals). The line represents the trend curve of the difference of percentage of cells between the two conditions. \* Significant increase of the difference of the percentage of cells presented autophagosomes between the virus and seawater condition ( $p \leq 0.05$ ). **B.** Relative gene expression of key autophagy genes in haemolymph and the mantle of the Pacific oysters, *C. gigas*, in ASW condition (blue) and virus condition (red) at each sampling time point (T0, 6, 10, 14, 18, 24 and 30 hpi) detected by real time PCR (haemolymph: n=2 pools of 15 animals; mantle : n=3 animals). The line represents the trend curve of the expression of each gene in the virus condition (red) and the ASW condition (blue). \* Significant difference between the virus and ASW condition at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection ( $p \leq 0.05$ ). ★ Significant difference between the virus and ASW conditions of the same time point ( $p \leq 0.05$ ). RGE= relative gene expression. **C.** Detection of the autophagy protein SQSTM1 in the mantle of *C. gigas* during the kinetic of infection by OshV-1 in the virus condition at each sampling time point (for each time point n=1 pool of 3 animals). ⚙ Significant differences between the virus and ASW condition at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection ( $p \leq 0.05$ ).

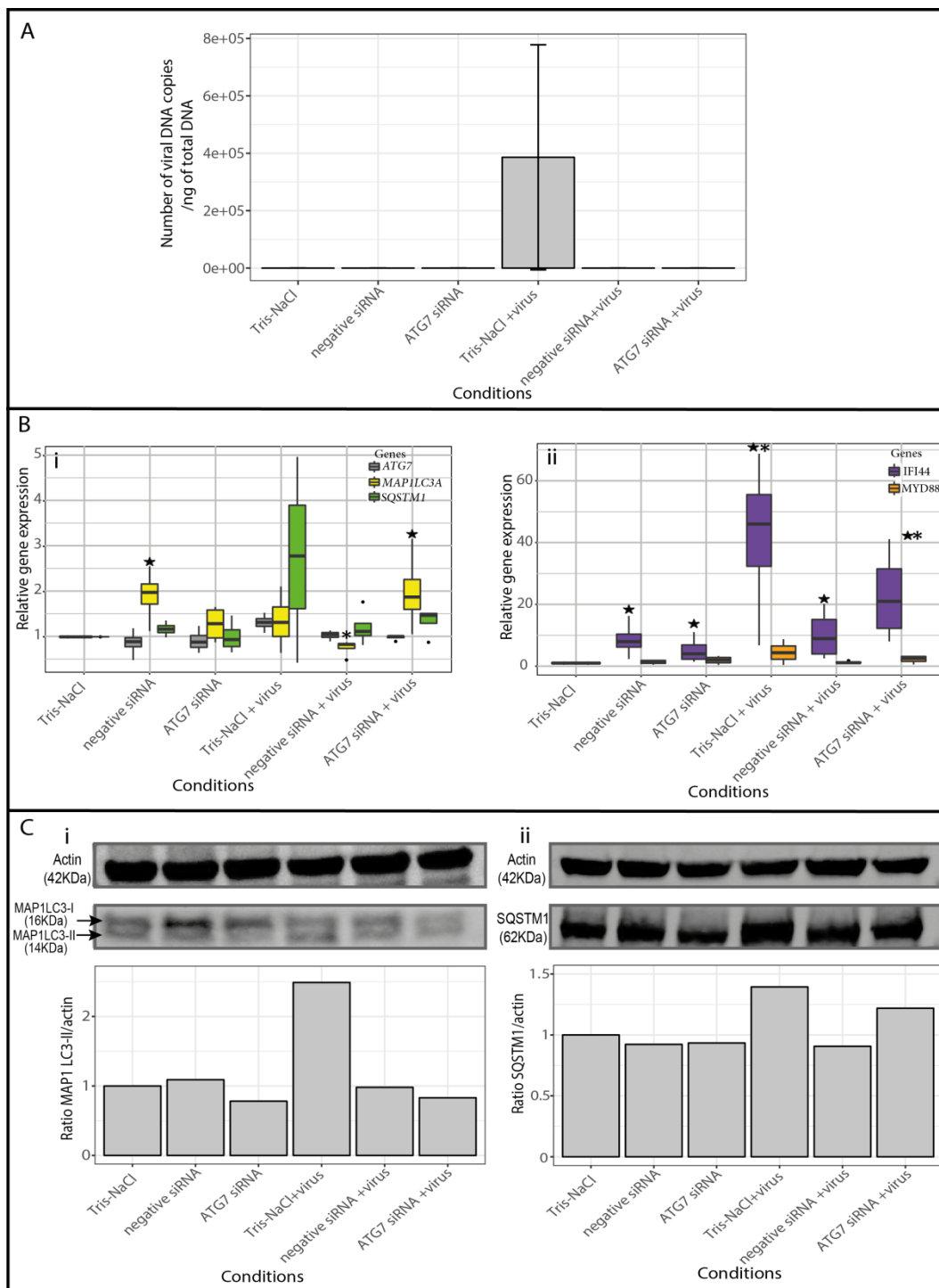




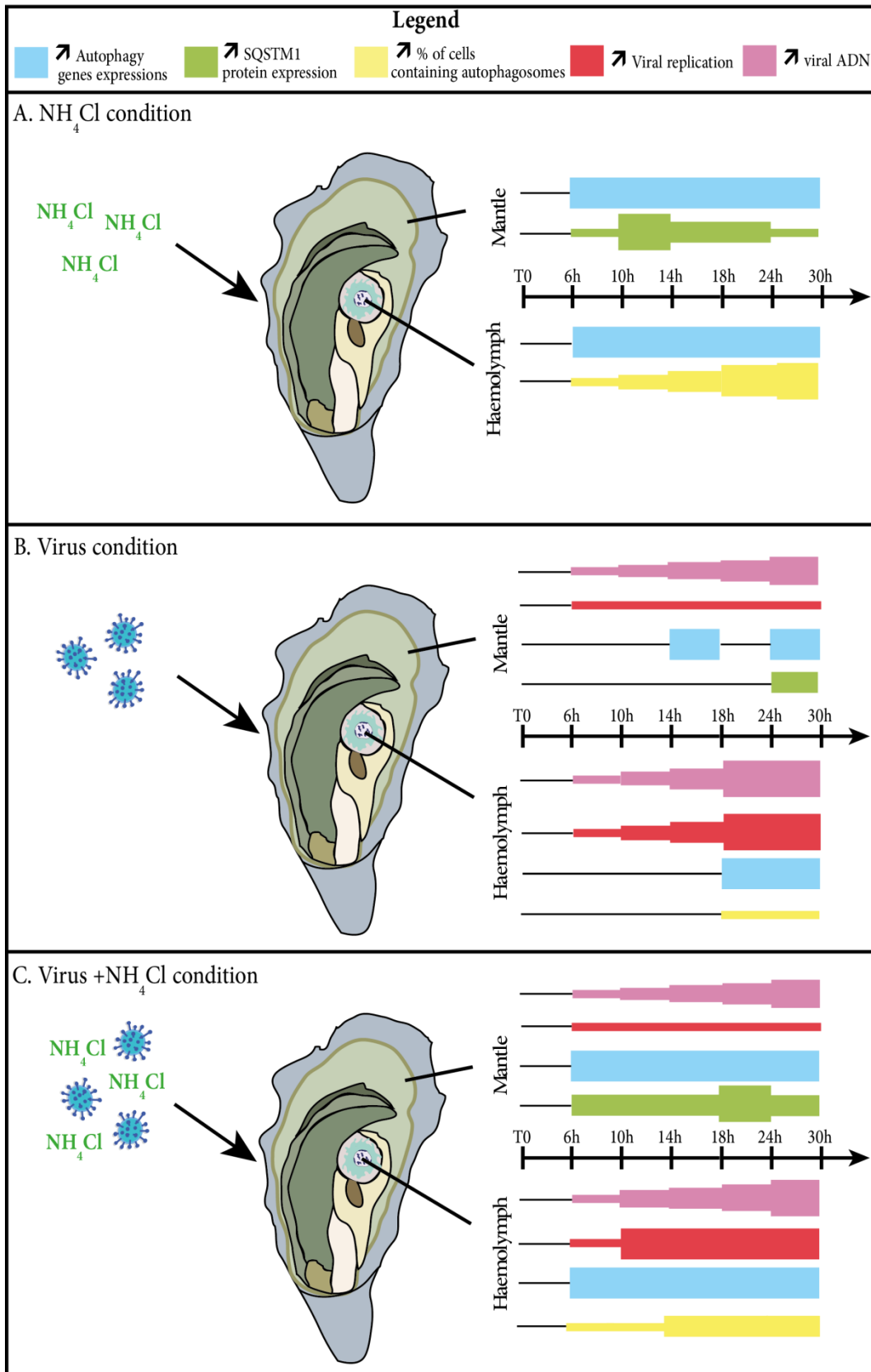
**Figure 4.** Modulation of autophagy in Pacific oyster exposed to NH<sub>4</sub>Cl. **A.** Monitoring of autophagy in haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry. Scatterplot of the difference of the percentage of haemocytes presented autophagosomes between the seawater condition (ASW) and the NH<sub>4</sub>Cl condition from 6 to 30 hpi (n=2 pools of 15 animals). The line represents the trend curve of the difference of percentage of cells between the two conditions. \* Significant increase of the difference of the percentage of cells presented autophagosomes between the NH<sub>4</sub>Cl and ASW condition between 18 to 30hpi (p ≤ 0.05). **B.** Relative gene expression of key autophagy genes in haemolymph and the mantle of the Pacific oysters, *C. gigas*, in ASW condition (blue) and NH<sub>4</sub>Cl condition (green) at each sampling time point (T0, 6, 10, 14, 18, 24 and 30 hpi) detected by real time PCR (haemolymph: n=2 pools of 15 animals; mantle: n=3 animals). The line represents the trend curve of the expression of each gene in the NH<sub>4</sub>Cl condition (green) and the ASW condition (blue). \* Significant difference between the NH<sub>4</sub>Cl and ASW conditions at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection (p ≤ 0.05). ★ Significant difference between the NH<sub>4</sub>Cl and ASW conditions of the same time point (p ≤ 0.05). RGE= relative gene expression. **C.** Detection of the autophagy protein SQSTM1 in the mantle of *C. gigas* during the kinetic of exposition to NH<sub>4</sub>Cl at each sampling time point (for each time point n=1 pool of 3 animals). ⊕ Significant differences between the NH<sub>4</sub>Cl and ASW condition at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection (p ≤ 0.05).



**Figure 5.** Modulation of autophagy in Pacific oyster exposed to virus+NH<sub>4</sub>Cl. **A.** Monitoring of autophagy in haemocytes of *C. gigas* by flow cytometry. Scatterplot of the difference of the percentage of haemocytes with autophagosomes between the seawater condition (ASW) and the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition from 6 to 30 hpi (n=2 pools of 15 animals). The line represents the trend curve of the difference of percentage of cells between the two conditions. \* Significant increase of the difference of the percentage of cells presented autophagosomes between the virus+NH<sub>4</sub>Cl and ASW condition between 18 to 30hpi (p ≤ 0.05). **B.** Relative gene expression of key autophagy genes in haemolymph and the mantle of the Pacific oysters, *C. gigas*, in seawater condition (blue) and the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition (purple) at each sampling time point (T0, 6, 10, 14, 18, 24 and 30 hpi) detected by real time PCR (haemolymph: n=2 pools of 15 animals; mantle: n=3 animals). RGE= relative gene expression. The line represents the trend curve of the expression of each gene in the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition (purple) and the ASW condition (blue). \* Significant difference between the virus+NH<sub>4</sub>Cl and ASW conditions at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection (p≤0.05). ★ Significant difference between the virus+NH<sub>4</sub>Cl and ASW conditions of the same time point (p ≤ 0.05). **C.** Detection of the autophagy protein SQSTM1 in the mantle of *C. gigas* during the kinetic of infection by OsHV-1 in the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition at each sampling time point (for each time point n=1 pool of 3 animals). ⚡ Significant differences between the virus+NH<sub>4</sub>Cl and ASW condition at early (6-14 hpi) or late time points (18-30 hpi) of the experimental infection (p ≤ 0.05).



**Figure 6.** Viral DNA detection, expression of autophagy and immunity genes and protein detection and expression in the mantle of *C. gigas* in the RNAi experimental infection. **A.** Viral DNA amounts detected by real time PCR in Pacific oysters of the different conditions tested 44 hpi by OsHV-1 (Tris-NaCl+virus, negative siRNA+virus, *ATG7* siRNA+virus, negative siRNA, *ATG7* siRNA or Tris-NaCl) (n=4 for each condition). **B.** Relative expression of (i) autophagy genes (*ATG7*, *MAP1LC3A*, *SQSTM1*) and (ii) other immune genes (*IFI44* and *MYD88*) in the six conditions estimated by real time PCR 44 hpi. Mantle of the Tris-NaCl condition were used as calibrator. ★ Significant differences with the relative gene expression in the Tris-NaCl condition ( $p \leq 0.05$ ). \* Significant difference with the respective relative gene expression in the condition without virus ( $p \leq 0.05$ ) (n=4 animals). **C.** Detection and quantification of the autophagy proteins (i) MAP1LC3-I and -II and (ii) SQSTM1 in the different tested conditions. In each condition n= 1 pool of 4 Pacific oysters.



**Figure 7.** Modulation of autophagy in the mantle and haemolymph of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during the process of an infection by the virus OsHV-1. A. in the NH<sub>4</sub>Cl condition; B. in the virus condition; C. in the virus+NH<sub>4</sub>Cl condition. The thickness of each color square represents an increase of the parameter considered.

## Table

**Table 1.** List of primer for viral and *C. gigas* immune genes expressions.

Categories	Gene name/ ORFs	Forward	Reverse	Efficiency (%)	Protein
<b>Autophagy genes</b>	<i>BECN1</i>	AAATGCTGCTTGGGGTCAGA	CGGAATCCACCAGACCCATA	102.2	PI3KC3 complex
	<i>ULK2</i>	CTGACTTTGGCTTTGCTCGT	TTTGAGCTGTTGAGGGGTCT	103.9	Atg1/ULK1 complex
	<i>MAP1LC3A</i>	CCGATGCTTGACAAGACCAA	CCGTCCTCGTCTTTCTCCTG	98.2	LC3 conjugation system
	<i>P62/SQSTM1</i>	AGGGAATGAGAAGGCCGAAA	CCTCAAGCAACTCCTCTCCA	96.5	Delivers ubiquitinated cargoes for autophagic degradation
	<i>ATG7</i>	CGCCCCTTGTAACAAAATG	ATTCTGCAAGGCATTCCAAC	104.8	LC3 and ATG12 conjugation systems
<b>Immunity genes</b>	MYD88	CGTGCCATGGACGGATAACAACG	GGCCCAGCAGTACCTCTGTGGAATC	97.5	universal adapter for the TLR/IL-1R family
	IF144	TGGTGGACTATGGACCGGACAGTG	GGTAGACAGTGGTGAGGCTGTGCT	93.8	Interferon stimulated gene
<b>OsHV-1 genes</b>	ORF80	AAGAGGATTGGGTGCACAG	TTGCATCCCAGGATTATCAG	98.5	Membrane protein
	ORF87	CACAGACGACATTTCGCCAAA	AAAGCTCGTTCACATTGGT	98.7	Inhibitor of apoptosis protein
	ORF99	GGTGGAGGTGGCTGTTGAAA	CCGACTGACAACCCATGGAC	96.3	Inhibitor of apoptosis protein

## 2. Conclusion

Les travaux entrepris dans le cadre de ce troisième chapitre visaient à décrypter le rôle joué par l'autophagie au cours du processus d'une infection par le virus OsHV-1 de manière intégrative. En condition *in vivo*, nous avons suivi la modulation de l'autophagie et la réplication du virus au cours d'une infection virale dans le manteau et l'hémolymphe de *C. gigas*. Puis, nous avons cherché à déterminer si l'autophagie jouait un rôle antiviral ou si ce mécanisme était manipulé par le virus OsHV-1.

D'après les résultats obtenus, la réplication du virus commence précocement au cours de l'infection et est suivie d'une modulation de l'autophagie dans les deux tissus. En effet, la réplication du virus est détectable dès 6 hpi tandis que l'expression des gènes de l'autophagie et le flux autophagique sont modulés respectivement à partir de 14-18 et 18 hpi. Les résultats mettent en évidence une modulation différente de l'autophagie dans le manteau et l'hémolymphe. Au niveau transcriptionnel, certains gènes de l'autophagie sont sur exprimés deux fois dans le manteau et une fois dans l'hémolymphe au cours de l'expérimentation. Les fonctions physiologiques différentes de ces deux compartiments, pourraient être à l'origine d'une régulation différentielle de l'autophagie dans le manteau et l'hémolymphe en réponse à l'infection virale. Dans les deux tissus, le virus pourrait également adopter une stratégie différente de réplication entraînant une modulation différente du processus autophagique. Cette hypothèse est supportée par le fait que le manteau est un organe ciblé par le virus, alors que l'hémolymphe et les hémocytes permettraient la dissémination du virus aux différents organes cibles (Schikorski *et al.* 2011; Segarra *et al.* 2016; Morga *et al.* 2017).

En parallèle, une inhibition de l'autophagie est observée de manière précoce au cours de l'expérimentation au sein du manteau et de l'hémolymphe des huîtres exposées à du NH<sub>4</sub>Cl. Une modulation des gènes de l'autophagie est observée dès 6 h post-exposition (hpe). Puis une inhibition du flux autophagique est observée dès 6 hpe dans le manteau et 18 hpe dans l'hémolymphe.

En exposant *C. gigas* au virus et au NH<sub>4</sub>Cl, une modulation plus précoce et plus forte de l'autophagie est observée au cours de l'infection expérimentale. Celle-ci serait partiellement due à une inhibition de l'autophagie par le NH<sub>4</sub>Cl et également à une interaction avec le processus d'infection viral. L'expression des gènes de l'autophagie est modulée dès 6 hpi dans les deux tissus. De plus, suivant le tissu considéré, le flux autophagique est plus

fortement et/ou précocement modulé par rapport à la condition virus seul. Cependant, la réplication du virus dans le manteau et l'hémolymphe n'est pas impactée par cette modulation précoce de l'autophagie. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces résultats. L'usage d'une famille présentant une sensibilité intermédiaire à l'infection virale pourrait être à l'origine d'une importante variabilité de la sensibilité individuelle des animaux à OsHV-1. Cela pourrait masquer l'effet de la modulation précoce de l'autophagie sur la réplication du virus. Il est également possible qu'une inhibition de la dégradation des autophagosomes par les lysosomes n'est pas d'effet sur le développement du virus. Le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ne permet peut être pas de déterminer le rôle joué par l'autophagie en réponse à une infection virale. Cette molécule inhibe la dégradation des autophagosomes mais n'empêche pas leur formation et la séquestration de composés cytoplasmiques au sein des structures autophagiques formées. Une inhibition plus précoce de l'autophagie au niveau de l'étape d'initiation permettrait d'empêcher la formation des autophagosomes et pourrait peut être induire une modification de la réplication du virus.

Enfin, les résultats obtenus par l'approche par ARN interférence, n'ont également pas permis de déterminer si l'autophagie jouait un rôle antiviral ou si ce processus était modulé par le virus pour son propre bénéfice. En présence de siRNA *ATG7*, une diminution du niveau de la protéine MAP1LC3-II est observée. Ces résultats suggèrent que le « knock down » du gène *ATG7* a été partiellement efficace. Cependant la quantité de siRNA utilisée ne semble pas suffisante pour bloquer totalement la voie. L'utilisation d'une quantité plus forte de siRNA peut-être envisagée. Malheureusement, l'exposition de *C. gigas* à des siRNA induit également une réponse antivirale non spécifique mais protectrice contre le virus OsHV-1. En présence de siRNA négatif ou *ATG7*, une sur expression du gène *IFI44*, un gène impliqué dans la réponse antivirale de l'hôte creuse a été observée. De plus dans ces deux conditions, l'ADN viral n'est pas détecté alors que l'inverse est observé dans la condition contrôle.

L'ensemble de ces résultats démontrent la complexité des interactions existantes entre les différents mécanismes antiviraux mis en place par l'hôte creuse pour répondre à une infection virale. Des analyses complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir déterminer si l'autophagie est modulée par l'hôte creuse ou si ce processus est modulé par le virus pour son propre bénéfice.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---





L'huître creuse, *Crassostrea gigas* est l'espèce ostréicole majoritairement cultivée au niveau mondial. En France, cette espèce a été introduite à la fin des années 1960 afin d'assurer la pérennité de l'activité ostréicole affectée par le déclin de la production de l'huître portugaise. En effet, cette espèce a été impactée par deux épisodes de mortalités associés à la détection de virus de type iridovirus à la fin des années 60 et au début des années 70. Cependant, depuis le début des années 1990, *C. gigas* est également confrontée à des mortalités massives parmi lesquelles des mortalités estivales affectant le naissain causées par le virus OsHV-1.

Aujourd'hui, peu de moyens de lutte sont disponibles pour contrer une infection par le virus OsHV-1. Une meilleure connaissance des interactions hôte/organisme pathogène permet de comprendre les mécanismes de résistance de l'huître creuse au cours d'une infection par OsHV-1. Cependant, les moyens d'études restent limités notamment par l'absence de lignée cellulaire de mollusques bivalves et la complexité du fonctionnement biologique de cette espèce. La récente caractérisation du génome de *C. gigas* ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de défense. Plusieurs voies antivirales ont été caractérisées (Green et Montagnani 2013; Segarra *et al.* 2014c; Green *et al.* 2015a; Moreau *et al.* 2015; Martenot *et al.* 2017) parmi lesquelles l'autophagie, un mécanisme du système immunitaire inné, hautement conservé chez les organismes eucaryotes. L'autophagie est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'homéostasie, la mort cellulaire, le développement embryonnaire et la défense immunitaire. Chez *C. gigas*, des gènes de la voie de l'autophagie ont été identifiés et des premiers résultats ont suggéré l'implication de ce mécanisme dans la réponse de l'huître à une infection par le virus OsHV-1 (Moreau *et al.* 2015).

Dans ce contexte, une meilleure caractérisation du mécanisme de l'autophagie chez *C. gigas* et de son implication au cours d'une infection par le virus OsHV-1 semblait nécessaire. Ainsi les travaux de thèse réalisés ici visaient à répondre à deux objectifs : (1) caractériser l'autophagie chez l'huître creuse par la combinaison d'approches cellulaires, moléculaires et protéiques ; (2) étudier le rôle joué par l'autophagie chez *C. gigas* au cours de l'infection virale en condition *in vivo* en utilisant un modulateur connu de l'autophagie et une approche par ARN interférence.

L'autophagie a premièrement été étudiée au niveau des hémocytes lors d'une exposition des huîtres au NH<sub>4</sub>Cl et à la carbamazépine, deux modulateurs connus de l'autophagie. La modulation de ce processus a été étudiée au niveau cellulaire par plusieurs approches dont

la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique à transmission (MET). Cette étude nous a permis de détecter et caractériser au niveau ultrastructural des vacuoles autophagiques au sein des hémocytes de l'huître creuse. Une augmentation du pourcentage de cellules présentant des autophagosomes et une augmentation du nombre d'autophagosomes au sein des hémocytes est observée en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ +carbamazépine, 24 h post-exposition aux molécules. Les résultats démontrent (1) une inhibition de l'autophagie dans les hémocytes par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; (2) une activité autophagique importante au sein des hémocytes les plus complexes et de grande taille. Ce travail suggère que l'autophagie peut être modulée dans les hémocytes de *C. gigas*.

Dans un second temps, la voie de l'autophagie a été caractérisée au niveau moléculaire. Les résultats ont permis d'identifier dans les bases de données publiques des protéines du cœur moléculaire de la voie de l'autophagie dans le génome de *C. gigas*. Ainsi, la voie de l'autophagie apparaît structurellement et constitutionnellement conservée chez *C. gigas* comme chez d'autres organismes eucaryotes. De plus, l'autophagie serait détectable de manière constitutive dans l'ensemble des compartiments tissulaires de l'huître creuse. En effet, les gènes *mTOR*, *SQSTM1*, *MAP1LC3* et *BECN1* sont exprimés au niveau transcriptomique et protéique dans le manteau, la gonade, le muscle, la glande digestive, les branchies, les hémocytes, le cœur et les palpes labiaux. L'ensemble de ces résultats démontrent une conservation de l'autophagie chez *C. gigas* au niveau moléculaire.

En complément des précédents résultats, une étude de l'autophagie a été réalisée chez l'huître américaine *C. virginica*, une autre espèce d'huître creuse, phylogénétiquement proche de *C. gigas*. Ce sujet a fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Colleen Burge de l'Institut of Marine and Environmental Technology (IMET) à Baltimore (USA). A l'aide des séquences protéiques des ATG (autophagy related genes) de *C. gigas* et de la base de données NCBI, les protéines constituant la voie de l'autophagie chez *C. virginica* ont été recherchées. De fortes similarités ont été observées entre les protéines ATG de *C. gigas* et de *C. virginica*. De plus, la modulation de l'autophagie au sein du manteau et des hémocytes de *C. virginica* a été étudiée dans le cadre d'une exposition à des modulateurs connus de l'autophagie. Il a été observé une augmentation du pourcentage d'hémocytes présentant des autophagosomes à 24 h post-exposition avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Au niveau du manteau, une approche par western blot a permis d'observer une augmentation de la quantité de la protéine MAP1LC3-II en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et de carbamazépine. Ces résultats démontrent une modulation de l'autophagie dans

les hémocytes et le manteau de *C. virginica* similaire à celle de *C. gigas*. Ainsi l'autophagie existe et peut être modulée chez *C. virginica* comme chez *C. gigas*.

Cette première partie montre l'importance de combiner plusieurs approches cellulaire, moléculaire et protéique, pour étudier la modulation de l'autophagie et confirme la conservation de ce processus chez deux espèces d'huître creuse.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, le rôle joué par l'autophagie a été exploré au cours d'une infection virale. Une première approche expérimentale *in vivo* visait à comparer la réponse autophagique lors d'une infection à OsHV-1 avec ou sans exposition au NH<sub>4</sub>Cl. Dans la condition infection à OsHV-1 seule, une réplication du virus est observée précocement, associée à une modulation de l'expression des gènes de la voie de l'autophagie dès 14-18 h post exposition au virus OsHV-1. Cette modulation transcriptionnelle est différente dans l'hémolymphe et le manteau alors qu'après 14 h, la modulation du flux autophagique est régulée de façon similaire dans les deux « compartiments ». En présence de NH<sub>4</sub>Cl et de virus, la modulation de l'autophagie est observée plus précocement dans l'hémolymphe et le manteau par rapport à la condition « infection à OsHV-1 » seule. Cependant la réplication du virus ne semble pas impactée par la modulation anticipée du processus autophagique. Ainsi, cette expérimentation *in vivo* n'a pas permis de déterminer si l'autophagie est modulée par l'huître creuse afin de se défendre contre l'infection virale, ou si cette voie est manipulée par le virus afin de l'utiliser pour son propre bénéfice. Afin de répondre à ces questions, il a été entrepris une approche de génomique fonctionnelle par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA), ciblant le gène *ATG7*. Le « knock down » du gène *ATG7* a fonctionné induisant une diminution de la protéine MAP1LC3-II. Cependant, quelle que soit la nature des siRNA (siRNA négatif et siRNA *ATG7*) une augmentation de l'expression d'IFI44 impliqué dans la réponse antivirale a été observée associée à l'absence de détection du virus OsHV-1. Ainsi, l'exposition des huîtres aux siRNA semble induire de façon non spécifique une protection de l'huître creuse contre l'infection par le virus OsHV-1 similaire à celle observée dans le cas de l'utilisation de long ARN double brins (ARNdb) (Pauletto *et al.* 2017) et de poly:(IC) (Green et Montagnani 2013). Il n'a donc pas été possible de déterminer si l'autophagie est régulée par l'huître creuse ou par le virus OsHV-1.

En conclusion, ces travaux de thèse ont contribué à mieux caractériser l'autophagie chez l'huître creuse au niveau moléculaire et cellulaire. De plus, les connaissances concernant les interactions entre l'huître creuse et le virus OsHV-1 ont été améliorées en étudiant la régulation de l'autophagie au cours d'une infection virale. Les résultats ont montré une activation de l'autophagie consécutive à l'infection par le virus. Dans l'hémolymphe, la réponse de l'autophagie diffère de celle obtenue dans le manteau. Les fonctions physiologiques différentes de ces deux compartiments, pourraient être à l'origine d'une régulation différentielle de l'autophagie. Dans les deux tissus, le virus pourrait également adopter une stratégie différente de réplication entraînant une modulation différente du processus autophagique. En revanche, ces travaux n'ont pas permis de démontrer si l'activation de l'autophagie est régulée par l'huître creuse ou par le virus OsHV-1. L'approche par ARN interférent réalisée n'a malheureusement pas permis de répondre à cette question. En effet, le « knock down » d'*ATG7* fonctionne mais l'utilisation de siRNA semble induire de façon non spécifique une réponse antivirale ne nous permettant pas de conclure concernant cette interrogation.

Les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives pour compléter la caractérisation du rôle de l'autophagie au cours d'une infection virale.

Deux approches pourraient être envisagées afin de clarifier « qui » induit l'activation de l'autophagie : l'hôte ou le virus ? Une première approche viserait à utiliser différentes molécules connues pour moduler la voie à d'autres étapes du processus de l'autophagie.

Nous avons choisi d'inhiber la dégradation des autophagosomes (phase finale du processus) par l'utilisation du  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , mais des molécules inhibant des phases plus précoces de la formation des autophagosomes comme la Wortmannin ou 3-méthyladénine pourraient être testées. Ces deux molécules inhibent en effet la fonction de PIK3C3 (Class III phosphatidylinositol-3-kinase) située au niveau du complexe PtdIn3K. Ces molécules empêchent la nucléation des membranes et la formation de vésicules à double membrane. En parallèle, une approche inverse, utilisant des molécules activatrices de la voie pourrait être réalisée. L'utilisation de la rapamycine, agissant directement sur mTOR pourrait être envisagée afin d'induire la production d'autophagosomes. En ce fixant sur le complexe mTORC1, la rapamycine empêche mTOR de se fixer sur le complexe Atg1/ULK. Cela provoque une inactivation de celui-ci et donc induit la production d'autophagosomes.

Outre l'utilisation de molécules modulatrices de l'autophagie, une approche de génétique inverse par CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRIPR-associated protein 9) pourrait être réalisée. Cette approche a récemment été utilisée avec succès chez plusieurs organismes invertébrés terrestres et marins comme le ver, *Caenorhabditis. elegans* (Dickinson *et al.* 2013), la drosophile, *Drosophila melanogaster* (Bassett *et al.* 2013), l'ascidie jaune, *Ciona intestinalis* (Stolfi *et al.* 2014) et la crépidule, *C. fornicata* (Perry et Henry 2015). De plus, depuis peu de temps elle est également utilisée pour muter des gènes clés de la voie de l'autophagie comme *ATG5* (Kim *et al.* 2016), *ATG7* (Cui *et al.* 2017), *ATG16* (Ohshima *et al.* 2014) ou *ULK1* (Horne *et al.* 2016).

De telles approches permettraient non seulement de déterminer l'origine de la régulation de l'autophagie chez l'huître creuse mais d'évaluer l'importance de ce mécanisme dans la survie ou non de l'animal à l'infection virale. Afin d'aller encore plus loin dans le rôle de ce mécanisme, il serait intéressant d'explorer son rôle dans la résistance/tolérance à la maladie en utilisant des familles présentant des profils plus contrastés de sensibilité et tolérance à la maladie causée par OsHV-1.

Enfin il serait intéressant d'explorer l'effet du jeûne connu pour être un stimulant efficace de l'autophagie (Scott *et al.* 2004) sur la sensibilité à l'infection virale par OsHV-1.

L'huître creuse étant une espèce sessile soumise à de nombreux stress environnementaux et physiologiques, elle est exposée à une fluctuation de la concentration en phytoplancton au cours des saisons. Les mortalités massives dues à OsHV-1 sont souvent observées au cours du printemps et de l'été lorsque les concentrations en phytoplancton sont les plus élevées. Dans le cas où le jeûne induit une stimulation de l'autophagie chez l'huître creuse, nous pouvons supposer qu'en période estivale, l'autophagie ne serait pas hautement stimulée dans les animaux, modulant ainsi leur tolérance à une infection virale. Une étude préliminaire réalisée en condition expérimentale suggère un effet protecteur du jeûne en réponse à une infection par le virus OsHV-1 chez l'huître creuse (Moreau *et al.* 2015). Cependant cette étude n'a fait l'objet que d'un suivi de mortalité et des analyses complémentaires sont nécessaires afin d'étudier la modulation de l'autophagie de manière intégrative au cours d'un jeûne et d'une infection virale.



## REFERENCES BILIOGRAPHIQUES

- AcclimaTerra, and Le Treut (dir), H. (2018). Anticiper les changements climatiques en Nouvelle-Aquitaine. Pour agir dans les territoires. Éditions Région Nouvelle-Aquitaine.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology* **3**, 745–756. doi:10.1038/nri1184
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* **13**, 111–118. doi:10.1016/j.tim.2005.01.007
- Albertin, C. B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z. Y., Pungor, J. R., Edsinger-Gonzales, E., Brenner, S., Ragsdale, C. W., and Rokhsar, D. S. (2015). The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* **524**, 220–224. doi:10.1038/nature14668
- Allam, B., and Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**, 121–136. doi:10.1016/j.jip.2015.05.005
- Arumugan, M., Romestand, B., and Torreilles, J. (2000). Nitrite released in haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquatic Living Resources* **13**, 173–177. doi:10.1016/S0990-7440(00)00150-9
- Arzul, I., Corbeil, S., Morga, B., and Renault, T. (2017). Viruses infecting marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology* **147**, 118–135. doi:10.1016/j.jip.2017.01.009
- Arzul, I., Nicolas, J.-L., Davison, A. J., and Renault, T. (2001a). French Scallops: A New Host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* **290**, 342–349. doi:10.1006/viro.2001.1186
- Arzul, I., Renault, T., and Lipart, C. (2001b). Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* **46**, 1–6. doi:10.3354/dao046001
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., and Davison, A. J. (2001c). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* **82**, 865–870.
- Arzul, I., Renault, T., Thébault, A., and Gérard, A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* **84**, 151–160. doi:10.1016/S0168-1702(02)00007-2
- Ashford, T. P., and Porter, K. R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *The Journal of Cell Biology* **12**, 198–202.



- Auffret, M. (1985). Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques mollusques bivalves d'intérêt commercial. Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale France.
- Baba, M., Osumi, M., and Ohsumi, Y. (1995). Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Structure and Function* **20**, 465–471.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., and Ohsumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *The Journal of Cell Biology* **124**, 903–913.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., and Grizel, H. (1990). Evidence of neutralizing activity against T3 coliphage in oyster *Crassostrea gigas* hemolymph. *Developmental and Comparative Immunology* **14**, 261–268.
- Backeljau, T. (2018). *Crassostrea gigas* or *Magallana gigas*: A Community-based Scientific Response. *National Shellfisheries Association Quarterly Newsletter* **1**, 3.
- Bai, C.-M., Morga, B., Shi, J., Li, C., Xin, L.-S., and Wang, C.-M. (2018). Long-range PCR and high-throughput sequencing of Ostreid herpesvirus 1 indicate high genetic diversity and complex evolution process. *Frontiers in Microbiology*.
- Bai, R., You, W., Chen, J., Huang, H., and Ke, C. (2012). Molecular cloning and expression analysis of GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) from small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Fish & Shellfish Immunology* **33**, 675–682. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.003
- Balbi, T., Cortese, K., Ciacci, C., Bellese, G., Vezzulli, L., Pruzzo, C., and Canesi, L. (2018). Autophagic processes in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes: Effects of *Vibrio tapetis*. *Fish & Shellfish Immunology* **73**, 66–74. doi:10.1016/j.fsi.2017.12.003
- Barbosa Solomieu, V., Renault, T., and 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. doi:10.1016/j.jip.2015.07.011
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., and Liu, J.-L. (2013). Highly Efficient Targeted Mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Reports* **4**, 220–228. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.020
- Bayne, B. L., Ahrens, M., Allen, S. K., D'Auriac, M. A., Backeljau, T., Beninger, P., et al. (2017). The Proposed Dropping of the Genus *Crassostrea* for All Pacific Cupped Oysters and Its Replacement by a New Genus *Magallana*: A Dissenting View. *Journal Of Shellfish Research* **36**, 545–547. doi:10.2983/035.036.0301
- Birkbeck, T. H., and McHenery, J. G. (1982). Degradation of bacteria by *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **72**, 7–15. doi:10.1007/BF00393942
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology* **15**, 713–720. doi:10.1038/ncb2788

- Buckingham, E. M., Carpenter, J. E., Jackson, W., and Grose, C. (2014). Autophagy and the effects of its inhibition on varicella-zoster virus glycoprotein biosynthesis and infectivity. *Journal of Virology* **88**, 890–902. doi:10.1128/JVI.02646-13
- Buckingham, E. M., Jarosinski, K. W., Jackson, W., Carpenter, J. E., and Grose, C. (2016). Exocytosis of Varicella-Zoster Virus Virions Involves a Convergence of Endosomal and Autophagy Pathways. *Journal of Virology* **90**, 8673–8685. doi:10.1128/JVI.00915-16
- Burge, C. A., Griffin, F. J., and Friedman, C. S. (2006). Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**, 31–43. doi:10.3354/dao072031
- Burioli, E. a. V., Prearo, M., and Houssin, M. (2017). Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1  $\mu$ Var isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology* **509**, 239–251. doi:10.1016/j.virol.2017.06.027
- Buroker, N. E. (1983). Sexuality with respect to shell length and group size in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *ResearchGate* **23**, 271–279.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., and Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* **57**, 469–476. doi:10.1002/jemt.10100
- Carella, F., Feist, S. W., Bignell, J. P., and De Vico, G. (2015). Comparative pathology in bivalves: Aetiological agents and disease processes. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**, 107–120. doi:10.1016/j.jip.2015.07.012
- Carré-Mlouka, A., Gaumer, S., Gay, P., Petitjean, A. M., Coulondre, C., Dru, P., Bras, F., Dezélee, S., and Contamine, D. (2007). Control of Sigma Virus Multiplication by the ref(2)P Gene of *Drosophila melanogaster*: An *in Vivo* Study of the PB1 Domain of Ref(2)P. *Genetics* **176**, 409–419. doi:10.1534/genetics.106.063826
- Chen, D., Yu, M., Chen, H., Zeng, M., Sun, Y., and Huang, Q. (2018). Identification and functional characterization of NEMO in *Crassostrea gigas* reveals its crucial role in the NF- $\kappa$ B activation. *Fish & Shellfish Immunology* **80**, 46–55. doi:10.1016/j.fsi.2018.05.054
- Chen, R., Shen, K., Chen, Z., Fan, W., Xie, X., Meng, C., Chang, X., Zheng, L., Jeswin, J., Li, C., Wang, K., and Liu, H. (2016a). White spot syndrome virus entry is dependent on multiple endocytic routes and strongly facilitated by Cq-GABARAP in a CME-dependent manner. *Scientific Reports* **6**, 28694. doi:10.1038/srep28694
- Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., Kuo, Y.-H., Lin, Y.-C., Chang, Y.-H., Gong, H.-Y., and Huang, C.-L. (2016b). Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* **55**, 144–151. doi:10.1016/j.dci.2015.10.023

- Cheng, T. C. (2000). Cellular defense mechanisms in oysters. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology*. *Sciences Publishers, Inc., Enfield (NH), USA; Plymouth, UK*, 43–83.
- Cheng, T. C. (1983). The Role of Lysosomes in Molluscan Inflammation. *American Zoologist* **23**, 129–144. doi:10.1093/icb/23.1.129
- Cherr, G. N., and Friedman, C. S. (1998). Investigation of a mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Tomales Bay, California. *California Sea Grant Report of Completed Projects 1994-1997 No. R-044 California Sea Grant College System, La Jolla, CA*, 167–172.
- Chiramel, A., and Best, S. M. (2017). Role of Autophagy in Zika Virus Infection and Pathogenesis. *Virus Research* **254**. doi:10.1016/j.virusres.2017.09.006
- Chu, F.-L. (2000). Defense Mechanisms of Marine Bivalves, *Recent Advances in Marine Biotechnology*. *Immunobiology and Pathology*, 1–42.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.-P., Pepin, J.-F., Benabdelmouna, A., Soletchnik, P., Lupo, C., et al. (2011). Les surmortalités des naissains d’huîtres creuses, *Crassostrea gigas* : acquis des recherches en 2010.
- comité national de la conchyliculture (2014). Le secteur en Chiffres. Available at: [http://www.cnc-france.com/iso\\_album/fiche\\_cnc\\_2014\\_-\\_le\\_secteur\\_en\\_chiffres\\_\(3\).pdf](http://www.cnc-france.com/iso_album/fiche_cnc_2014_-_le_secteur_en_chiffres_(3).pdf) [accessed 25 October 2016]
- Comps, M. (1988). Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society Special Publication* **18**, 23–37.
- Comps, M., and Cochennec, N. (1993). A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology* **62**, 201–203.
- Corporeau, C., Tamayo, D., Pernet, F., Quéré, C., and Madec, S. (2014). Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1  $\mu$ Var infection. *Journal of Proteomics* **109**, 176–187. doi:10.1016/j.jprot.2014.06.030
- Cui, J., Chew, S. J. L., Shi, Y., Gong, Z., and Shen, H.-M. (2017). CRISPR system for genome engineering: the application for autophagy study. *BMC Reports* **50**, 247–256. doi:10.5483/BMBRep.2017.50.5.044
- Daussy, C. F., and Espert, L. (2016). L’autophagie sélective au cours des infections virales. *Virologie* **20**, 196–206. doi:10.1684/vir.2016.0665
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A. C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., and Thiry, E. (2009). The order Herpesvirales. *Archives of Virology* **154**, 171–177. doi:10.1007/s00705-008-0278-4
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R.-M., and Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *The Journal of General Virology* **86**, 41–53. doi:10.1099/vir.0.80382-0

- De Vico, G., and Carella, F. (2012). Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science* **93**, 1109–1115. doi:10.1016/j.rvsc.2012.03.014
- Dégremont, L. (2011). Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* **317**, 94–98. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.04.029
- Dégremont, L. (2013). Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **416**, 129–134. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.09.011
- Dégremont, L., Morga, B., Trancart, S., and Pépin, J.-F. (2016). Resistance to OsHV-1 Infection in *Crassostrea gigas* Larvae. *Frontiers in Marine Science* **3**. doi:10.3389/fmars.2016.00015
- Dégremont, L., Nourry, M., and Maurouard, E. (2015). Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture* **446**, 111–121. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.029
- Delisle, L., Petton, B., Burguin, J. F., Morga, B., Corporeau, C., and Pernet, F. (2018). Temperature modulate disease susceptibility of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and virulence of the Ostreid herpesvirus type 1. *Fish & Shellfish Immunology* **80**, 71–79. doi:10.1016/j.fsi.2018.05.056
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology* **18**, 375–382. doi:10.1016/j.coi.2006.05.019
- Deretic, V. (2011). Autophagy in Immunity and Cell-Autonomous Defense Against Intracellular Microbes. *Immunological reviews* **240**, 92–104. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00995.x
- Dickinson, D. J., Ward, J. D., Reiner, D. J., and Goldstein, B. (2013). Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nature Methods* **10**, 1028–1034. doi:10.1038/nmeth.2641
- Ding, S.-W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews. Immunology* **10**, 632–644. doi:10.1038/nri2824
- Dollfus, R. P. (1921). Notes et mémoires n°7, Résumé de nos principales connaissances pratiques sur les Maladies et les Ennemis de l’Huître. *Office scientifique et technique des pêches maritimes*, 51.
- Doorn, W. G. van, and Papini, A. (2013). Ultrastructure of autophagy in plant cells. *Autophagy* **9**, 1922–1936. doi:10.4161/auto.26275
- Dove, A. D. M., Bowser, P. R., and Cerrato, R. M. (2004). Histological Analysis of an Outbreak of QPX Disease in Wild Hard Clams *Mercenaria mercenaria* in New York. *Journal of Aquatic Animal Health* **16**, 246–250. doi:10.1577/H03-052.1

- Du, X., Fan, G., Jiao, Y., Zhang, H., Guo, X., Huang, R., et al. (2017). The pearl oyster *Pinctada fucata martensii* genome and multi-omic analyses provide insights into biomineralization. *GigaScience* **6**, 1–12. doi:10.1093/gigascience/gix059
- Dundon, W. G., Arzul, I., Omnes, E., Robert, M., Magnabosco, C., Zambon, M., Gennari, L., Toffan, A., Terregino, C., Capua, I., and Arcangeli, G. (2011). Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 mu var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* **314**, 49–52. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.02.005
- de Duve, C. (1963). Foundation C. Ciba Foundation Symposium: Lysosome. De Reuck A, Cameron MP, eds. Little, Brown,.
- EFSA (2010). Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Oyster mortality. *EFSA Journal* **8**, 1894. doi:10.2903/j.efsa.2010.1894
- Ensembl Metazoa Available at: <http://metazoa.ensembl.org/index.html> [accessed 9 September 2018]
- Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A. L., and Seglen, P. O. (2011). Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* **7**, 935–956.
- Evans, O., Paul-Pont, I., Hick, P., and Whittington, R. J. (2014). A simple centrifugation method for improving the detection of Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in natural seawater samples with an assessment of the potential for particulate attachment. *Journal of Virological Methods* **210**, 59–66. doi:10.1016/j.jviromet.2014.09.023
- Fabioux, C., Corporeau, C., Quillien, V., Favrel, P., and Huvet, A. (2009). In vivo RNA interference in oyster--vasa silencing inhibits germ cell development. *The FEBS journal* **276**, 2566–2573. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06982.x
- Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews. Microbiology* **2**, 820–832. doi:10.1038/nrmicro1004
- FAO (2018a). Fisheries & Aquaculture - Collections Statistiques de La Pêche - Production mondiale de l'aquaculture. Available at: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/fr> [accessed 9 September 2018]
- FAO (2018b). Fisheries & Aquaculture - Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Available at: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/fr](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/fr) [accessed 19 September 2018]
- Farley, C. A., Banfield, W. G., Kasnic, G., and Foster, W. S. (1972). Oyster herpes-type virus. *Science (New York, N.Y.)* **178**, 759–760.
- Faure, M. (2014). The p value of HPIV3-mediated autophagy inhibition. *Cell Host & Microbe* **15**, 519–521. doi:10.1016/j.chom.2014.04.014

- Fisher, W. S. (1988). Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.*, 225–237.
- Fitzwalter, B. E., and Thorburn, A. (2015). Recent insights into cell death and autophagy. *The FEBS journal* **282**, 4279–4288. doi:10.1111/febs.13515
- Flajnik, M. F., and Du Pasquier, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology* **25**, 640–644. doi:10.1016/j.it.2004.10.001
- Francois, C., Joly, J.-P., Garcia, C., Lupo, C., Travers, M.-A., Pepin, J.-F., et al. (2013). Bilan 2012 du réseau REPAMO - Réseau national de surveillance de la santé des mollusques marins.
- Friedman, C. S., Estes, R. M., Stokes, N. A., Burge, C. A., Hargove, J. S., Barber, B. J., Elston, R. A., Burrenson, E. M., and Reece, K. S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* **63**, 33–41. doi:10.3354/dao063033
- Friedman, C. S., Shamseldin, A., Pallai, M. C., Olin, P. G., and 5 others (1997). Summer mortality and the stress response of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. shellfish Res* **16**.
- Fuhrmann, M., Petton, B., Quillien, V., Faury, N., Morga, B., and Pernet, F. (2016). Salinity influences disease-induced mortality of the oyster *Crassostrea gigas* and infectivity of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture Environment Interactions* **8**, 543–552. doi:10.3354/aei00197
- Gagnaire, B. (2005). Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l'huître creuse, *Crassostrea gigas* - Interactions entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Université de la Rochelle.
- Galloway, T. S., and Depledge, M. H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology (London, England)* **10**, 5–23.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic Control of Autophagy. *Cell* **159**, 1263–1276. doi:10.1016/j.cell.2014.11.006
- Gannagé, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Rämer, P. C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., Pypaert, M., Andersen, J., García-Sastre, A., and Münz, C. (2009). Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host & Microbe* **6**, 367–380. doi:10.1016/j.chom.2009.09.005
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.-P., Ferrand, S., Kerdudou, N., and Renault, T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research* **42**, 73. doi:10.1186/1297-9716-42-73
- Gerard, A., Naciri-Graven, Y., Boudry, P., Launey, S., Heurtebise, S., Ledu, C., and Phelipot, P. (1995). Contrôle de la gamétogénèse des huîtres creuses et plates. *Relations*

- reproduction et génétique. In ‘Groupe de travail sur la Reproduction des Mollusques. Bivalves Aquaculture Marine’.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* **221**, 3–12. doi:10.1002/path.2697
- Gómez-Chiarri, M., Warren, W. C., Guo, X., and Proestou, D. (2015). Developing tools for the study of molluscan immunity: The sequencing of the genome of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology* **46**, 2–4. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.004
- Goudenège, D., Travers, M. A., Lemire, A., Petton, B., Haffner, P., Labreuche, Y., Tourbiez, D., Mangenot, S., Calteau, A., Mazel, D., Nicolas, J. L., Jacq, A., and Le roux, F. (2015). A single regulatory gene is sufficient to alter *Vibrio aestuarianus* pathogenicity in oysters. *Environmental Microbiology* **17**, 4189–4199. doi:10.1111/1462-2920.12699
- Gouletquer, P., and Heral, M. (1997). Marine Molluscan Production Trends in France: From Fisheries to Aquaculture. *NOAA Tech. Rep. NMFS* **129**, 137–164.
- Granato, M., Santarelli, R., Farina, A., Gonnella, R., Lotti, L. V., Faggioni, A., and Cirone, M. (2014). Epstein-Barr Virus Blocks the Autophagic Flux and Appropriates the Autophagic Machinery To Enhance Viral Replication. *Journal of Virology* **88**, 12715–12726. doi:10.1128/JVI.02199-14
- Green, T. J., Helbig, K., Speck, P., and 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. doi:10.1016/j.molimm.2016.09.002
- Green, T. J., and 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  $\mu$ var). *Fish & Shellfish Immunology* **35**, 382–388. doi:10.1016/j.fsi.2013.04.051
- Green, T. J., Raftos, D., Speck, P., and Montagnani, C. (2015a). Antiviral immunity in marine molluscs. *Journal of General Virology* **96**, 2471–2482. doi:10.1099/jgv.0.000244
- Green, T. J., Robinson, N., Chataway, T., Benkendorff, K., O’Connor, W., and 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. doi:10.1016/j.antiviral.2014.08.010
- Green, T. J., Rolland, J.-L., Vergnes, A., Raftos, D., and Montagnani, C. (2015b). OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster’s anti-viral response. *Fish & Shellfish Immunology* **47**, 435–443. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.025
- Green, T. J., and Speck, P. (2018). Antiviral Defense and Innate Immune Memory in the Oyster. *Viruses* **10**. doi:10.3390/v10030133

- Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J., Enríquez-Espinoza, T. L., and Mendoza-Cano, F. (2013). Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases* **36**, 965–968. doi:10.1111/jfd.12028
- Grinde, B. (2013). Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology* **5**. doi:10.3402/jom.v5i0.22766
- Grizel, H., and Heral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science* **47**, 399–403. doi:10.1093/icesjms/47.3.399
- Guo, X., and Ford, S. E. (2016). Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. *Phil. Trans. R. Soc. B* **371**, 20150206. doi:10.1098/rstb.2015.0206
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., and Jouaux, A. (2015). Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish & Shellfish Immunology* **46**, 107–119. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.018
- Häcker, H., Tseng, P.-H., and Karin, M. (2011). Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature Reviews. Immunology* **11**, 457–468. doi:10.1038/nri2998
- Hanington, P. C., and Zhang, S.-M. (2011). The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *Journal of Innate Immunity* **3**, 17–27. doi:10.1159/000321882
- Hardy, S. W. Y., Fletcher, T. C., Olafsen, J. A., Solomon, J. B., and Horton, J. D. (1977). Aspects of cellular and humoral defense mechanisms in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental Immunobiology. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, London*, 59–66.
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S. E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., and Guo, X. (2015). Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish & Shellfish Immunology* **46**, 131–144. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.023
- Heaton, N. S., and Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host & Microbe* **8**, 422–432. doi:10.1016/j.chom.2010.10.006
- Hine, M., Wesney, B., and Hay, B. (1992). Herpesviruses Associated with Mortalities among Hatchery-Reared Larval Pacific Oysters *Crassostrea-Gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms - DISEASE AQUAT ORG* **12**, 135–142. doi:10.3354/dao012135
- Hine, P., and Thorne, T. (1997). Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms* **29**, 189–196. doi:10.3354/dao029189
- Horne, D. J., Graustein, A. D., Shah, J. A., Peterson, G., Savlov, M., Steele, S., Narita, M., and Hawn, T. R. (2016). Human ULK1 Variation and Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **214**, 1260–1267. doi:10.1093/infdis/jiw347



- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N. (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**, 973–979.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L. A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**, 891–900. doi:10.4161/auto.6.7.13038
- Hwang, J. Y., Park, J. J., Yu, H. J., Hur, Y. B., Arzul, I., Couraleau, Y., and Park, M. A. (2013). Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Diseases* **36**, 969–972. doi:10.1111/jfd.12093
- Itoh, N., Kamitaka, R., Takahashi, K. G., and Osada, M. (2010a). Identification and characterization of multiple beta-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 445–454. doi:10.1016/j.dci.2009.12.003
- Itoh, N., Okada, Y., Takahashi, K. G., and Osada, M. (2010b). Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **29**, 126–135. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.027
- Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R. K., and La Peyre, J. F. (2007). cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 957–968. doi:10.1016/j.fsi.2007.03.006
- Jackson, W. T. (2015). Viruses and the autophagy pathway. *Virology* **479–480**, 450–456. doi:10.1016/j.virol.2015.03.042
- Jean Chagot, D. (1989). Caractérisation morphologique et fonctionnelle des hémocytes d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas*, mollusques bivalves. Etude *in vitro* de leurs interactions avec le protozoaire *Bonamia ostreae* (Ascetospora). Ecole Pratique des Hautes Etude Montpellier.
- Jenner, R. G., and Young, R. A. (2005). Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Reviews. Microbiology* **3**, 281–294. doi:10.1038/nrmicro1126
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* **7**, 279–296.
- Jouaux, A., Lafont, M., Blin, J.-L., Houssin, M., Mathieu, M., and Lelong, C. (2013). Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC genomics* **14**, 590. doi:10.1186/1471-2164-14-590
- Joubert, P.-E., and Albert, M. L. (2013). L'autophagie au cours des infections virales : une épée à double tranchant. *Virologie* **17**, 331–342. doi:10.1684/vir.2013.0533

- Joubert, P.-E., Grégoire, I. P., Meiffren, G., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2011). Autophagie et pathogènes: « Bon appétit Messieurs ! ». *médecine/sciences* **27**, 41–47. doi:10.1051/medsci/201127141
- Joubert, P.-E., Werneke, S. W., de la Calle, C., Guivel-Benhassine, F., Giodini, A., Peduto, L., Levine, B., Schwartz, O., Lenschow, D. J., and Albert, M. L. (2012). Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 1029–1047. doi:10.1084/jem.20110996
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., Tangy, F., Zimmer, C., Vidalain, P.-O., Couderc, T., and Lecuit, M. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO reports* **14**, 534–544. doi:10.1038/embor.2013.51
- Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* **584**, 1287–1295. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017
- Kametaka, S., Matsuura, A., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1996). Structural and functional analyses of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. *Gene* **178**, 139–143.
- Keeling, S. E., Brosnahan, C. L., Williams, R., Gias, E., Hannah, M., Bueno, R., McDonald, W. L., and Johnston, C. (2014). New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1—an opportunistic longitudinal study. *Diseases of Aquatic Organisms* **109**, 231–239. doi:10.3354/dao02735
- Khakpoor, A., Panyasrivanit, M., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). A role for autophagolysosomes in dengue virus 3 production in HepG2 cells. *Journal of General Virology* **90**, 1093–1103. doi:10.1099/vir.0.007914-0
- Kim, N.-Y., Han, B.-I., and Lee, M. (2016). Cytoprotective role of autophagy against BH3 mimetic gossypol in ATG5 knockout cells generated by CRISPR-Cas9 endonuclease. *Cancer Letters* **370**, 19–26. doi:10.1016/j.canlet.2015.10.008
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *The Journal of Cell Biology* **147**, 435–446.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)* **290**, 1717–1721.
- Kudchodkar, S. B., and Levine, B. (2009). Viruses and autophagy. *Reviews in medical virology* **19**, 359–378. doi:10.1002/rmv.630
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032–1036. doi:10.1038/nature03029

- Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., Federico, M., Panganiban, A., Vergne, I., and Deretic, V. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *The Journal of Cell Biology* **186**, 255–268. doi:10.1083/jcb.200903070
- Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pauletto, M., Segarra, A., Gourbal, B., and Montagnani, C. (2017). Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Scientific Reports* **7**, 13143. doi:10.1038/s41598-017-13564-0
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H., and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *The EMBO journal* **17**, 3597–3607. doi:10.1093/emboj/17.13.3597
- Le Deuff, R. M., and Renault, T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *The Journal of General Virology* **80 ( Pt 5)**, 1317–1322. doi:10.1099/0022-1317-80-5-1317
- Le Deuff, R., Renault, T., and Gerard, A. (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases Of Aquatic Organisms* **24**, 149–157. doi:10.3354/dao024149
- Le Deuff, R.-M., Nicolas, J.-L., Renault, T., and Cochenec, N. (1994). Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of fish Pathologists* **14**, 69–72.
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* **7**, 767–777. doi:10.1038/nri2161
- Levine, B., and Klionsky, D. J. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 201–205. doi:10.1073/pnas.1619876114
- Levine, B., and Klionsky, D. J. (2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell* **6**, 463–477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1
- Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018
- Li, Y., Zhang, L., Qu, T., Li, L., and Zhang, G. (2016). Characterization of Oyster Voltage-Dependent Anion Channel 2 (VDAC2) Suggests Its Involvement in Apoptosis and Host Defense. *PLOS ONE* **11**, e0146049. doi:10.1371/journal.pone.0146049
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–676. doi:10.1038/45257

- Little, T. J., and Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 58–60. doi:10.1016/j.tree.2003.11.011
- Liu, Y., and Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation* **22**, 367–376. doi:10.1038/cdd.2014.143
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., and Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**, 567–577. doi:10.1016/j.cell.2005.03.007
- Loker, E. S., Bayne, C. J., Buckley, P. M., and Kruse, K. T. (1982). Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology* **68**, 84–94.
- Lorgeril, J. de, Zenagui, R., Rosa, R. D., Piquemal, D., and Bachère, E. (2011). Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression Analysis. *PLOS ONE* **6**, e23142. doi:10.1371/journal.pone.0023142
- Lussignol, M., and Esclatine, A. (2017). Herpesvirus and Autophagy: “All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!” *Viruses* **9**. doi:10.3390/v9120372
- Lussignol, M., Queval, C., Bernet-Camard, M.-F., Cotte-Laffitte, J., Beau, I., Codogno, P., and Esclatine, A. (2013). The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *Journal of Virology* **87**, 859–871. doi:10.1128/JVI.01158-12
- Lynch, S. A., Carlsson, J., Reilly, A. O., Cotter, E., and Culloty, S. C. (2012). A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* **139**, 1526–1532. doi:10.1017/S0031182012000881
- Martenot, C., Denechère, L., Hubert, P., Metayer, L., Oden, E., Trancart, S., Travaillé, E., and Houssin, M. (2015). Virulence of Ostreid herpesvirus 1  $\mu$ Var in sea water at 16°C and 25°C. *Aquaculture* **439**, 1–6. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.012
- Martenot, C., Fourou, Ode, Jouau, Travaill, Malas, and Houss (2012). Detection of the OsHV-1  $\mu$ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.12.030
- Martenot, C., Gervais, O., Chollet, B., Houssin, M., and Renault, T. (2017). Haemocytes collected from experimentally infected Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA, RNA, and proteins in relation with inhibition of apoptosis. *PLoS One* **12**, e0177448. doi:10.1371/journal.pone.0177448
- Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas, J.-P., and 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. doi:10.1016/j.virusres.2011.04.012

- Martenot, C., Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Houssin, M., and Renault, T. (2016). *In situ* localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* **136**, 124–135. doi:10.1016/j.jip.2016.04.002
- Martenot, C., Travaillé, E., Lethuillier, O., Lelong, C., and Houssin, M. (2013). Genome exploration of six variants of the Ostreid Herpesvirus 1 and characterization of large deletion in OsHV-1 $\mu$ Var specimens. *Virus Research* **178**, 462–470. doi:10.1016/j.virusres.2013.08.006
- Mateo, R., Nagamine, C. M., Spagnolo, J., Méndez, E., Rahe, M., Gale, M., Yuan, J., and Kirkegaard, K. (2013). Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *Journal of Virology* **87**, 1312–1321. doi:10.1128/JVI.02177-12
- Matile, P. (1978). Biochemistry and Function of Vacuoles. *Annual Review of Plant Physiology* **29**, 193–213. doi:10.1146/annurev.pp.29.060178.001205
- Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaert, E. F., and Codogno, P. (2015). Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids* **47**, 2037–2063. doi:10.1007/s00726-014-1765-4
- Meijer, W. H., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., and Kiel, J. A. K. W. (2007). ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* **3**, 106–116.
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D. H., and Levine, B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 1387–1391. doi:10.1126/science.1087782
- Metz, P., Chiramel, A., Chatel-Chaix, L., Alvisi, G., Bankhead, P., Mora-Rodriguez, R., Long, G., Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., and Bartenschlager, R. (2015). Dengue Virus Inhibition of Autophagic Flux and Dependency of Viral Replication on Proteasomal Degradation of the Autophagy Receptor p62. *Journal of Virology* **89**, 8026–8041. doi:10.1128/JVI.00787-15
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation-agreste (2014). Pêche, aquaculture- Recensement de la conchyliculture 2012. Available at: [http://agreste.agriculture.gouv.fr/spip.php?page=thematique\\_all\\_etudes&id\\_rubrique=90](http://agreste.agriculture.gouv.fr/spip.php?page=thematique_all_etudes&id_rubrique=90) [accessed 9 September 2018]
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & Development* **21**, 2861–2873. doi:10.1101/gad.1599207
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation* **12 Suppl 2**, 1535–1541. doi:10.1038/sj.cdd.4401728
- Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology* **12**, 823–830.

- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398. doi:10.1038/26506
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**, 107–132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
- Moore, M. N., Viarengo, A., Donkin, P., and Hawkins, A. J. S. (2007). Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* **84**, 80–91. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.007
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.-A., Rubinsztein, D. C., and Renault, T. (2015). Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* **11**, 516–526. doi:10.1080/15548627.2015.1017188
- Morga, B., Faury, N., Guesdon, S., Chollet, B., and Renault, T. (2017). Haemocytes from *Crassostrea gigas* and OsHV-1: A promising *in vitro* system to study host/virus interactions. *Journal of Invertebrate Pathology* **150**, 45–53. doi:10.1016/j.jip.2017.09.007
- Morrissey, T., McCleary, S., Collins, E., Henshilwood, K., and Cheslett, D. (2015). An investigation of ostreid herpes virus microvariants found in *Crassostrea gigas* oyster producing bays in Ireland. *Aquaculture Complete*, 86–92. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.02.026
- Moss, J. A., Bureson, E. M., Cordes, J. F., Dungan, C. F., Brown, G. D., Wang, A., Wu, X., and Reece, K. S. (2007). Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**, 207–223. doi:10.3354/dao01829
- Muehlbauer, F., Fraser, D., Brenner, M., Van Nieuwenhove, K., Buck, B. H., Strand, O., Mazurié, J., Thorarinsdottir, G., Dolmer, P., O'Beirn, F., Sanchez-Mata, A., Flimlin, G., and Kamermans, P. (2014). Bivalve aquaculture transfers in Atlantic Europe. Part A: Transfer activities and legal framework. *Ocean & Coastal Management* **89**, 127–138. doi:10.1016/j.ocecoaman.2013.12.003
- Murgarella, M., Puiu, D., Novoa, B., Figueras, A., Posada, D., and Canchaya, C. (2016). A First Insight into the Genome of the Filter-Feeder Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PloS One* **11**, e0151561. doi:10.1371/journal.pone.0151561
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., and Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 1037–1040. doi:10.1126/science.1103966
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 458–467. doi:10.1038/nrm2708

- Nicolas, J. L., Comps, M., and Cochenec, N. (Ifremer (1992). Herpes-like virus infecting Pacific-oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.
- NobelPrize.org (2016). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016. *NobelPrize.org*. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/summary/> [accessed 18 December 2018]
- Normand, J., Blin, J., and Jouaux, A. (2014). Rearing practices identified as risk factors for ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) infection in Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Diseases of Aquatic Organisms* **110**, 201–211. doi:10.3354/dao02756
- Novikoff, A. B., Beaufay, H., and de Duve, C. (1956). Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **2**, 179–184.
- Novikoff, A. B., and Essner, E. (1962). Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *The Journal of Cell Biology* **15**, 140–146.
- Nowag, H., Guhl, B., Thriene, K., Romao, S., Ziegler, U., Dengjel, J., and Münz, C. (2014). Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles. *EBioMedicine* **1**, 116–125. doi:10.1016/j.ebiom.2014.11.007
- O’ Reilly, A. J., Laide, C., Maloy, A., Hutton, S., Bookelaar, B., O’ Sullivan, K., Lynch, S. A., and Culloty, S. C. (2018). The role of the mussel *Mytilus spp.* in the transmission of ostreid herpesvirus-1 microVar. *Parasitology* **145**, 1095–1104. doi:10.1017/S0031182017002244
- Ohshima, J., Lee, Y., Sasai, M., Saitoh, T., Su Ma, J., Kamiyama, N., Matsuura, Y., Pann-Ghill, S., Hayashi, M., Ebisu, S., Takeda, K., Akira, S., and Yamamoto, M. (2014). Role of mouse and human autophagy proteins in IFN- $\gamma$ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **192**, 3328–3335. doi:10.4049/jimmunol.1302822
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research* **24**, 9–23. doi:10.1038/cr.2013.169
- OIE (2018). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2018), Chapter 2.2.5 Infection with ostreid herpesvirus 1 microvariants. Available at: <http://www.oie.int/fr/normes/manuel-aquatique/acces-en-ligne/>
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., and Bourgoignon, N. (2005). Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Research* **66**, 147–152. doi:10.1016/j.antiviral.2005.03.003
- Orvedahl, A., Alexander, D., Tallóczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host & Microbe* **1**, 23–35. doi:10.1016/j.chom.2006.12.001

- Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Tallóczy, Z., Zou, Z., and Levine, B. (2010). Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host & Microbe* **7**, 115–127. doi:10.1016/j.chom.2010.01.007
- Owens, L., and Malham, S. (2015). Review of the RNA Interference Pathway in Molluscs Including Some Possibilities for Use in Bivalves in Aquaculture. *ResearchGate* **3**, 87–99. doi:10.3390/jmse3010087
- Panyasrivanit, M., Khakpoor, A., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *The Journal of General Virology* **90**, 448–456. doi:10.1099/vir.0.005355-0
- Parzych, K. R., and Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**, 460–473. doi:10.1089/ars.2013.5371
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–939. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002
- Pauletto, M., Segarra, A., Montagnani, C., Quillien, V., Faury, N., Le Grand, J., Miner, P., Petton, B., Labreuche, Y., Fleury, E., Fabioux, C., Bargelloni, L., Renault, T., and Huvet, A. (2017). Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *The Journal of Experimental Biology*. doi:10.1242/jeb.156299
- Paul-Pont, I., Dhand, N. K., and Whittington, R. J. (2013a). Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* **412–413**, 202–214. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.038
- Paul-Pont, I., Dhand, N. K., and Whittington, R. J. (2013b). Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Diseases of Aquatic Organisms* **105**, 127–138. doi:10.3354/dao02615
- Paul-Pont, I., Evans, O., Dhand, N. K., Rubio, A., Coad, P., and Whittington, R. J. (2014). Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture* **422–423**, 146–159. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.009
- Peeler, E. J., Allan Reese, R., Cheslett, D. L., Geoghegan, F., Power, A., and Thrush, M. A. (2012). Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1  $\mu$ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* **105**, 136–143. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.02.001
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Degremont, L., Lagarde, F., Pepin, J.-F., and Keck, N. (2012). Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions* **2**, 215–237. doi:10.3354/aei00041



- Pernet, F., Tamayo, D., and Petton, B. (2015). Influence of low temperatures on the survival of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) infected with ostreid herpes virus type 1. *Aquaculture* **445**, 57–62. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.010
- Perry, K. J., and Henry, J. Q. (2015). CRIPR/Cas9-mediated genome modification in the mollusc, *Crepidula fornicata*. *Genesis (New York, N.Y.:2000)* **53**, 237–244. doi:10.1002/dvg.22843
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., and Boudry, P. (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* **3**, 257–273. doi:10.3354/aei00070
- Phillips, T., Opferman, J. T., Shah, R., Liu, N., Froelich, C. J., and Ashton-Rickardt, P. G. (2004). A role for the granzyme B inhibitor serine protease inhibitor 6 in CD8+ memory cell homeostasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **173**, 3801–3809.
- Picot, S., Morga, B., Faury, N., Chollet, B., Dégremont, L., Travers, M.-A., Renault, T., and Arzul, I. (accepted). A study of autophagy in haemocytes of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Autophagy*.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., and Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation* **112**, 1809–1820. doi:10.1172/JCI20039
- Randall, R. E., and Goodbourn, S. (2008). Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **89**, 1–47. doi:10.1099/vir.0.83391-0
- Reggiori, F., Komatsu, M., Finley, K., and Simonsen, A. (2012). Autophagy: more than a nonselective pathway. *International Journal of Cell Biology* **2012**, 219625. doi:10.1155/2012/219625
- Ren, W., Chen, H., Renault, T., Cai, Y., Bai, C., Wang, C., and Huang, J. (2013). Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal* **10**, 110. doi:10.1186/1743-422X-10-110
- Renault, and Arzul (2001). Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases* **24**, 161–167. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00282.x
- Renault, T. (1998). Infection herpétiques chez les invertébrés : détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins. *Annales de l'Institut Pasteur. Virologie* **2**, 401–403.
- Renault, T., Bouquet, A. L., Maurice, J.-T., Lupo, C., and Blachier, P. (2014). Ostreid Herpesvirus 1 Infection among Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Spat: Relevance of Water Temperature to Virus Replication and Circulation Prior to the Onset of

- Mortality. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 5419–5426. doi:10.1128/AEM.00484-14
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.-M., and Chollet, B. (1994a). Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of fish Pathologists* **14**, 64–66.
- Renault, T., Deuff, R. L., Chollet, B., Cochenec, N., and Grard, A. (2000). Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* **42**, 173–183. doi:10.3354/dao042173
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., and Moreau, K. (2011). Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Developmental & Comparative Immunology* **35**, 725–735. doi:10.1016/j.dci.2011.02.004
- Renault, T., Le Deuff, R., Cochenec, N., Chollet, B., and Maffart, P. (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: a comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Veterinary Research* **26**, 539–543.
- Renault, T., Le Deuff, R.-M., Cochenec, N., and Maffart, P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire* **145**, 735–742.
- Renault, T., Lipart, C., and Arzul, I. (2001a). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *Journal of Fish Diseases* **24**, 369–376. doi:10.1046/j.1365-2761.2001.00300.x
- Renault, T., Lipart, C., and Arzul, I. (2001b). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* **45**, 1–7. doi:10.3354/dao045001
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J.-F., Segarra, A., and 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. doi:10.1128/JVI.06534-11
- Renault, T., and Novoa, B. (2004). Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* **17**, 397–409. doi:10.1051/alr:2004049
- Riout, D. (2013). Motilité cellulaire et immunocompétente des hémocytes de mollusques marins : applications aux diagnostics environnementaux. Le Havre.
- Robert, R., Sanchez, J. L., Perez-Paralle, L., Ponis, E., Kamermans, P., and O'Mahoney, M. (2013). A glimpse on the mollusc industry in Europe. *Aquaculture Europe* **38**, 5–11.

- Roque, A., Carrasco, N., Andree, K. B., Lacuesta, B., Elandaloussi, L., Gairin, I., Rodgers, C. J., and Furones, M. D. (2012). First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* **324–325**, 303–306. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.10.018
- Ruddell, C. L. (1971). Elucidation of the nature and function of the granular oyster amebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. *Histochemie. Histochemistry. Histochimie* **26**, 98–112.
- Sagnier, S., Daussy, C. F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F. P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., and Espert, L. (2015). Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes. *Journal of Virology* **89**, 615–625. doi:10.1128/JVI.02174-14
- Salvi, D., Macali, A., and Mariottini, P. (2014). Molecular Phylogenetics and Systematics of the Bivalve Family Ostreidae Based on rRNA Sequence-Structure Models and Multilocus Species Tree. *PLOS ONE* **9**, e108696. doi:10.1371/journal.pone.0108696
- Salvi, D., and Mariottini, P. (2017). Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* **179**, 263–276. doi:10.1111/zoj.12455
- Sauvage, C., Pépin, J. F., Lapègue, S., Boudry, P., and Renault, T. (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: Differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Research* **142**, 181–187. doi:10.1016/j.virusres.2009.02.013
- Schikorski, D., Faury, N., Pepin, J. F., Saulnier, D., Tourbiez, D., and Renault, T. (2011). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* **155**, 28–34. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.031
- Schlumpberger, M., Schaeffeler, E., Straub, M., Bredschneider, M., Wolf, D. H., and Thumm, M. (1997). AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 1068–1076.
- Schmid, D., and Münz, C. (2005). Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. *Cell Death and Differentiation* **12**, 1519–1527. doi:10.1038/sj.cdd.4401727
- Schmid, D., and Münz, C. (2007). Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity* **27**, 11–21. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.004
- Schmitt, P., Duperthuy, M., Montagnani, C., Bachere, E., and Destoumieux-Garzón, D. (2011). Immune responses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: An overview with focus on summer mortalities. In 'Oysters Physiology, Ecological Distribution and Mortality'.

- Schmitt, P., Gueguen, Y., Desmarais, E., Bachère, E., and de Lorgeril, J. (2010). Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 23. doi:10.1186/1471-2148-10-23
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., and Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual review of immunology* **32**, 513–545. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231
- Scott, R. C., Schuldiner, O., and Neufeld, T. P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Developmental Cell* **7**, 167–178. doi:10.1016/j.devcel.2004.07.009
- Segarra, A. (2014). Etude des interactions hôte/virus chez l’huître creuse *Crassostrea gigas* et son virus Ostreid herpesvirus 1, Studying interaction between the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and Ostreid herpesvirus type 1. Université de Bretagne-Sud.
- Segarra, A., Baillon, L., Faury, N., Tourbiez, D., and Renault, T. (2016). Detection and distribution of ostreid herpesvirus 1 in experimentally infected Pacific oyster spat. *Journal of Invertebrate Pathology* **133**, 59–65. doi:10.1016/j.jip.2015.11.013
- Segarra, A., Baillon, L., Tourbiez, D., Benabdelmouna, A., Faury, N., Bourgougnon, N., and Renault, T. (2014a). Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* **45**, 103. doi:10.1186/s13567-014-0103-x
- Segarra, A., Faury, N., Pépin, J.-F., and Renault, T. (2014b). Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology* **119**, 5–11. doi:10.1016/j.jip.2014.03.002
- Segarra, A., Mauduit, F., Faury, N., Trancart, S., Dégremont, L., Tourbiez, D., Haffner, P., Barbosa-Solomieu, V., Pépin, J.-F., Travers, M.-A., and Renault, T. (2014c). Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC genomics* **15**, 580. doi:10.1186/1471-2164-15-580
- Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., and 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. doi:10.1016/j.virusres.2010.07.011
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., and Cherry, S. (2009). Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* **30**, 588–598. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.009
- Shimahara, Y., Kurita, J., Kiryu, I., Nishioka, T., Yuasa, K., Kawana, M., Kamaishi, T., and Oseko, N. (2012). Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Variants in Japan. *Fish Pathology* **47**, 129–136. doi:10.3147/jsfp.47.129
- Simakov, O., Marletaz, F., Cho, S.-J., Edsinger-Gonzales, E., Havlak, P., Hellsten, U., Kuo, D.-H., Larsson, T., Lv, J., Arendt, D., Savage, R., Osoegawa, K., de Jong, P., Grimwood, J., Chapman, J. A., Shapiro, H., Aerts, A., Otilar, R. P., Terry, A. Y.,

- Boore, J. L., Grigoriev, I. V., Lindberg, D. R., Seaver, E. C., Weisblat, D. A., Putnam, N. H., and Rokhsar, D. S. (2013). Insights into bilaterian evolution from three spiralian genomes. *Nature* **493**, 526–531. doi:10.1038/nature11696
- Smith, T. T., and Whitley, R. J. (2017). 166 - Herpesviruses. In ‘Infectious Diseases (Fourth Edition)’. (Eds J. Cohen, W. G. Powderly, and S. M. Opal.) pp. 1426-1438.e1. (Elsevier.) doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00166-0
- Soudant, P., E. Chu, F.-L., and Volety, A. (2013). Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 196–216. doi:10.1016/j.jip.2013.06.001
- Stolfi, A., Gandhi, S., Salek, F., and Christiaen, L. (2014). Tissue-specific genome editing in *Ciona* embryos by CRISPR/Cas9. *Development (Cambridge, England)* **141**, 4115–4120. doi:10.1242/dev.114488
- Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Gyoja, F., Tanaka, M., Ikuta, T., et al. (2012). Draft Genome of the Pearl Oyster *Pinctada fucata*: A Platform for Understanding Bivalve Biology. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* **19**, 117–130. doi:10.1093/dnares/dss005
- Takeuchi, T., Koyanagi, R., Gyoja, F., Kanda, M., Hisata, K., Fujie, M., et al. (2016). Bivalve-specific gene expansion in the pearl oyster genome: implications of adaptation to a sessile lifestyle. *Zoological Letters* **2**, 3. doi:10.1186/s40851-016-0039-2
- Tallóczy, Z., Virgin, H. W., and Levine, B. (2006). PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* **2**, 24–29.
- Tamayo, D., Corporeau, C., Petton, B., Quere, C., and Pernet, F. (2014). Physiological changes in Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the herpesvirus OsHV-1 $\mu$ Var. *Aquaculture* **432**, 304–310. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.023
- Tanida, I., Mizushima, N., Kiyooka, M., Ohsumi, M., Ueno, T., Ohsumi, Y., and Kominami, E. (1999). Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1367–1379. doi:10.1091/mbc.10.5.1367
- Thomson, B. J. (2001). Viruses and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology* **82**, 65–76. doi:10.1111/j.1365-2613.2001.iep0082-0065-x
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F., and Boulo, V. (2007). Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 859–873. doi:10.1016/j.dci.2007.01.005
- Tischer, B. K., and Osterrieder, N. (2010). Herpesviruses--a zoonotic threat? *Veterinary Microbiology* **140**, 266–270. doi:10.1016/j.vetmic.2009.06.020
- Travers, M.-A., Boettcher Miller, K., Roque, A., and Friedman, C. S. (2015). Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**, 11–31. doi:10.1016/j.jip.2015.07.010

- Valdor, R., and Macian, F. (2012). Autophagy and the Regulation of the Immune Response. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **66**, 475–483. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.003
- Vidal, C. (2011). ‘Huîtres, moules & autres coquillages’ Sang de la Terre.
- Wang, L., Song, X., and Song, L. (2017a). The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. doi:10.1016/j.dci.2017.05.025
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L., and Song, L. (2017b). The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology* **67**, 221–228. doi:10.1016/j.dci.2016.09.017
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host & Microbe* **5**, 365–375. doi:10.1016/j.chom.2009.03.007
- Whittington, R. J., Hick, P. M., Evans, O., Rubio, A., Alford, B., Dhand, N., and Paul-Pont, I. (2015). Protection of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat from mortality due to ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1  $\mu$ Var) using simple treatments of incoming seawater in land-based upwellers. *Aquaculture* **437**, 10–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.016
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* **4**, 278–286. doi:10.1038/nchembio.85
- Wootton, E. C., Dyrnyda, E. A., and Ratcliffe, N. A. (2003). Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 195–210.
- Xia, J., Bai, C., Wang, C., Song, X., and Huang, J. (2015). Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal* **12**. doi:10.1186/s12985-015-0334-0
- Yakoub, A. M., and Shukla, D. (2015). Autophagy stimulation abrogates herpes simplex virus-1 infection. *Scientific Reports* **5**, 9730. doi:10.1038/srep09730
- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* **335**, 1–32. doi:10.1007/978-3-642-00302-8\_1
- Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* **22**, 124–131. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.014
- Yeaman, M. R., and Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27–55. doi:10.1124/pr.55.1.2
- Yin, H.-C., Zhao, L.-L., Li, S.-Q., Niu, Y.-J., Jiang, X.-J., Xu, L.-J., Lu, T.-F., Han, L.-X., Liu, S.-W., and Chen, H.-Y. (2017). Autophagy activated by duck enteritis virus

- infection positively affects its replication. *The Journal of General Virology* **98**, 486–495. doi:10.1099/jgv.0.000696
- Yin, X., Cao, L., Kang, R., Yang, M., Wang, Z., Peng, Y., Tan, Y., Liu, L., Xie, M., Zhao, Y., Livesey, K. M., and Tang, D. (2011). UV irradiation resistance-associated gene suppresses apoptosis by interfering with BAX activation. *EMBO Reports* **12**, 727–734. doi:10.1038/embor.2011.79
- Yonekawa, T., and Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in Biochemistry* **55**, 105–117. doi:10.1042/bse0550105
- Yordy, B., and Iwasaki, A. (2011). Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection. *Current opinion in virology* **1**, 196–203. doi:10.1016/j.coviro.2011.05.016
- Yuan, W., Strømhaug, P. E., Dunn, W. A., and Jr (1999). Glucose-induced Autophagy of Peroxisomes in *Pichia pastoris* Requires a Unique E1-like Protein. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1353. doi:10.1091/mbc.10.5.1353
- 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. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, L., Li, L., Guo, X., Litman, G. W., Dishaw, L. J., and Zhang, G. (2015). Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports* **5**, 8693. doi:10.1038/srep08693
- Zhang, L., Li, L., and Zhang, G. (2011). Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Developmental & Comparative Immunology* **35**, 603–610. doi:10.1016/j.dci.2011.01.005
- Zhang, S.-M., Zeng, Y., and Loker, E. S. (2007). Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. *Immunogenetics* **59**, 883–898. doi:10.1007/s00251-007-0245-3
- Zhang, Y., Yu, F., Li, J., Tong, Y., Zhang, Y., and Yu, Z. (2014). The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology* **40**, 466–471. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.029

## ANNEXES

<b>Annexe A.</b> Poster présenté à la NSA - 110 <sup>th</sup> Annual Meeting of the National Shellfisheries Association. ....	213
<b>Annexe B.</b> Supplementary file n°1: List of amino acid sequences of the three animals ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Homo sapiens</i> and <i>Crassostrea gigas</i> ) collected during the identification of the autophagy proteins in <i>C. gigas</i> . ....	215
<b>Annexe C.</b> Supplementary file n°2: List of amino acid sequences of the species used to performed phylogeny analysis of ATG7, ATG9A, ATG12, ULK2. ....	245





## Annexe A. Poster présenté à la NSA - 110<sup>th</sup> Annual Meeting of the National Shellfisheries Association.

### Multi-structural approach to decipher macroautophagy in haemocytes of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Sandy Picot<sup>1</sup>, Isabelle Arzul<sup>1</sup>, Nicole Faury<sup>1</sup>, Bruno Chollet<sup>1</sup>, Lionel Dégremont<sup>1</sup>, Marie-Agnès Travers<sup>1</sup>, Tristan Renault<sup>2</sup>, Benjamin Morga<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques, Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques Marins, Avenue de Mus de Loup, 17390 La Tremblade, France

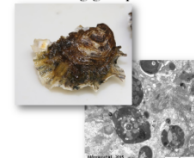
<sup>2</sup> Ifremer, Département Ressources Biologiques et Environnement, Rue de l'Île d'Yeu – BP 21105 – 44311 Nantes Cedex 3, France

#### Introduction

Autophagy is an important mechanism that contributes to maintain cellular homeostasis and different cellular processes including adaptation to starvation, microorganisms elimination and cell death. Recent results indicate that this mechanism occurs in the mantle of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Nevertheless no information is available on this pathway in haemocytes, main effectors of the immune system of *C. gigas*. They play a key role in the defense of the pacific oyster against pathogens.

Flow cytometry, fluorescent microscopy and transmission electron microscopy were adapted to our biological model and used to investigate autophagy in oyster's haemocytes after 24h and 48h exposure to autophagy inhibitor (NH<sub>4</sub>Cl) and inducer (carbamazepine).

*Crassostrea gigas* spat



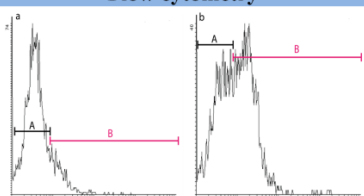
Autophagic structures in the mantle of *C. gigas*

#### Goal

Monitor autophagy in haemocytes of *C. gigas* at a cellular level using different cellular tools (flow cytometry, fluorescent and transmission electron microscopy) and modulators of the autophagy pathway (NH<sub>4</sub>Cl, inhibitor and carbamazepine, inducer).

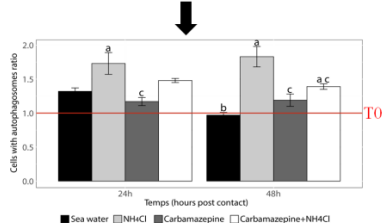
#### Results

##### Flow cytometry



FLI histogram of cells stained with Cyto ID® (a) haemocytes in normal condition (b) haemocytes presenting an autophagy induction

→ Two cells populations can be identified dependent of the presence/absence of autophagosomes.



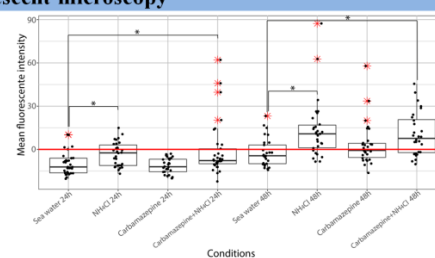
Ratios between haemocytes with autophagosomes in the different tested conditions (sea water, NH<sub>4</sub>Cl, Carbamazepine, NH<sub>4</sub>Cl+Carbamazepine) and T0 after 24 or 48 hours

→ NH<sub>4</sub>Cl (24h et 48h) and NH<sub>4</sub>Cl+Carbamazepine (48h) significantly modulate the autophagy pathway in comparison with sea water condition.

##### Fluorescent microscopy

→ Fluorescence intensity at 24h and 48h is significantly more important in the NH<sub>4</sub>Cl and NH<sub>4</sub>Cl+Carbamazepine condition than in the sea water condition.

→ The quantity of autophagosome per haemocyte is significantly more important in the NH<sub>4</sub>Cl and NH<sub>4</sub>Cl+Carbamazepine than the sea water condition.

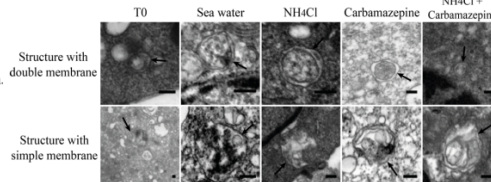


Mean of fluorescence intensity of haemocytes staining with Cyto ID®

##### Transmission electron microscopy

→ Double membrane structures are clearly visible with a content similar to the cytoplasm.

→ Single membranes can be observed and contains a partially degraded or an intact content.



Examples of autophagic structures with double or simple membrane in the different tested conditions

#### Conclusions and perspectives

- The combination of flow cytometry, fluorescent and transmission electron microscopy has allowed monitoring successfully autophagy in *C. gigas* haemocytes.
- The results demonstrate that autophagy in oyster haemocyte is modulated by an exposure to NH<sub>4</sub>Cl and carbamazepine known to inhibit and induce respectively autophagy in mammals.
- This work open new perspectives to follow this mechanism in *C. gigas* at cellular level under different biotic and abiotic stressors (algae, pathogens, starvation...).



**Annexe B.** Supplementary file n°1: List of amino acid sequences of the three animals (*Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* and *Crassostrea gigas*) collected during the identification of the autophagy proteins in *C. gigas*.

All sequences are in Fasta format. The specie name of the sequence is highlighted in yellow.

1. Serine/threonine-protein kinase mTOR (mTOR)

```
>tr|K1PYM7|K1PYM7_CRAGI Serine/threonine-protein kinase TOR OS=Crassostrea
gigas OX=29159 GN=CGI_10010427 PE=3 SV=1
MDLYRFVVTREMPSEYHTTFMDKFNHFIFEMVSSDMNERKGGILAIIVSLTGVDVGN
STRISRFSNYLRNLLPSNDVSVMEMAARAVGWLAYSSGSYAAEYVEHEVKRALEWLTS
DRQESKRLA AVLVLKELAVNTP TFFFQVQVQFFDCIFNAVRDPKPNIREGAVAALRAALAV
T SQRESKATQKAQWYRQCYDEAVKLYDELQGREKKLSRDDWAHGSLLIMNELLRCSNIEGE
RLRMEMEDITNQYQHERTLKEMSKTHKSPSSSLALQQFQHKAFFINNFM SGNRHNMQKI
SFESRTCKQLVESHFQKVCALLLRHKNSKSVHIQLILQVIFPRLAAFKPHEFSRLYLDDT
INFLLGSLKTTTRDKTSTFQAIGLLAISVQDNIVRYLPGILEVIRASLPPKDLPAKKQKNM
VVDPSVFTCSIMLARAVGPAMIKDVRDLLDSMFATGLSPALTAALRDLAIQIPQLKKEIQ
EGLLNLSLILMGRQLRHGAPKSPLOFPFMSASLTNLADIQDATSITLALKTLGSFDFE
GHSLTQFVQHCAEQYLSSDHKEIRMEAVRTPCARLLTPLLQLLANSQGOISIAAMNTVAEV
LHKLLVVGITDTGELEEGVIINIRTELEYSVGVGRNKEQAAKMLGHLVANAARLVRPYMEP
ILNALIPKLKEPDPNPNVTISVLVAIGEQAQVSGTEMRKWMDLELLPLILEMLQDSSSLQK
REVALWTLGQLVESTGYVIEPYKRYPSLLEVLNLFKTEQATGIRREVIRVLGLLGALDP
HKHKMNQGMIQRNESNSVSASDTKLSSTQ PENTSEMLANMTASTTLEEIYPAIAIATL
MRIIRDPSLSQHHTMVVQAITFIFKSLGIKCVPIYQVPIPAYLAVIRSADQTFREFLFQQ
LGVIIAIVKQHIRNYLNDIFTIIEKEYWSPNSTMONTIINLVEQIVTALGTEFKIYLPQII
PQILKVFMDSSDNRAVTGKLLNALQLFGANLDDYLHLLLPPVVKLFDSPDVPLSVKRIA
LETVDKLTTLTDLTEFASRIIHPLVRTLDSVPELQTAAMDTLCAMVMQMGPKFTIFIPMV
QRVIQKHKIAHQRYFILMARILKASTIAEEEDDPILLKHKRKNRGKATESSESMA DTAVIK
KLHVSFINLQKALEAGRKESKEDWMEWLRRLSIELLKESSPALRSCWALAQTYN SLAKD
LFNAAFVSCWTELTEAQQDELILSLEQALTSQEIPEITQTLNLAEFMEHC DKGPLPLDT
SLLGSRAMRCRAYAKALHYKEEEFHRGPTTATLESLSINNKLQQPE SASGVLYAQNHR
TDVKVQESWYEKLEHEWNKALEAYEKKQEEKPEDFNLT LGRMRCLEALAEWGH LHQIACEK
WGTSSDENRTDMARMAASA AWGLGQWDSMEEYMCLIPRNSYNGAFYRAVFALHTENYQLA
QQCIDKARDILDTELTAMAGESYNRAYGAMVNVQMLSELEEVMQFKLVPERQEA IKHMWW
DRLQGCQRVVEDWQKI IQVRSLVVSPLEDMKTWLKYASLCRKSGR LALSQKTLVMLLGM
PAKNC DKPIPTTNPQVTFAYLKHMMKSSQKKEAYGKLQHFVQHSLOTRALQLITPEDTQQ
RTQLNKLKALYKLGDWADMLYGVNEESVTQILEYSLATEYDKYWKAWHG WALINYE
AVLFYKQSEKSGNQPSQPGDIGPPGRGDAPLSPKTDTSVSTASKMHKVCVLAVQGFFRS I
SLSQNKSLQDTLRLLTLMFDYQWLEVEYALNDGLKTIQVENWLQVIPQLIARIDI PRPL
VSRLISQLLIDIGKAHPQALIYPLTVASKSNV PARQTAANKILKNMCEHSNTLVQQAMLV
SEELIRVAIILWHELWHEGLEEASRLYFGERDIKGMFSTLEPLHNMVERGPQTLKETSFNQ
AYGRDLMEAEQEWCRKYQRSENVKDLTQAWDLYYHVFRRISKQLPQLTSLELQYVSPKLLR
CQDLELAVPGKYEPNQPIVKIKRCQSSLOVITSKQRPRKLSIFGSNGKEFQFLKGHEDL
RQDERVMQLFGLVNSLLVENPETFRNRNTIQRF SVIPLSTNSGLIGWVPHTDTLHSLIRD
YREKKKILLNIEHRLMLRMAPDYDHLTLMQKVEVFEHALEHTQGD DLAKILWYKSPSSEV
WFDRTNYTRSLAVMSMVGYVLGGLGDRHPSNLMLDRTSGKVIHIDFGDCFEVAMVREKFP
EKIPFRLTRMLINAMEVTGIDGNYKMTCE SVM EVLREHKDSLMAVLEAFVYDPLLNRML
DTTAKGKTKTKDSYSGGSQE QADMLENV DINQTAHKRSAP EAASSVSGDNFQAEVINKKA
LSIINRVRDKLTGRDFSQGDPI DVPTQVDLLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW
```

```
>sp|P42345|MTOR_HUMAN Serine/threonine-protein kinase mTOR OS=Homo sapiens
OX=9606 GN=MTOR PE=1 SV=1
MLGTGPA AATTAATTSSNVSVLQQFASGLKSRNEETRAKAAKELQHYVTMELREMSQ EES
TRFYDQLNHHIFELVSSSDANERKGGILAIASLIGVEGGNATRIGRFANYLRNLLPSNDP
VVMEMASKAIGRLAMAGDTFTA EYVEFEVKRALEWL GADRNEGRRAAVLVLRELAI SVP
TFFFQVQVQFFDNI FVAVWDPKQAI REGAVAALRA CLILTTQREPKEMQKQWYRHTFEE
AEKGFDETLAKEKGMNRDDRIHGALLILNELVRISSMEGERLREEMEEITQQQLVHDKYC
KDLMGFGTKPRHITPFTSFQAVQPQSNALVGLLGYSSHQGLMGFGTSPSPAKSTLVESR
```

CCRDLMEEKFDQVCQWVLKCRNSKNSLIQMTILNLLPRLAAFRPSAFTDTQYLQDTMNHV  
LSCVKKEKERTAAFQALGLLSVAVRSEFKVYLPRVLDIIRAALPPKDFAHKRQKAMQVDA  
TVFTCISMLARAMPGIQQDIKELLEPMLAVGLSPALTAVLYDLRSQIPQLKKDIQDGLL  
KMLSLLVLMHKPLRHPGMPKGLAHQLASPLTTLPEASDVGSITLALRTLGSFEFEGHSLT  
QFVRHCADHFLNSEHKEIRMEAARTCSRLLTPSIHLISGHAAHVVSQTAVQVVADVLSKLL  
VVGITDPPDIRYCVLASLDERFDAHLAQENLQALFVALNDQVFEIRELAICTVGRLLSS  
MNPFAFVMPFLRKMLIQILTELEHSGIGRIKEQSARMLGHLVSNAPRLIRPYMEPILKALI  
LKLKDPDPDPNPGVINNVLATIGELAQVSGLEMRKWVDELFIIMDMLQDSSLLAKRQVA  
LWTLGQLVASTGYVVEPYRKYPTLLEVLNLFKTEQNQGTREAIRVGLLGLDLPYKHK  
VNIGMIDQSRDASAVSLSESKSSQDSSDYSTSEMLVNMGNLPLDEFYPAVSMVALMRIFR  
DQSLSHHHTMVVQAITFIKSLGLKCVQFLPQVMPTFLNVIKVCDAIREFLFQQLGMLV  
SFVKSHIRPYMDEIVTLMREFWVMTSISQSTIILLIEQIVVALGGEFKLYLPQLIPHMLR  
VFMHDNSPGRIVSIKLLAAIQLFGANLDDYLHLLLPPIVKLFDAPAPLPSRKAALLETVD  
RLTESLDFTDYASRIIHPIVRTLQSPPELRSTAMDTLSSLVFQLGKKYQIFIPMVNKLIV  
RHRINHQRYDVLIKRVKGYTLADEEEDPLIYQHRMLRSGQGDALASGPVETGPMKKLHV  
STINLQKAWGAARRVSKDDWLEWLRRLSLELLKDS SSPSLRSCWALAQAYNPMARDLFNA  
AFVSCWSELNEDQQDELIRSIELALTSQDIAEVTQTLNLAEFMEHSDKGPLPLRDDNGI  
VLLGERAAKCRAYAKALHYKELEFQKGPTPAILESLSINNKLQQPEAAAAGVLEYAMKHF  
GELEIQATWYEKLHEWEDALVAYDKKMDTNKDDPELMLGRMRCLEALGEWQQLHQQCEK  
WTLVNDQAKMARMAAAAAWGLGQWDSMEEYTCMI PRDTHDGAFYRAVLALHQLDLSLA  
QQCIDKARDLLDAELTAMAGESYSRAYGAMVSMCHLSELEEVIQYKLVPERREIRQIWW  
ERLQGCQRIVEDWQKILMVRSLVSPHEDMRTWLKYASLCGKSGRLALAHKTLVLLGVD  
PSRQLDHLPTVHPQVTYAYMKNMWSKARKIDAFQHMQHVFQTMQQQAQHA IATEDQQHK  
QELHKL MARCFKLKGEWQLNLQGINESTIPKVLQYYSAAATEHDRSWYKAWHAWVMNFEA  
VLHYKHQNQARDEKKKLRHASGANITNATTAATTAATATTTASTEGSNSESEAESTENS  
TPSPLQKKVTEDLSKTLMLMYTVPVAVQGGFFRSISLSRGNLQDTRLVTLWFDYGHWPDVN  
EALVEGVKAIQIDTWLQVPIQLIARIDTPRPLVGRLIHQLLTDIGRYHPQALIYPLTVAS  
KSTTTARHNAANKILKNMCEHSNTLVQQAMMVSEELIRVAIILWHEMWHGLEEASRLYFG  
ERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQA  
WDLYYHVFRIRISKQLPQLTSLELQYVSPKLLMCRDLELAVPGTYDPNQPIIRIQSIAPSL  
QVITSKQVPRKLTLMGNSNGHEFVFLKGHEDLRQDERVMQLFGLVNTLLANDPTSLRKNL  
SIQRYAVIPLSTNSGLIGWVPHCDTLHALIRDYREKKKILLNIEHRIMLRMAPDYDHLTL  
MQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMVGYILGLDRH  
PSNLMLDRLSGKILHIDFGDCFEVAMTREKFEKIPFRLTRMLTNAMEVTVGLDGNRYITC  
HTVMEVLREHKDSVMAVLEAFVYDPLLNRWLMNTKGNKRSRTRTDSYSAGQSVEILDG  
VELGEPAAKKTGTTPESIHSGFDGLVKPEALNKKAIQIINRVRDKLTGRDFSHDDTLD  
VPTQVELLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW

>sp|P35169|TOR1\_YEAST Serine/threonine-protein kinase TOR1 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TOR1 PE=1 SV=3  
MEPHEEQIWKSKLLKAANNMMDMDRNVPLAPNLNVNMMKMNASRNGDEFGLTSSRFQV  
VIGSNGDVNFKPILEKIFRELTSDYKEERKLASISLFDLLVSLEHELSEEFQAVSNDIN  
NKILELVHTKKTSTRVGAVLSIDTLISFYAYTERLPNETSRLAGYLRGLIPSNQVEMRL  
AAKTLGKLA VPGGTYTSDFVEFEIKSCLEWLTASTEKNSFSSSKPDHAKHAALLIITALA  
ENCPYLLYQYLNILDNIWRALRDPHLVIRIDASITLAKCLSTLRNRDPQLTSQWVQRLA  
TSCYEGFQVNTLECIHASLLVYKEILFLKDPFLNQVFDQMCLNCIAYENHKAKMIREKIY  
QIVPLLASFNPQLFAGKYLHQIMDNYLEILTAPANKIPHLKDDKPQILISIGDIAYEVG  
PDIAPYVKQILDYIEHDLQTKFKFRKKFENEIFYCIGRLAVPLGPVVGKLLNRNILDLMF  
KCPLSDYMQETFQILTERIPSLGPKINDELLNLVCSTLSGTPFIQPGSPMEIPFSRERA  
REWRNKNILQKTGESNDDNDIKIIIQAFRMLKNIKSRFSLVEFVRIVALSYIEHTDRV  
RKLAAALTSCEIYVKNICKQTSLSLNTVSEVLSKLLAITIADPLQDIRLEVLKLNLPFC  
DPQLAQPDNLRLLFTALHDESFNIQSVAMELVGRLSSVNPAYVIPSIRKILLELLTKLKF  
STSSREKEETASLLCTLRSSKDVAKPYIEPLLNVLKPKFQDTSSTVASTALRTIGELSV  
VGGEDMKIYKDLFPLIKTFQDQSNFKAALALGQLAASSGYVIDPLLDYPELLGI  
LVNILKTENSQNIRRQTVTLIGILGAIDPYRQKEREVTSTTDISTEQNAPPIDIALMQG  
MSPSNDEYYTTVVIHCLLKILKDPSSSYHTAVIQAIMHIFQTLGLKCVSFLDQIIPITIL  
DVMRTCSQSLLFQYFQQLCSLIIIVRQHIRPHVDSIFQAIKDFSSVAKLQITLVSVIEAI  
SKALEGEFKRLVPLTTLTFLVILENDKSSDKVLSRRVLRLLLESFGPNLEGYSHLITPKIV  
QMAEFTSGNLQRSIIITIGKLA KDVDLFEMSSRIVHSLLRVLSSTTSDELKSKVIMNTLSL  
LLIQMGTSFAIFIPVINEVLMKKHIQHTIYDDLNRILNNDVLPKILEANTTDYKPAEQ  
MEAADAGVAKLPINQSVLKSANSSQQRTEKEDWQEWKRLSIQLLKESPSHALRACSNLA

SMYYPLAKELFNTAFACVWTELYSQYQEDLIGSLCIALSSPLNPPEIHQTLLNLVEFMEH  
 DDKALPIPTQSLGEYAERCHAYAKALHYKEIKFIKEPENSTIESLISINNQLNQTDAAG  
 ILKHAQQHHSLOLKETWFEKLERWEDALHAYNEREKAGDTSVSVTLGKMRS LHALGEWEQ  
 LSQLAARKWKVSKLQTKKLIAPLAAGAAWGLGEWDMLEQYISVMKPKSPDKEFFDAILYL  
 HKNDYDNASKHILNARDLLVTEISALINESYNRAYSVIVRTQIITEFEEIIKYKQLPPNS  
 EKKLHYQNLWTKRLLGCQKNVDLWQVRVLRVRSLVIKPKQDLQIWIKFANLCRKSGRMRLA  
 NKALNMLLEGGNDPSLPNTFKAPPPVVYAQLKYIWATGAYKEALNHLIGFTSRLAHDGL  
 DPNNMIAQSVKLSASTAPYVEEYTKLLARCFLKQGEWRIATQPNWRNTNPDAILGSYLL  
 ATHFDKNWYKAHWNWALANFEVISMVQEETKLNNGKNDDDDDTAVNNDNVRIDGSIILGSG  
 SLTINGNRYPLELIQRHVPAIKGFFHSISLLETSCLODTLRLLTLLFNFGGIKEVVSQAM  
 YEGFNLMKIENWLEVLPLQISRIHQPDPTVSNLSLSDLGKAHPQALVYPLTVAIKSE  
 SVSRQKAALSIEKIRIHSPLVNQAELVSHELIRVAVLWHELWYEGLEDASRQFFVEHN  
 IEKMFSTLEPLHKHLGNEPQTLSEVSFQKSFGRDLNDAYEWLNYYKSKDINNQLNQA  
 WDIYYNVFRKITRQIPQLQTLDLQHVSPQLLATHDLELAVPGTYFPGKPTIRIAKFEPLFSVI  
 SSKQRPRKFCIKGSDGKDYKYLKGHEDIRQDSLVMQLFGLVNTLLKNDSECFKRHLDIQ  
 QYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTHFVLIHREHRDAKKIPLNIEHWVMLQMAPDYENLTLQK  
 IEVFTYALDNTKQDLYKILWLKSRSSSETWLERRTTYTRSLAVMSMTGYILGLGDRHPSN  
 LMLDRITGKVIHIDFGDCFEAAILREKYPEKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGSFRITCENV  
 MRVLRDNKESLMAILEAFALDPLIHWGFDLPPQKLTEQTGIPLPLINPSELLRKGAITVE  
 EAANMEAEQQNETKNARAMLVLRRITDKLTGNDIKRFNELDVPEQVDKLIQQATSIERLC  
 QHYIGWCPFW

>sp|P32600|TOR2\_YEAST Serine/threonine-protein kinase TOR2 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TOR2 PE=1 SV=3

MNKYINKYTTPPNLLSLRQRAEGKHRTRKKLTHKSHSHDEMSTTSNTDSNHNGPNDSGR  
 VITGSAGHIGKISFVDSLEDTTFFSTLNLIFDKLKS DVPQERASGANELSTTLTSLAREVS  
 AEQFQRFNSNLNKKIFELIHGFTSSEKIGGILAVDTLISFYLSSTEELPNQTSRLANYLRV  
 LIPSSDIEVMRLAANTLGRRLTVPGGTLTSDFVEFEVRTCIDWLTLTADNNSSSSKLEYRR  
 HAALLIIKALADNSPYLLYPVNSILDNIWVPLRDAKLIIRLDAVALGKCLTI IQDRDP  
 ALGKQWFQRLFQGCTHGLSLNTNDSVHATLLVFRELLSLKAPYLRDKYDDIYKSTMKYKE  
 YKFDVIRREVYAILPLLAAFDPAIFTKKYLDRIMVHYLRYLKNI DMNAANNSDKPFILVS  
 IGDIAFEVGVSSISPYMTLILDNI REGLRTRKFKVRKQFEKDLFYCIGKLCALGPAFAKHL  
 NKDLLNMLNCPMSDMQETLMLILNEKIPSESTVNSRI LNLLSISLSGKFIQSNQYDF  
 NNQFSIEKARKSRNQSFMKKTGESNDDITDAQILIQCFKMLQLIHHQYSLTEFVRLITIS  
 YIEHEDSSVRKLAALTSCDLFIKDDICKQTSVHALHSVSEVLSKLLMIAITDPVAEIRLE  
 ILQHLGNSFDPQLAQPDNLRLLFMALNDEIFGIQLEAIKIIGRLSSVNPAYVVP SLRKT  
 LLELLTQLKFSNMPKKKEESATLLCTLINSSDEVAKPYIDPILDVILPKCQDASSAVASTA  
 LKVLGELS VVGKEMTRYLKELMPLIINTFQDQSN SFKRDAALTTLGQLAASSGYVVGPL  
 LDYPELLGILINILKTENNPHIRRGTVRLIGILGALDPYKHREIEVTSNSKSSVEQNAPS  
 IDIALLMQGVSPSNDEYYPTVVIHNL MKILNDP SLSIHHTAAIQAIMHIFQNLGLRCVSF  
 LDQIIPGII LVMRSCPPSQLDFYFQQLGSLISIVKQHIRPHVEKIYGVIREFFPIIKLQI  
 TII SVIESISKALEGEFKRFVPETLTFFLDILENDQSNKRIVPIRILKSLVTFGP NLEDY  
 SHLIMPVVRMTEYSAGSLKKSISITLGR LAKNINLSEMSSRIVQALVRILNNGDRELTK  
 ATMNTLSLLLLQLGTD FVVFPVINKALLRNRIQHSVYDQLVNKLLNNECLPTNIFDKE  
 NEVPERKNEYEDEMQVTKLPVNQNILKNAWYCSQQKTEDWQEWIRRLSIQLLKESPSACL  
 RSCSSLSVSYPLARELFNASFSSCWVELQTSYQEDLIQALCKALSSSENPEIYQMLLN  
 LVEFMEHDDKPLPIPIHTLGKYAQKCHAFAKALHYKEVEFLEPKNSTIEALISINNQLH  
 QTDSAIGILKHAQQHNELQLKETWYEKLQRWEDALAAAYNEKEAAGEDSVEVMMGKLRSLY  
 ALGEWEELSKLASEKWTAKPEVKKAMAPLAAGAAWGLEQWDEIAQYTSVMKSPDKEF  
 YDAIILCLRNNFKAEVHIFNARDLLVTELSALVNESYNRAYNVVVRAQIIAELEEIIKY  
 KKL PQNSDKRLTMRETWNTRLLGCQKNIDVWQRILRVRSLVIKPKEDAQVRIKFANLCRK  
 SGRMALAKKVLNTLLEETDDPDHPNTAKASPPVVYAQLKYLWATGLQDEALKQLINFTSR  
 MAHDLGLDPNNMIAQSVPPQSKRVPRHVEDYTKLLARCFLKQGEWRVCLQPKWRLSNPDS  
 IILGSYLLATHFDNTWYKAHWNWALANFEVISMVQEETKLNNGKNDDDDDTAVNNDNVRIDGSI  
 ILGSGSLTINGNRYPLELIQRHVPAIKGFFHSISLLETSCLODTLRLLTLLFNFGGIKEVVSQAM  
 YEGFNLMKIENWLEVLPLQISRIHQPDPTVSNLSLSDLGKAHPQALVYPLTVAIKSE  
 SVSRQKAALSIEKIRIHSPLVNQAELVSHELIRVAVLWHELWYEGLEDASRQFFVEHN  
 IEKMFSTLEPLHKHLGNEPQTLSEVSFQKSFGRDLNDAYEWLNYYKSKDINNQLNQA  
 WDIYYNVFRKIGKQLPQLQTLLELQHVSPKLLSAHDLELAVPGTRASGGKPIVKISKFEPV  
 FSVISSKQRPRKFCIKGSDGKDYKYLKGHEDIRQDSLVMQLFGLVNTLLQNDACFRRH  
 LDIIQQYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTHFVLIHREHREAKKIPLNIEHWVMLQMAPDYDNL

LLQKVEVFTYALNNTTEGQDLYKVLWLKSRSETWLERRTTYTRSLAVMSMTGYILGLGDR  
 HPSNLMLDRITGKVIHIDFGDCFEAAILREKFPEKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGSFRIT  
 CENVMKVLRDNKGLSMAILEAFADFPLINWGFDLPTKKIEEETGIQLPVMNANELLSNGA  
 ITEEEVQRVENEHKNAIRNARAMLVLKRITDKLTGNDIRRFNDLDVPEQVDKLIQQATSV  
 ENLCQHYIGWCPFW

## 2. Serine/threonine-protein kinase atg1 (ULK1)

>tr|K1QJ91|K1QJ91\_CRAGI Serine/threonine-protein kinase atg1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10022785 PE=4 SV=1  
 MADNACEEDVRRMSMDELCEILDRENVDYSELEDVEEIRDVLVLSIAQRISPNNERHSQK  
 EATIDVMGRILERDAEMRKVIRDIYDSVLAMLDMKNFEKNLGSEMTKEYNGYIGTIFNSE  
 QKRAVVTDENGGKIYLLDDVTEETLSKYVCVDRSGENTQRYKTVDIYWPIPMLKEHATIVD  
 TPGVGESDEMTTKLLDYLSEAVAFIYVINTTNAGGVQDDRLVKIFKKQLELEQKGLLQQF  
 DPECAIFVCNKWDQVPDSEGEMVWKDISKKLQANWPTRRNIDITGQMFKMSVTKDLQRSK  
 AGLGYSEKFKALISGIDRLVRASLERRVKKHVDWLQSFLDRLLIKVIAKINASRKNQEEK  
 KAMKSEIEKRLKTECETEIINDNIAKIADVGMSKPKNLQGTITGTPVFMAPEVLEGRM  
 YGLSADIFSLSIMMWMWYGRRVFSESYSVDMVTYSSIKSIDLNIFFEVQGTAYDILLP  
 EANGRGQ

>sp|O75385|ULK1\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase ULK1 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ULK1 PE=1 SV=2  
 MEPGRGGTETVGKFEFSRKDLIGHGAFVAVFKGRHREKHDLEVAVKCIKKNLAKSQTLGKEIKILKELKHENI  
 VALYDFQEMANSVYLVMEYCNGGDLADYLHAMRTLSEDTIRLFLQQIAGAMRLLHSGKIIHRDLKPQNILLSNPA  
 GRRANPNSIRVKIADFGFARYLQSNMMAATLCGSPMYMAPEVIMSQHYDQKADLWSIGTIVYQCLTGKAPFQASS  
 PQDLRLFYEKNKTLVPTIPRETSAPLRQLLLALLQRNHKDRMDFFEFFHHPFLDASPSVRKSPFPVPSYSSGS  
 GSSSSSSSTSHLASPPSLGEMQQLQKTLASPADTAGFLHSSRDSGGSKDSSCDTDDFVMVPAQFPDGLVAEAPSA  
 KPPPDSLMCSGSSSLVASAGLESHGRTPSPSPCCSSPSPSGRAGPFSSRCGASVPIPVPTQVQNYQRIERNLQS  
 PTQFQTPRSSAIRRSGSTSPPLGFARASPSPPAAHAHGGVLRKMSLGGGRPYTPSPQVGTIPERPGWSGTPSPQG  
 AEMRGGRSRPPGSSAPEHSPRTSGLGCRLLHSAPNLSDLHVVRPKLPKPPTDPLGAVFSPPQASPPQPSHGLQSCR  
 NLRGSPKLPDFLQRNPLPPIILGSPTKAVPSFDFPKTPSSQNLALLARQGVVMTFPRNRRLPDLSEVGPFHGQPL  
 GPGLRPGEDPKGPFGRSFTSRLTDLKAAFGTQAPDPGSTESLQEKPMIAPSAGFGGSLHPGARAGGTSSPS  
 PVVFTVGSPPSGSTPPQGPRTMFSAGPTGSASSARHLVPGPCSEAPAPELPAPGHGCSFADPITANLEGAVTF  
 EAPDLPEETLMEQEHEILRGLRFTLLFVQHVLEIAALKGSASEAAGGPEYQLQESVVADQISLLSREWGFAEQL  
 VLYLKVAEALLSSGLQSAIDQIRAGKLCSSSTVKQVVRRLNELYKASVVSCQGLSLRLQRFFLDKQRLLDRIHSIT  
 AERLIFSHAVQMVQSAALDEMFOHREGCVPRYHKALLLLEGLQHMLSDQADIENVTKCKLCIERRLSALLTGICA

>sp|P53104|ATG1\_YEAST Serine/threonine-protein kinase ATG1 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG1 PE=1 SV=1  
 MGDIKNKDHTTSVNHNLMSAGNYTAEKEIGKGSFATVYRGHLTSDKSQHVAIKEVSRK  
 LKNKKLLENLEIEIAILKIKPHIVGLIDCERTSTDFYLIMEYCALGDLTFLKRRKEL  
 MENHPLLRTVFEKYPSPSENHNLHRAFLVLSYLOQLASALKFLRSKNLVHRDIKPQNLLL  
 STPLIGYHDSKSFHELGFVGIYNLPILKIADFGFARFLPNTSLAETLCGSPLYMAPEILN  
 YQYNAKADLWSVGTVPFEMCCGTPPFRASNHLELFKKIKRANDVITFPSCNIEPELKE  
 LICSLTTFDPAQRIGFEEFFANKVVNEDLSSYELEDDLPELESKSKGIVESNMVSEYLS  
 KQPKSPNSNLAGHQSMADNPAELSDALKNSNILTAPAVKTDHTQAVDKKASNKYHNSLV  
 SDRSFEREYVVVEKKSVEVNSLADEVAQAGFNPNPKHPTSTQONQNVLLNEQFSPNNQQY  
 FQNQGENPRLLRATSSSSGGSDGSRPRLVDRRLSISLNPNSNALSALGIASRLFGGA  
 NQQQQQQQITSSPPYSQTLNLSQLFHELTENIILRIDHLQHPETLKLNTNIVSILES  
 AKAFVVYSYAEVKFSQIVPLSTTLKGMANFENRRSMDSNIAEEOQSDDAEEDETLKKY  
 KEDCLSTKTFGKGRTLSATSQLSATFNKLPSEMILLCNEAIVLYMKALSILSKSMQVTS  
 NWWYESQEKSCSLRVNVLVQWLREKFNECLEKADFLRLKINDLRFKHASEVAENQTL  
 GSEEPVYLEKLLYDRALEISKMAAHMELKGENLYNCELAYATSLWMLLETSLDDDDFTNA  
 YGDYPFKTNHILKSNVEDKEKYHSVLDENDRIIRKYIDSIANRLKILRQKMNHQN

## 3. Serine/threonine-protein kinase ULK2 (ULK2)

>tr|K1PNL8|K1PNL8\_CRAGI Serine/threonine-protein kinase ULK2 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10015287 PE=4 SV=1  
 MEVVGDIYEYSKKDLIGHGAFVVFVKGRHRKRPNHVVAIKSITKKNLAKSQNLLSKEIKIL  
 KELSDLHHENVALLDCKETTNNHVYLVMEYCNCGDLADYLQAKGTLSEDTIASFLRQIAA  
 AMQVMNGKGVHRDLKPQNILLCHDGGKPNTPSTEMRLKIADFGFARFLNDGVMAATLCGS  
 PMYMAPEVIMSLQYCAKADLWSIGTIVFQCLTGKAPFQAQTPQQLKHFYEKHAELKPNIP  
 KDTSPELRDLKMLKRNADRIEFASPVVPGRASQGCSSSPTPPRCVVSASPLSGKAD  
 YSTPPSKVVQMVKQQEVAEAMQGSTHDEEFLKVDKGPTRSNSTPEHDFVLVDPGMSDQS  
 DGSDKGRAPSTEDLQSLGERAQPQVVRVEPQVGSVAYKKDSGDVSSPSRPSLPMQSNQ  
 SEPIPVPTQVKAYERIRSSSSPLSSPRKCGTEPSPLDSAKLSSQNIKISPPQESKFSAPD  
 IGSFSPPTVKFSVGTTPNVSTPWRRGSIGSSQGGAIYHPPSNASNSPSRRASMGSSPSGF  
 NRRNFSSPGSLPTILDASPHFELNQEPQFTDNMPTVPVRAFPFGQSKPAIPESKGTKRYHP  
 SEVDRVKNLNMERCNTDPAAGGMSMLSQOMKVAYMNQOGLNLLLEGQVVRYTSNENLVSP  
 NDNTVQMDTQRSGLRRTMSATTPPSNLMFAQSPNMEGPVAFVAPGLAEETLMGDNHN  
 EIMAKLSFVNDLADCVMEELAMAKGAPLNTLSESVNWKQEGEPLHGDQMPKFIQAQRLLQ  
 LVLYVRSLLQSSSLVLAARREIKDERLQISNALKTLLKQMNERYHRCVSVCKHIQORLGI  
 TMQNALTPQVVIATADKLIYNYAIEMCQTAALDELFGNPECFKRYNTAHILLHSLSQQA  
 RNSNDKQLLDKYKDAVERRLSHIQATQNYYPQFEIS

>sp|Q8IYT8|ULK2\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase ULK2 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ULK2 PE=1 SV=3  
 MEVVGDFEYSKRDLVGHGAFVFRGRHRQKTDEVAIKSINKKNLSKSQLLLGKEIKIL  
 KELQHENIVALYDVQELPNSVFLVMEYCNCGDLADYLQAKGTLSEDTIRVFLHQIAAAMR  
 ILHSGKGIHRDLKPQNILLSYANRRKSSVSGIRIKIADFGFARYLHSNMMAATLCGSPMY  
 MAPEVIMSQHYDAKADLWSIGTVIYQCLVGGKPPFQANSQDLRMFYEKNRSLMPSIPRET  
 SPYLANLLGLLQRNQKDRMDFEAFSSHFFLEQGPVKKSCVPVPMYSGSVSGSSCGSSP  
 SCRFASPPSLPDMQHIQEENLSSPPLGPPNYLQVSKDSASTSSKNSSCDTDDFVLVPHNI  
 SSDHSCDMPVGTAGRRASNEFLVCGGQCQPTVSPHSETAPIPVPTQIRNYQRIEQNLST  
 ASSGTNVHGSPPSAVRRSNTSPMGFLRPGSCSPVPADTAQTVGRRLSTGSSRPYSPSPL  
 VGTIPEQFSQCCCGHPQGHDSRSRNSGSPVQAQSPQSLLSGARLQSAPTLTDIYQNKQ  
 KLRKQHSDPVPCPSHTGAGYSYSPQPSRPGSLGTSPTKHLGSSPRSSDWFFKTPPLPTIIGS  
 PTKTTAPFKIPKTQASSNLLALVTRHGPAEEQSKDGNPRECAHCLLVQGSERQRAEQQS  
 KAVFGRSVSTGKLSDQGGKTPICRHQGSTDSLNTERPMDIAPAGACGGVLAPPAGTAASS  
 KAVLFTVGSPPHSAAPTCTHMFRLRTRTTSVGPSNSGGSLCAMSGRVVCVGSPPGPGFGSS  
 PPGAEAAPSLRYVYPGASPPSLEGLITFEAPELPEETLMEREHTDTLRHLNVMLMFTCEV  
 LDLTAMRGGNPELCTSAVSLYQIQESVVVDQISQLSKDWGRVEQLVLYMKAAQLLAASLH  
 LAKAQIKSGKLSPTAVKQVVKNLNERYKFCITMCKKLTAKLNRFSDKQRFIDEINSVT  
 AEKLIYNCAVEMVQSAALDEMFOQTEDIVYRYHKAALLLEGLSRILQDPADIENVHXYKC  
 SIERRLSALCHSTATV

#### 4. serine/threonine-protein kinase ULK3 (ULK3)

>XP\_011415026.1 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase ULK3  
 [**Crassostrea gigas**]  
 MSRPTSGRPSTAKSVAVIVPKLSGFVFTEKLGSGTYAVVYKAYRKSGSRQVVAIKCVLKSSSLNKASTENL  
 LTEIEILLKKNHENIVRLEDQWDDQYIYLIMEYCSGGDLNFIKSKRTLPEINILKRFLQQAAMRYLR  
 EFNIAHMDLKPQNILLTSEYNPTLKIADFGFSKHLFKGDELHAMRGSPLYMAPEIICKGTYDSRVDLWSI  
 GVIIYECLFGRAPFASRTFKELENKIWDSKPVIEIPYGVNVSENCRDILRLLRRDPDERITTFDEFFNHFP  
 VDLEHCASNESLSKAVNIVANAVKQDQNGEYKEAIKLYCDSLGHFMPAIHYEKDERKKEAIRAKVKDYMN  
 RAEELKMLKPKRPPPPVNGVKRTISEDPMEELELCKDNEELTAAVTLIRAADTENSQEDYEQALKHYE  
 LALSTFIKFLKEEKPGRKDLIGKLSRSWMDEAEKIKMFLDVQNLQTEDTSAKEEENEKKYLYTEKCGIQ

>sp|Q6PHR2|ULK3\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase ULK3 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ULK3 PE=1 SV=2  
 MAGPGWGPPRLDGFILTERLGSQTYATVYKAYAKDTRVVVAIKCVAKKSLNKASVENLL  
 TEIEILKGIHHPHIVQLKDFQWSDNIYLIMEFCAGGDLRFIHTRRILPEKVARVFMQQ  
 LASALQFLHERNISHLDLKPQNILLSLEKPHLKLADFGFAQHMSWPWEKHLVLRGSPLYM  
 APEMVCQRQYDARVDLWSMGVILYEALFGQPPFASRSFSELEEKIRSNRVIELPLRPLLS  
 RDCRDLQLRLLERDPSRRI SFQDFFAHPVVDLEHMPSGESLGRATALVVQAVKQDQEGDS  
 AAALSLYCKALDFFVPALHYEVDARKEAIKAKVGVYVSRAEELKAIVSSSNQALLRQGT



SARDLLREMARKPRLAALVASAAMAKEEAAGGEQDALDLYQHSLGELLLLLLAAEPPG  
RRRELLHTEVQNLMARAEYLKEQVKMRESRWEADTLDKGLSESVRSSCTLQ

## 5. Serine/threonine-protein kinase ULK4 (ULK4)

>tr|K1QQA6|K1QQA6\_CRAGI Serine/threonine-protein kinase ULK4 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10017902 PE=4 SV=1

MENFVLYEELGRGDNIIYKGRRKGTINFAIHCIEKCRPEVTNTVVRMTHDISHPNVVK  
FYEWYETS NHLWLVLVVELCTGGSLATLITQDRNLPESIRSFGIDLVTGIHYIHSGLILFC  
DLRPTKILLDGSGLTKYADFGLSRVEGEILEELFEKPADAGEMWSNEADLDDNPLSKKYK  
TTGAPTYMSPPEGFQSQEITILSDLWSLGCVLVEMFTGHPPFLAESFQQLKEKILHKELPP  
PKVKGSRFSSKPSPDFHNLLEGLLQKDPDKRMGWPGLVNHSFWQGRSLHLAKDLVTSQEV  
RSSIVNTTRSSVLVEGTASALGRIKTVDLKKSMDRVPVSTLETEGTRPGSTMGDYMRPKTA  
PGNEGGSTLFTLSTRPPTAVPPDEKLAPTQKPTQSPLSTREVRETIGTTGGESQADETKN  
EAELELIYHHSDFHITPIVDNTKIQKPGAAKFDAKILPVPFPTAEKMANMSEKELSKHIKA  
IIDGLSINEKGPSPQKRIHLLHYLTGLSTNPQVATALTRNNVLSVLAKVVKETQHLDVKT  
KAARVVGLIAGNAEDLDESVTISESIATLTEVIRENVKNGKLGQVLPVAVGELLYFVAQQ  
EVKHGKTCNDNSVTSMTYTVITRCCREGEDAVVNHIAAKTVENVVATQSTHAQKQFVSNEM  
GQSLWYIFKHSTVDSLRI TALNLCRITHHNPTVFQSVIDTVGMTTILSALSFGITRIQQ  
SIVTMFGALIASGQSLNRVVDKDFLQKLIIRLLDPSVIVIRAKAFVVIHEVVKNNYDLLL  
NSCQSRLVMIERDSRRQTPREGKAPENNGSESVEYLMQCLDLLINHMVDVVPRLFKIIV  
TSLDAVMGRKHPNAVQAKQLRSSLPLIHVFLHLVTSQVFRPKIVNEEFIKNLSSVLSHIK  
SIELGETNIEGASGISPSDFVTTTMSVLEGISQHPMIVAAYHQVILESVLPIIADLVVS  
QNGETRALSRLRFSEIASVYLNQEYAAAGEKKMNVAAGLHKIITERLLPQFEQIILLDQEPL  
PSYGLKLLLTLLDQNGGFVKQFEQQGLVSVIFQVMMDHQSNPLNSSMQSIAGILNCLVAH  
KDTNMKDLYEQGLIDYFTTLLFFDVTTACLDTEDHADNKIAHSMLQNLDDTLHSMFKYVSE  
VVRKALQNKKAGGEGGNREAEAEQLLLTKNSLTDLTTILTQLLQCFEDTDIQDFSTKCLS  
LLVQLFGGENKDSMTPENMEYYSKALKKSDAKKQKVLLRIKRLLS TERVHVESMKQHGE  
TLANTIRNLVQTASSHADVAISSLAADILKMTVPQYYSKALKKADAKKQKVLLRIKRL  
LSTERVHVESMKQHGETLANTIRNLVQTASSHADVAISSLAADILKMTDIVLPGMEAFM  
ADQNDIRVKNQDFVGCYMDQEPRTLNEKMTVSTTMTVDSCRKTCTDLKFKYYGVEYSAQC  
FCGNQPLNVRKMRREGDCLKPCAGDRTQACGGSWRIAVYENPQNI PKFVGCYMDQQARTLN  
EKMTVSTTMTVDSCRKTCTDLKFKYYGVEYSSQCFGNQLMNVRKMRREGDCLKPCDGDRT  
QACGGNWRIVAVYENPLYIPKFVGCYVDQTYRTLGEKMTVSTTMTVDSCRKTCTDLKFKYY  
GVEYSSQCFGCYDLIHAIKVSEEDCLRPCSGDRTQACGGSWRIAVYENPRYISREYEEEN  
NVEFVGCYVDQARTLNGKMTTSTTMTVYNCRKCTCTDLKFMFYGVEVKKAGRKGGNQKAE  
HMFPTKSLTDMTTILTSWELLFEECFCGNKLTITTKMRDGDCLKPCCTGDKTQACGGDWRI  
AVYENPYITPPKFVGCYMDQARTLNEKKTSTTMTVDSCRKTCTDLKFKYYGVEVNICR  
ICWLLHGSTSQNLERKDDCLYNNDGQLPKNVYGVSEV

>sp|Q96C45|ULK4\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase ULK4 OS=**Homo sapiens**  
OX=9606 GN=ULK4 PE=1 SV=2

MENFILYEEIIGRSKTVVYKGRRKGTINFAVAILCTDKCRPEITNWVRLTREIKHKNIVT  
FHEWYETS NHLWLVLVVELCTGGSLKTVIAQDENLPEDVVREFGIDLISGLHHLHLKLGILFC  
DISPRKILLEGPGTLKFSNFCLAKVEGENLEEFFALVAEEGGGDNGENVLKKSMSKSRVK  
GSPVYTAPEVVRGADFSISSDLWSLGCCLLYEMFSGKPPFFSESISELTEKILCEDPLPPI  
PKDSSRPKASSDFINLLDGLLQRPQKRLTWTRLLQHSFWKKA FAGADQESSVEDLSLSR  
NTMECSGPQDSKELLQNSQSRQAKGHKSGQPLGHSFRLENPTEFRPKSTLEGQLNESMFL  
LSSRPTPRTSTAVEVSPGEDMTHCSPQKTSPLTKITSGHLSQQDLESQMRELIYTDSDLV  
VTPIIDNPKIMKQPPVKFDAKILHLPTYSVDKLLFLKQDQDWNDFLQQVCSQIDSTEKSMG  
ASRAKLNLLCYLCVAVAGHQEVATRLLHSPLFQLLIQHLRIAPNWDIRAKVAHVIGLLASH  
TAELEQENTPVVEAIVLLELIRENFRNSKLGQCLLPTLGEIYLVATQEEKKNPRECWA  
VPLAAYTVLMRCLREGEERVVNHMAAKI IENVCTTFAQSQGFITGEIGPILWYLF RHST  
ADSLRITAVSALCRITRHSPTAFQNVIEKVLNSVINSLASAI CKVQYMLTLFAAMLSC  
GIHLQRLIQEKGFVSTIIRLLDSPSTCIRAKAFLVLLYILYINREMLLLSCQARLVMIYIE  
RDSRKTTPGKEQQSGNEYSKCLDLLICHIVQELPRILGDI LNSLANVSGRKHPS TVQVK  
QLKLCPLMPVVLHLVTSQVFRPQVVTEEFVLSYGTILSHIKSVDSGETNIDGAIGLTAS  
EEFIKITLSAFEAAIQYPILLKDYRSTVVVDYILPPLVSLVQSQNVEWRFLSLRLLSETTS  
LLVNQEFVGDGKEKASVDSNLLALIRDVLLPQYEHILLEPDPVPAYALKLLVAMTEHNP  
TFTRLVEESKLIPLIFEVTLHQESILGNTMQSVIALLSNLVACKDSNMELLYEQGLVSH

ICNLLTETATLCLDVDNKNNNEMAAPLLFSLLDILHSMLTYTSGIVRLALQAQKSGSGED  
 PQAAEDLLLLNRPLTDLISLLIPLLPNEDPEIFDVSSKCLSILVQLYGGENPDSLSPENV  
 EIFAHLTSTKEDPKQKLLLRILRRMITSNEKHLESLSKNAGSLLRALERLAPGSGSFADS  
 AVAPLALEILQAVGH

## 6. Autophagy-related protein 13 (ATG13)

>tr|K1QIF8|K1QIF8\_CRAGI Autophagy-related protein 13 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10016010 PE=3 SV=1  
 MSKLSQQDRKDLEKFTKFLIYKSLQIIVQSRLGEKIQAKSKPFSSGADWFNLAIKDIVEV  
 HNETKKALVSQTALLSQNVCEISLKTSEGDSMVLETWYIGLNKETCDVNARISYTVYNR  
 MGIALKTLFSISRVTTPAYKLSRQOGANADEYVICYRFYQGDPOFQFMLGDNQYTIKVGSV  
 TPVGTIYINLAYRTKLLITPQKSCAIPIEVKDDHFKKDNSPRRPTTPKPCSLGFRNST  
 SEDLFGDGVGDQDLCTSTTFDNSPGEAFLGGMTOHGLVPPNIQOKTALKTDNRENNEAPKK  
 QENVEKQLSFTSYQKVGAFQAQRNSKEINNTDLEDVPPFLNLLQAEGKSEVKMTVQRELQN  
 DIESNEQVSSNKSEEEKSLEQALSPSESISSNTSAPDDFVMVELKTPFAGADPNQDLGKF  
 YRECQGAPQLTMCSETNVTALAEISSQIQMFESNIEGFDDFVTSITESVTVE

>sp|075143|ATG13\_HUMAN Autophagy-related protein 13 OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG13 PE=1 SV=1  
 METDLNSQDRKDLDFIKFFALKTVQVIVQARLGEKICTRSSSSPTGSDWFNLAIKDIPE  
 VTAEAKKALAGQLPAVGRSMCVEISLKTSEGDSMELEIWCLEMNEKCDKEIKVSYTVYNR  
 LLLLLKSLLAITRVTPAYRLSRKQGHYVILYRIYFGEVQLSGLGEGFQTVRVGTGTPV  
 GTITLSCAYRINLAFMSTRQFERTPPIMGIIIDHFVDRPYPSSSPMHPCNYRTAGEDTGV  
 IYPSVEDSQEVCTTSFSTSPPSQLSSSRLSYQPAALGVGSADLAYPVPVFAAGLNATHPHQ  
 LMVPGKEGGVPLAPNQFVHGTQADQERLATCTPSDRTHCAATPSSSEDTETVSNSSSEGRA  
 SPHDVLETIFVRKVGAFVKNP INQVTLTSLDIPFAMFAPKNLELEDTDPMVNPPDSPETE  
 SPLQGSLSHSDGSSGSSGNTHDDFVMIDFKPAFSKDDILPMDLGTFFYREFQNPPLSSLS  
 IDIGAQSMAEDLDSLPEKLAVHEKNVREFDAFVETLQ

>sp|Q06628|ATG13\_YEAST Autophagy-related protein 13 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG13 PE=1 SV=1  
 MVAEEDIEKQVLQLIDSFLLKTTLLICSTESSRYQSSTENIFLFDFTWFEDHSELVSELP  
 EIISKWSHYDGRKELPPLVVETYLDLRQLNSSLVRLKDHEGHLWNVCKGTTKQEIWMER  
 WLIELDNSSPTFKSYSEDETVDNELSKQLVLLFRYLLTLIQLLPTTELYQLLIKSYNGPQ  
 NEGSSNPITSTGPLVSIRTCVLDGSKPILSKGRIGLSKPIINTYSNALNESNLPAHLDQK  
 KITPVWTKFGLLRVSVSYRRDWKFEINNTNDELFSARHASVSHNSQGPQNQPEQEGQSDQ  
 DIGKRQPQFQQQQPQQQQQQQQQQRQHVVQTOQQRQIPDRRSLSLSPCTRANSFEPQS  
 WQKKVYPISRPVQPFKVGSGSASARNPSNSSFFNQPPVHRPSMSSNYGPMNIEGTSV  
 GSTSKYSSSFGNIRRHSSVKTTEAENKAVKSKAVKSPSQEDLMDLVKLLLEEKPDITI  
 KKTSGNNPPNINISDSLIRYQNLKPSNDLLEDLSVLSMDPNHTYHRGRSDSHSPLPSI  
 SPSMHYGSLNSRMSQGANASHLIARGGNSSTSALNSRRNSLDKSSNKQGMGLPPIFGG  
 ESTSYHHDNKIQKYNQLGVEEDDDENDRLLNQMGNSATKFKSSISPRSIDSISSSFIKS  
 RIPIRQPHYHSQPTTAPFQAQAKFHKPANKLIDNGNRNSNSNNNNHNGNDAVGMHNDEDD  
 QDDDLVFFMSDMNLSKEG

## 7. RB1-inducible coiled-coil protein 1

>tr|K1QSI9|K1QSI9\_CRAGI RB1-inducible coiled-coil protein 1 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10019938 PE=4 SV=1  
 MELKLMKSLTVSQALIELKRKHEKEISEMISKLEKEKSDSLTAIHNSLQAEKQVAFNEA  
 VTKLSQDKDKVIEDLRAKEKDLLEQLSTDQETILKLNEEKSKLEDIKTRAMSHLSDKERE  
 YNAARRQLEDDLALTRQQLSQYQSQQLQAMSTISVPSVMEISQIEDSSRIASLEDELKSKS  
 EKIAELQKMMIEISMTTSTRHIAEDKVSITSCNVGDALFCLDDRHDQYVVFTIGSTLHF  
 LHTDCQDTLGLKPNPGETKKSWSVLAEITEKEYCQAKKPQNRFKVPVGTGFYRVKAKPWRP  
 ESGARGTSSTAST

>sp|Q8TDY2|RBCC1\_HUMAN RB1-inducible coiled-coil protein 1 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=RB1CC1 PE=1 SV=3

MKLYVFLVNTGTTTLTFDELTQTVADLKHAIQSKYKIAIQHQVLVNVNGGECMAADRRVC  
TYSAGTDTNPIFLFNKEMILCDRPPAIPKTTTFSTENDMEIKVEESLMPPAVFHTVASRTQ  
LALEMYEVAKKLCSCFCEGLVHDEHLQHGWAAIMANLEDCSNSYQKLLFKFESIYSNYLQ  
SIEDIKLKLTHLGTAVSVMAKIPLLECLTRHSYRECLGRDLSLPEHEDESEKAEMKRSTEL  
VLSPPMPTTNESSLTSFPKSVEHVSPDTADAESGKEIRESCQSTVHQDETTIDTKDGD  
LPFFNVSLLDWINVQDRPNVDSLVRKCFDSMSRLDPRIIRPFIAECRQTI AKLDNQNMMK  
AIKGLEDRLYALDQMIASCGRLVNEQKELAQGFLANQKRAENLKDASVLPDLCLSHANQL  
MIMLQNHRKLLDIKQKCTTAKQELANNLHVRLKWCCFVMLHADQDGEKQLALLRLVIELL  
ERVKIVEALSTVPQMYCLAVEVVRKMFIKHYREWAGALVKDGKRLYEAEKSKRESFGK  
LFRKSFLRNRLFRGLDSWPPSFCTQKPRKFDCELPDISLKDQLQSFQPCSEVQPFLLRVP  
LLCDFEPLHQHVLALHNLVKAQSLDEMSQITDILLSEQKASVSQTSPPQSASSPRMESTA  
GITTTTSPRTPPPLTVQDPLCPAVCPLEELSPDSIDAHTFDFETIPHPNIEQTIHQVSLD  
LDSLAESPESDFMSAVNEFVIEENLSSPNPISDPQSPPEMMVESLYSSVINAI DSRRMQDT  
NVCGKEDFGDHTSLNVQLERCVRVAQDSHFSIQTIKEDLCHFRTFVQKEQCDFSNLKTCT  
AVEIRNIIIEKVCSLEITLKEKHQKELLSLKNEYEGKLDGLIKETEENENKIKKLGKGLV  
CLEEVLQNKDNEFALVKHEKEAVICLQNEKDKLLEMEMENIMHSQNCIEKELKQSREIVLE  
DLKLLHVENDEKQLLRAELQSLEQSHLKELEDTLQVRHIQEFQKVMTDHRVSLLEELKKE  
NQQIINQIQESHAEEIQEKEKQLQELKLVSDLSDRCKLEVELALKEAETDEIKILLEE  
SRAQQKETLKSLEQETENLRTEISKLNQKIQDNNENYQVGLAELRTLMTIEKDQCISEL  
ISRHEEESNILKAELENKVTSLHNQAFEIEKNLKEQIIEQLSKLDSSELSALERQKDEKITQ  
QEEKYEAIQONLEKDRQKLVSSQEQDREQLIQKLNCEKDEAIQTALKEFKLEREVVEKEL  
LEKVKHLENQIAKSPAIDSTRGDSSSLVAELQEKLEEKAKFLEQLEEQEKRNKNEEMQNV  
RTSLIAEQQTNFNTVLTREKMRKENIINDLSDKLKSTMQQQERDKDLIESLSEDRARLLE  
EKKLEEEVSKLRSSSFVPSPYVATAPELYGACAPELPGESDRSAVETADEGRVDSAMET  
SMMSVQENIHMLSEEKQRIMLLERTLQLKEEENKRLNQLRMSQSMSSVSRHSEKIAIRD  
FQVGDVLVLIILDERHDNYVLFVTSPTLYFLHSESLPALDLKPGEGASGASRRPWVLGKVM  
EKEYCQAKKAQNRFKVPLGTFYRVKAVSWNKKV

>sp|Q12527|ATG11\_YEAST Autophagy-related protein 11 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG11 PE=1 SV=1  
MADADEYSTAPTQOEITPLQTTATIINAISGECITTNVDFVSLDKFKQFIARKWKIPPD  
QLLILLPYGNKPKSPMFKELLINRSFTLNDFFVYDRRLFSLVSKPTPTNLLTSKDSNPMN  
SPNSNDLTETLEYLIKNSHISQYQGSDTIMIKPMPSPLEDADVDLSRLNYHSVTSLLTTN  
LGWLSALEIDVHYFKSLIPDIIAHIKRIFDGLTVC SQYLKLYCFDVESLYNSNVQFLNQL  
VDNGMTSKWEKCFNDTLSKLTALLEGDSLQKFINIESLLENEKSVKILNHSINGKLNKIKR  
EIDENASFRDIITVNI DRLRQMFTPNESKFELEDQMAESFEVLVSEMRTRSRLNVDKEEEE  
EFNSQEFLLKSMNVMLEKDKKESVKTLFTISQALYSQIGELIDLKKSLLQKHAVAILGNIAF  
TQMEILGIKRLLNNECNKDLELYKKYEVEFAQVEDLPLIYGLYLIIEKYRRLSWFQQILSF  
ISNFNQDLELFKQNELRTRNKWVKNFGSIATVFCEDLLSSSDFKRLNEYHSHTSPPNEDE  
EDENENSIANYRQDLVKVSAIDNMYTQIKETDVSEPIIDLKSKTLFETKRFHIIYSNFK  
NNNNNSNGNSISPEGSIALKSDDVVKGYKTRIKKLESLLHEFQYSDIGHWPQGVNLTHL  
KPFGRSATSINKKFLGASVLEPANISEVNI DSVSQANNHQIQELESNVDDLHQLQLL  
KEENNRKSMQISEMGKKSIDLEVEKTAYRETLTNLNQELARLTNEEQSHRTEIFTLNASF  
KKQLNDIISQDNEKIEKLTGDYDDVSKSRERLQMDLDESNNKHEQEVNLLKADIERLGKQ  
IVTSEKSYAETNSSSMEKGEKFETIPLAEDPGRENQISAYTQTLQDRIFDIISTNIFILE  
NIGLLLTFDNNNNIQIRRVKGLKKGTAQSNILDESTQMLDAHDNSLIKSPVFQKLDKDEYE  
LIKSVANGSEKDTQQSIFLGNITQLYDNKLYEVAVIRRFKDIETLAKKLTKENKIKRLL  
ERFQREKVTLRNFQIGDLALFLPTRENVNSVSGSMSSTSSLSSSFSVVDLSTPPPLDAMS  
IQSSPSVIHSNVINQASISGRDKNKLMRPWAAFTAFAEESTRYFLKDEKGLTKGKEWVGR  
IVTLEHFVADSPSNPFRLPKGSVWFQVTAVVVSYQGV

## 8. Autophagy-related protein 101 (ATG101)

>XP\_011447317.1 PREDICTED: autophagy-related protein 101 [**Crassostrea gigas**]  
MNARSQVFELSVEGRQIEETVSSIFHTLLLQRTVGKHFHYKQEGTYSIGTVGVEDVDCDFVDFTYVRVSD  
TLDHMIKKDIALFRDTRLRSMNPGSGQISLEFYQKKRGRWPFPEPICPWEVWTVKLDILTLNNESESRQIC  
REKLGEMLGERVITIA DLMNRHDYVPKMPNQTELDLIFDTS LDPVQPYLFRISHQTTGPSQSSVGTMRK  
FIKDTLAL

>sp|Q9BSB4|ATGA1\_HUMAN Autophagy-related protein 101 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ATG101 PE=1 SV=1  
 MNCRSEVLEVSVEGRQVEEAMLAVLHTVLLHRSTGKFHYKKEGTYSIGTVGTQDQVDCDFI  
 DFTYVRSSEELDRALRKVVGEFKDALRNSGGDGLGQMSLEFYQKKSRWPFSDCEIPWE  
 VWTVKVHVVALATEQERQICREKVGEKLCCEKIINIVEVMNRHEYLPKMPTQSEVDNVFDT  
 GLRDVQPYLYKISFQITDALGTSVTTTMRRLIKDTLAL

### 9. Zinc finger FYVE domain-containing protein 1 (DFCP 1)

>EKC37743.1 Zinc finger FYVE domain-containing protein 1 [**Crassostrea gigas**]  
 MNSFSSAQSDHSQHSSIPDICLSAGNEMSSLEAQLAESIIDLNDPYDNIGDEDEFIKKLDSCSNEHVKV  
 SIFGNTGDGKSFTLNHTFFGGKEVFKTSSHQSSCTVGVWAAFDPEKVIIVIDTEGLLGITSNQNRMLL  
 LKILGISDIIYRTRAERLHNDMYQFLCESSAYTKHFSDELEATAKRCNKGVDLTPAVIIFQETVNTN  
 VLGSSGTDSAEKFIWNTFRQLECPMHFKDLTYVGIRTGRPPTDFTQFQRTMSQHLQDKSNRAARQPAIVY  
 KTLKLNLDKFNGEVEKPLYGTFFDQLFSCSMKCLSCGEGCTRSMNHDTDSKAHETDKRCKYQHOFENKVF  
 LCKSCYLSGKEHVVIKPTSESRDSAWGLIKYVWAGEVLECPSCGVIFRSRQNWYGNKEVEEIVHTEIRH  
 VWPDGYKMLQGTNNAARKVIDGFHYIADSITSVGSKPTKMI SDWMNDRIAPEYWVPNSQISHCHQCSKEL  
 ETEQKHHCRACGKGFCDCCSSSHRRRVPERGWGEMEVVRCDKCYGGKMSDSNDSTGSNSQVTARKVGEVV  
 TSAISVAATLNYPIDMIKDTARPGYWTPDEQIKACYVCEELFGPKLRIHHCACGQGVCECSCSPNKRFP  
 PLRGWDYVPRICRKCINKPDLR

>sp|Q9HBF4|ZFYV1\_HUMAN Zinc finger FYVE domain-containing protein 1 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ZFYVE1 PE=1 SV=1  
 MSAQTSPAEGKLNPLMCQESYACSGTDEAIFECDECCSLQCLRCEEELHRQERLRNHER  
 IRLKPGHVPCDLCKGLSGHLPGRVQRAIVRCQTCKINLCLCQKRTTHSGGNKRRHPVTV  
 YNVSNLQESLEAEEMDEETKRKKMTEKVVSFLLVDENEEIQVTNEEDFIRKLDCKPDQHL  
 KVVSI FGNTGDGKSHTLNHTFFYGREVFKTSPTQESCTVGVWAAAYDPVHKVAVIDTEGLL  
 GATVNLQSRTRLLLVLAISDLVIYRTHADRLHNDLFKFLGDASEAYLKHFTKELKATTA  
 RCGLDVPLSTLGPAVIIFHETVHTQLLGS DHPSEVPEKLIQDRFRKLRGRFPEAFSSIHK  
 GTRTYNPPDFSGLRRALEQLLENNTTRSPRHPGVIKALKALSDRFSGEIPDDQMAHSS  
 FFPDEYFTCSSLCLSCGVGCKKSMNHGKEGVPHEAKSRCRYSHQYDNRVYTCKACYERGE  
 EVSVVPKTSASTDSPWMGLAKYAWSGYVIECPNCGVVYRSRQYWFNGQDPVDTVVRTEIV  
 HVWPGTDGFLKDNNAQRLLDGMNFMAQSVSELSLGPTKAVTSWLTQIAPAYWRPNSQ  
 ILSNKCATSFKDNDTKHHCRACGEGFCDCSSSKTRPVPERGWGPAPVRVCDNCEARNV  
 QLAVTEAQVDDEGGTLIARKVGEAVQNTLGAVVTAIDIPGLVKDAARPAYWVPDHEILH  
 CHNCRKEFSIKLSKHHCRACGQGFCDCECSDRRRAVPSRGWDHPVRVCFNCNKKPGDL

### 10. Autophagy-related protein 9A (ATG9A)

>tr|K1PLJ3|K1PLJ3\_CRAGI Autophagy-related protein 9 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10002035 PE=3 SV=1  
 MESNVTLRFDFGITVCLLVAFAIWFVRLIKVLYNIFKYWEIRSFYLTAVHITTTDLTNMT  
 WHEVQRRLLLEVQKEQQMCIHKQELTELDIYHRILRFKNYMIAMERKSLLPFKHSIPLMGE

>tr|K1Q6P8|K1Q6P8\_CRAGI Autophagy-related protein 9 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10007875 PE=3 SV=1  
 MEIVDFFRNFTVDVVGVDVCSFAQLDVRKRDNKMDREEEEEEPQPSLRNTMFTPDQSPS  
 QEGKIQMSLMHFHLTNPEWKPPKECSLFINDIKEKANRNTTSLSIFNPVTQNMVMSSQGS  
 LTGYLSGLQPSGAGALGYTSLASSIAIQSGMPQSTQVSMAPSVSGVHHRLRGAISTAEG  
 PLERSIGGPVGTMQGSTSMIGSGLGGYHSIGSSKPSVDEGSLELLSHDMSVSALYLHDLQ  
 SRKQRGQGMGYENIEEMRARNLWQRQDSNQGPVHAGMPNIQEKREEEEEKDSGNTETIAK  
 SV

>tr|K1RCA8|K1RCA8\_CRAGI Autophagy-related protein 9 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10005289 PE=3 SV=1  
 MERLIVTVCKVFISDEHLVYCPEILMRNILAHVHYMPPDWGNAHTSKVRNKLSPYFPNT  
 KFTLLFPASQIDGRGYFFRNFTVDVVGVDVCSFVQLDVRKRDNKMDRDEEKEHQPSL  
 RTNMFTLDQSPSQEGKIQMSLMHFHLTNPEWKPPKECSLFINDIKEKANRNTTSLSIFNP

VTQNMVMSSQGSALTGYLSGLQPSGAGALGYTSLASSIAIQSGMYPQSTQVSMAPSVSGVH  
 HRLRGAISTAEGPLERSISGPVGTMQGSTSMIGSGLGGYHSVGSSKPSVDEGSLELLSHD  
 MSVSALYLHDLQSRKQRGQGMGYENVEDMRARNLLQRQDSNQGPPVHAGMPNIQEKREEE  
 EKDSGNTEIAXSV

>tr|K1QIH2|K1QIH2\_CRAGI Autophagy-related protein 9 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10003880 PE=3 SV=1  
 MEIVDFFPNFTVDVVGVDVCSFAQLDVRKRDNKMDDRYTSLASSIAIQSGMYPQSTQVS  
 MAPSVSGVHHRLRGAISTAEGPLERSIGGPVGTMQGSTSMIGSGLGGYHSIGSSKPSVDE  
 GSPELLSHDMSVSALYLHDLQSRKQRGLGQMGYENIEEMRAKNLWQRQDSNQGPPVHAGMP  
 NIQEKREEEEEKDNSSAVMFIKAIYEGGVDFPSTGTGVHAIIV

>sp|Q7Z3C6|ATG9A\_HUMAN Autophagy-related protein 9A OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG9A PE=1 SV=3  
 MAQFDTEYQRLEASYSPPGEEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFT  
 CMLIGEIFELMQFLFVVAFTTFLVSCVDYDILFANKMVNHSLHPTEPVKVTLPDAFLPAQ  
 VCSARIQENGLITILVIAGVFWIHRLIKFIYNICCYWEIHSFYLHALRIPMSALPYCTW  
 QEVQARIVQTQKEHQICIHKRELTELDIYHRILRFQNYMVALVNKSLPLRFRPLPGLGEA  
 VFFTRGLKYNFELILFWGPGSLFLNEWLKAELYKRGQRLELAQRSLNRILWIGIANFLL  
 CPLILIQWILYAFFSYAEVLKREPGALGARCWSLYGRCYLRFHNELEHELOSRNLNRGYKP  
 ASKYMNCFLSPLLLAKNGAFFAGSILAVLIALTIYDEDVLAHEHVLTVTLLGVTVTV  
 CRSFIIPDQHMVFCPEQLLRVILAHIHYPMDHWQGNHRHQTRDEFQALFQYKAVFILEEL  
 LSPIVTPLILIFCLRPRALEIIDFFRNFTVEVVGVDTCFAQMDVRQHGHPQWLSAGQT  
 EASVYQQAEDGKTELSLMHFAITNPGWQPPRESTAFLGFLKEQVQRDGAASLAQGGLLP  
 ENALFTSIQSLQSESEPLSLIANVVAGSSCRGPPPLPRDLQGSRHRAEVASALRSFSPLQP  
 GQAPTGRAHSTMTGSGVDARTASSGSSVWEGQLQSLVLSEYASTEMSLHALYMHQLHKQQ  
 AQAEPERHVHRRRESDESSESAPDEGGEGARAPQSI PRSASYPCAAPRPGAPETTALHGG  
 FQRRYGGITDPGTVPRVPSHFSRLPLGGWAEDGQSASRHPEPVPEEGSEDELPPQVHKV

>sp|Q12142|ATG9\_YEAST Autophagy-related protein 9 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG9 PE=1 SV=1  
 MERDEYQLPNSHGKNTFLSRIFGLQSDVENPNSLNSQEMSNFPLPDIERGSSLLHSTNDSR  
 EDVDENDLRVPESDQGTSTEEEDVDEEQVQAYAPQISDGLDGDHQLNSVTSKENVLETE  
 KSNLERLVEGSTDDSVKVGQLSSEEEEDNEFINNDGFDDDTPLFQKSKIHEFSSKKSNT  
 IEDGKRPLFFRHILQNNRPQRDTQKLFSSNAIHHDKDKSANNGPRNINGNQKHGTYKFG  
 SATQPRFTGSPLNNTNRFTKLFPLRKPNNLSNISVLNNTPEDRINTLSVKERALWKWANV  
 ENLDIFLQDVYNYLNGFYCIILEKILNICTLLFVVFVSTYMGHCVDYSKLPSTSHRVS  
 I I I D K C Y S N S I T G F T K F L W M F Y F F V I L K I V Q L Y F D V Q K L S E L Q N F Y K Y L L N I S D D E L Q T  
 LPWQNVIIQQLMYLKDQAMTANVVEVKAKNRIDAHDVANRIMRRENYLIALYNSDILNLS  
 LPIPLFRNTVLTKTLEWNINLCVMGFVFNESGFIKQSILKPSQREFTREELQKRFMLAGF  
 LNIILAPFLVTVYFVLLYFFRYFNEYKTSFGSIGARQYTPIAEWKFREYNELYHIFKKRIS  
 LSTTLANKYVDQFPKEKTNFLKVFVFCGSEFVAIALAFLTVFDPENFLNFEITSRDSVIF  
 YITILGAIWVSRNTITQEYHVDFPEETLKLKELYEYTHYLPKEWEGRYHKEEIKLEFCKLY  
 NLRIVILLRELTSLMITPFVWLWFLPSSAGRIDVDFRENSEYVDGLGYVCKYAMFNMKNI  
 DGEDTHSMDEDSLTKKIAVNGSHTLNSKRRSKFTAEDHSDKDLANNKMLQSYVYFMDYDYS  
 NSENLTGKYQLPAKKGYPNNEGDSFLNNKYSWRKQFQPGQKPELFRIGKHALGPGHNI SP  
 AIYSTRNPGKNWDDNNNGDDIKNGTNNATAKNDDNNGNNDHEYVLTESFLDSGAFPNHDV  
 IDHNKMLNSNYNGNIGILNKGGVGLVKEYYKSDVGR

## 11. Autophagy-related protein 9B (ATG9B)

>sp|Q674R7|ATG9B\_HUMAN Autophagy-related protein 9B OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG9B PE=2 SV=1  
 MVSRMGWGRRRRLGRWGLGPGSVPLLPMLPPPPPPSCRGPGGGRISIFSLSPAPHTR  
 SSPSSFSPTAGPPCSVLQGTGASQSCHSALPIPATPPTQAQPAMTPASASPSWGSHTP  
 PLAPATPTPSQCPQDSPGLRVGGLIPEQDYERLEDCDPEGSQDSPIHGEEQQPLLHVPE  
 GLRGSWHHIQNLDSFFTKIYSYHQRNQGFACILLEDVFLGQFIFIVTFTTFLLRCDYINV  
 LFANQPSNHTRPGPFHSHKVTLSDAILPSAQCAERIRSSPLLVLVLAAGFWLVQLLSV  
 CNLFSYWDIQVFYREALHIPPEELSSVPWAEVQSRLALQRSGLLCVQPRPLTELDIHR

ILRYTNYQVALANKGLLPARCPLPWGSSAAFLSRGLALNVDLLLFRGPFSLFRGGWELPH  
 AYKRSQDQRGALAAARWGRTVLLLLAALNLALSPLVLAWQVLHVYFVSHVELLRREP GALGARG  
 WSRLARLQLRHFNLPHELRLARLARAYRPAAAFRLRTAAPPAPLRTLLARQLVFFAGALFA  
 ALLVLTVYDEEDVLAVEHVLTAMTALGVTATVARSFIPPEEQCQGRAPQLLLQTALAHMHYL  
 PEEPGPGRDRAYRQMAQLLQYRAVSLLEELLSPLLTPLFLLFWFRPRALEIIDFFHHFT  
 VDVAGVGDICSFALMDVVRHGHQPWLSAGQTEASLSQRAEDGKTELSLMRFSLAHPLWRP  
 PGHSSKFLGHLWGRVQQDAAAWGATSARGPSTPGVLSNCTSPLEAFLANLHVHPLLP  
 DLSPAPCPAAATASLLASISRIAQDPSSVSPGGTGGQKLAQLPELASAEMSLHVIYLHQ  
 LHQQQQQEPWGEAAASILSRPCSSPSPQPPSPDEEKPSWSSDSSPASSPRQQWGTQKAR  
 NLFPGGFQVTTDTQKEPDRASCTD

## 12. WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1 (WIPI1)

>sp|Q5MNZ9|WIPI1\_HUMAN WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 1 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=WIPI1 PE=1 SV=3  
 MEAEAADAPGGVESALSCFSFNQDCTSLATGKAGYKLFSLSSVEQLDQVHGSNEIPDV  
 YIVERLFSSSLVVVVSHTKPRQMNVYHFKKGTEICNYSYSSNILSIRLNQRLLVCLEES  
 IYIHNKIDMKLLKTLDDIPANPTGLCAL SINHSNSYLAYPGSLTSGEIVLYDGNLSKTVC  
 TIAAHEGTLAAITFNASGSKLASASEKGTVIRVFSVDPGQKLYEFRRGMKRYVTISSLVF  
 SMDSQFLCASSNTETVHIFKLEQVTNSRPEEPSTWSGYMGKMFMAATNYLPTQVSDMMHQ  
 DRAFATARLNFSGQRNICTLSTIQKLPRLLVASSSGHLYMYNLDPQDGGECVLIKTHSLL  
 GSGTTEENKENDLRPSLPQSYAATVARPSSASSASTVPGYSEDGGALRGEVIPEHEFATGP  
 VCLDDENEFPPPIILCRGNQKGKTKQS

>EGA79032.1 Atg18p [**Saccharomyces cerevisiae** Vin13]  
 MSDSSPTINFINFNQTGTCISLGTSGKFKIFNCEPFGKIFYSEDSGGYAIIVEMLFSTSLALVIGIQDQPAL  
 SPRRLRIINTKKHSIICEVTFXTSILSVKMNKSRLVLLQEQIYIYDINTMRLLLHTIETNPNRGLMAMS  
 PSVANSYLVPSPPKVINSEIKAHATTNNITLSVGGNTETSFKRDQQDAGHSDISDLDQYSSFTKRDDAD  
 PTSSNGGNSSIIKNGDVIVFNLETLOPTMVEAHKGEIAAMAISFDGTLMATASDKGTIRVFDIETGDK  
 IYQFRRGTYATRIYSISFSEDSQYLAVTGSSKTVHIFKLGHSMSNNKLDSDSDSNMEEAAAADDSSLDTTSI  
 DALSDENPTRLAREPYVDASRKTMRMIRYSSQKLSRRAARTLGQIFPIKVTSLESSRHFASLKLPE  
 TNSHVMTISSIGSPIDIDTSEYPELFFETGNSASTESYHEPVMKMPVIRVVSDDGYLYNFVMDPERGGDCL  
 ILSQYSILMD

## 13. WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2 (WIPI2)

>tr|K1QZR2|K1QZR2\_CRAGI WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 2 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10011163 PE=4 SV=1  
 MNLATKTGDEQSDLLFVNFNQDCTSLAVGTRTGYKLFSLSSVDKLEQIYDNESEDICIVE  
 RLFSSSLVAIVSLSSPRKLKLVCHFVKKGTICNYSYSNSILAVRLNRQRLIVCLEESLYIH  
 NIRDMLVHTIRDTPPNPHGLCAL SINNDNCFLAYPGSNQIGEVQIFDTINLRAVAMI PA  
 HDNPLASLAFNAQGTKLATASEKGTVIRVFSIPDGQKMFEFRRGVKRCVSIYSMAFSADS  
 LFLSASSNTETVHIFKLEVPKDRPAEQEPQGWGMYFGQALKSSATYLPQMTMFNQGRA  
 FATARLPNSGMHNVCALATI QKVPRLVVSQDGYLYIYNLDPNEGGECCMLLRQHRLDGRA  
 GDSVPVEVTPTRPLTHPTSGTSYASSVKKPESSVVPESQPYQEQLEQGSGTGEGETGLG  
 HLRLLDDNEFPMPMTHKSD

>sp|Q9Y4P8|WIPI2\_HUMAN WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 2 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=WIPI2 PE=1 SV=1  
 MNLASQSGEAGAGQLLFANFNQDNTEVKGASRAAGLGRRAVVWSLAVGSKSGYKFFSLSS  
 VDKLEQIYECDTDEDLVCIVERLFSSSLVAIVSLKAPRKLKLVCHFVKKGTICNYSYSNTIL  
 AVKLNQRRLIVCLEESLYIHNIRDMLVHTIRETPPNPAGLCALSINNDNCYLAYPGSAT  
 IGEVQVFDTINLRAANMIPAHDSPLAALAFDASGTKLATASEKGTVIRVFSIPEGQKLF  
 FRRGVKRCVSI CSLAFSMDGMFLSASSNTETVHIFKLETVKEKPPPEPTTWTGYFGKVL  
 ASTSYLPSQVTEMFNQGRA FATVRLPFCGHKNICSLATI QKIPRLLVGAADGYLYMYNLD  
 PQEGGECALMKQHRLDGSLETTNEILDSASHDCPLVTQTYGAAAGKGTYPSSPTRLAYT  
 DDLGAVGGACLEDEASALRLDEDESEHPPMILRTD

>AJV23610.1 Atg18p [**Saccharomyces cerevisiae** YJM1399]

MSDSSPTINFINFNQGTGTCISLGTSGKFKIFNCEPFGKIFYSEDSGGYAIVEMLFSTSLALVIGIGDQPAL  
 SPRRLRIINTKKHSIICEVTFPTSILSVKMNKSRLVLLQEIQIYIDINTMRLLLHTIDTNPNPRGLMAMS  
 PSVANSYLVPSPPKVINSEIKAHATTNNITLSVGGNTETSFKRDQQDAGHSDINDLDQYSSFTKRDDAD  
 PTSSNGGNSSIIKNGDVIVFNLETLOPTMVIEAHKGEIAAMAISFDGTLMATASDKGTIIRVFDIETGDK  
 IYQFRRTYATRIYSISFSEDSQYLAVTGSSKTVHIFKLGHSMSNNKLDSDSDSNMEEAAAADDSSLDTTSI  
 DALSDDEENPTRLAREPYVDASRKTMGMRIRYSSQKLSRRAARTLGQIFPIKVTSLLESSRHFASLKLPE  
 TNSHVMTISSIGSPIDIDTSEYPELFETGNSASTESYHEPVMKMPVIRVVSSDGYLYNFVMDPERGGDCL  
 ILSQYSILMD

#### 14. WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3 (WIPI3)

>tr|K1PZL8|K1PZL8 CRAGI WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 3 OS=*Crassostrea gigas* OX=29159 GN=CGI\_10026046 PE=4 SV=1  
 MDLSLGNISYGNLLYAGWNQDQGCFCACGMETGFRVYNSDPLKEKERQDFADGGIHHIEML  
 FRCNYLALVGGGKPNKYPPTKVMVWDDLKKKPVIELEFSTEVRVSVRLRRDRIVVVLDTLI  
 KVYFTFTQNPQQLHVFETCPNPKGLCVLCPNSNNSLLTFPGRKSGHVQIVDLANTEKSATD  
 IPAHEAPLSCIAMNLQGTRELATSSEKGTIRVFDTHSGLQLHELRRGANSAAHIYCINFNQ  
 DSSLLCVASDHGTVHIFSTEDLKKNKQLGIGSASFLPKYFSSSTWSFSKQVPPGGARCICA  
 FGADPNSVIVICADGSYYKVFVNQKGECTRDVYAAQFLEMTDDRS

>sp|Q5MNZ6|WIPI3 HUMAN WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 3 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=WDR45B PE=2 SV=2  
 MNLLPCNPHGNLLYAGFNQDHGCFACGMENGFVYNTDPLKEKEKQEFLEGGVGHVEML  
 FRCNYLALVGGGKPKYPNKMVMIWDDLKKKTVIEIEFSTEVKAVKLRRDRIVVVLDSMI  
 KVFTFTHNPHQLHVFETCYNPKGLCVLCPNSNNSLLAFPGTHTGHVQLVLDLASTEKPVD  
 IPAHEGVLSICIALNLQGTRIATASEKGTIRIFDTSGLHILQELRRGSQAANIYCINFNQ  
 DASLICVSSDHGTVHIFAAEDPKRNKQSSLASASFLPKYFSSKWSFSKQVPPSGSPCICA  
 FGTEPNAVIAICADGSYYKFLFNPKGECIRDVYAAQFLEMTDDKL

>EGA79032.1 Atg18p [*Saccharomyces cerevisiae* Vin13]  
 MSDSSPTINFINFNQGTGTCISLGTSGKFKIFNCEPFGKIFYSEDSGGYAIVEMLFSTSLALVIGIGDQPAL  
 SPRRLRIINTKKHSIICEVTFXTSILSVKMNKSRLVLLQEIQIYIDINTMRLLLHTIETNPNPRGLMAMS  
 PSVANSYLVPSPPKVINSEIKAHATTNNITLSVGGNTETSFKRDQQDAGHSDISDLDQYSSFTKRDDAD  
 PTSSNGGNSSIIKNGDVIVFNLETLOPTMVIEAHKGEIAAMAISFDGTLMATASDKGTIIRVFDIETGDK  
 IYQFRRTYATRIYSISFSEDSQYLAVTGSSKTVHIFKLGHSMSNNKLDSDSDSNMEEAAAADDSSLDTTSI  
 DALSDDEENPTRLAREPYVDASRKTMGMRIRYSSQKLSRRAARTLGQIFPIKVTSLLESSRHFASLKLPE  
 TNSHVMTISSIGSPIDIDTSEYPELFETGNSASTESYHEPVMKMPVIRVVSSDGYLYNFVMDPERGGDCL  
 ILSQYSILMD

#### 15. WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 4 (WIPI4)

>sp|Q9Y484|WIPI4 HUMAN WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 4 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=WDR45 PE=1 SV=1  
 MTQQPLRGVTSRFRNQDQSCFCAMETGVRIYNVEPLMEKGLDHEQVGSMLVEMLHRS  
 NLLALVGGGSSPKFSEISVLIWDDAREGKDSKEKLVLEFTFTKPVLSVRMRHDKIVIVLK  
 NRIYVYSFPDNPRKLFEDTRDNPKGLCDLCPSEKQLLVFPGHKCGSLQLVDLASTKPG  
 TSSAPFTINAHQSDIACVSLNQPPTVVASASQKGTILIRLFDTSKEKLVELRRGTDPATL  
 YCINFSDSSFLCASSDKGTVHIFALKDTRLNRRSALARVGVKVGPMIGQYVDSQWSLASF  
 TVPAESACICAFGRNTSKNVNSVIAICVDGTFHKYVFTPDGNCNREAFDVYLDICDDDDF

>XP\_011454240.1 PREDICTED: WD repeat domain phosphoinositide-interacting  
 protein 4-like [*Crassostrea gigas*]  
 MSRGVLSLRFNQDHGCFCTCATETGLKIYNVEPLTQKLTGLQDQVVGSIASAEMLFRSNLVAMVGGGTSPKY  
 DEKAALIWDDTAKKVVMDVSNQPVVSIKLYDRLIVVLRNQIHVFSFPNNPTLLHSFDTRDNPKGLCDV  
 SPFGQVIAFPGRKCGSVQIADLETTQPGQSTSPITISAHQGELAYITVNQQGTLLATASKKGTIRVFDT  
 TTKKLVVELRRGADPATLYCITFSHDSSFLCASSDKGTIHFVAVKDTSLNRRSTFKKMGFLGTYVESQWG  
 LASFTVAAECACICAFGPGHVSIAVCVDGTFHKYVFTPDGNCNREAYDVYLDIGDDFE

>sp|P43601|ATG18\_YEAST Autophagy-related protein 18 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG18 PE=1 SV=1  
 MSDSSPTINFNFNQTGTCTISLGTSKGFKIFNCEPFGKIFYSEDSGGYAIIVEMLFSTSLLA  
 LVGIGDQPALSPRRLRIINTKKHSIICEVTFPTSILSVKMNKSRLVLLQEQIYIYDINT  
 MRLLLHTIETNPNRGLMAMSPSVANSYLVPSPPKVINSEIKAHATTNNITLSVGGNTET  
 SFKRDQQDAGHSDISDLQYSSFTKRDDADPTSSNGGNSSIIKNGDVIVFNLETLOPTMV  
 IEAHKGEIAAMAIISFDGTLMATASDKGTIIRVFDIETGDKIYQFRRGTYATRIYSISFSE  
 DSQYLAVTGSSKTVHIFKLGHSMSNNKLDSDSNMEEAAAADDSLDTTSIDALSDEENPT  
 RLAREPYVDASRKTMRMIRYSSQKLSRRAARTLGQIFPIKVTSLLESSRHFASLKLPE  
 TNSHVMTISSIGSPIDIDTSEYPELFETGNSASTESYHEPVMKMPVIRVVSSDGYLYNFV  
 MDPERGGDCLILSQYSILMD

## 16. Autophagy-related protein 2-like protein A (ATG2A)

>tr|K1RSP2|K1RSP2\_CRAGI Autophagy-related protein 2-like protein A  
 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10022068 PE=4 SV=1  
 MSNFWKISGEELKAGIWRPHTLMFLLLWVPTVVSQILVFPDRVSTKQGHMYSSMHSGAPA  
 LKAHVKSQVQNKRSQRSSGGPRTEISVNLAKLECELDGPLYSFQSQTMEDESASDETKIDL  
 SVNCEPVKLTLLRFPIDPLRNGSEVTKLPWWQKNLRDELLILDLEARFQTSFSLNQPIQQ  
 VEVSSRNVLGSFRIDPNQSAVFFAFVSCGIDGQEGFNFPQIIKIFTEQTSVLDDEENPD  
 SDNSIPMDSLNGACEFAKQDTSFSTKHKMYGKGGEMSDQATQHVSDMVMVPGNREDMADF  
 QERASANCLTLVQLVPLINLYIPDQKFYEVLYNRI SNDLLLWEPMAPAPIPTQEVGPGS  
 IQPFDLSCYTHAEDCHGEVMGVVKDANLFFVASSYQGNPLLQYICFYCNKATLYHNAAVPD  
 KKEEFEIENLDFETIPAHLEKSCIIDRSEPGVLCHQSADVESTVTRDMVSVAVRIKLDSTP  
 LSDLTRDEKIKEFTVAVGVGTGATLRHKMAETDMSWISQILNFLDVKDYDILGYVTPKILT  
 ELHVHLWDCAVDYRPLHLPTKGVVAANYFSISSNIVANSQTSLLRFVLEDAGMYLSQKKG  
 RESTVDLKKDYVCVLDVESFELELRSDGKDPKFKMDLRLRTNKINMRTCTDSCKALFE  
 LIRYFANDGLVEYEEPTNKRQSLDLEMNKEEASSDEDSKKKELSESRLLENLSSHLED  
 AMQESGSGSDNDGSESSKQSPNKTEVFFVAQGERTDQVPPAGVMRPIVITASADSVTSS  
 AVSERTDIFSEEEEEEDFCIIDDAGLGITPRDGKPEVKIFTDEPIEIKDNYFSQPHGKT  
 DLLKAPDHFPAEYRYTLKELTIVWHMYGGSDFSPTVQKQKPVETEVMVSRMKMDYGEYV  
 TETSVRFASKGSSVDRI PWTQRGGVGRDHTLMELQLTKVRFQHERYPGHTEQASRQVLI  
 ISDAEIRDRLSDSKINKFLYQYSSENLPKQTNMVMYIKALHKRPDPSVKTEECSLRVSL  
 QPLRLNIDQDSLFFLKKFFTEITGGNVNDNPSDPDPKQARARSVSGASGAPAPVITVGQPEC  
 PGEERTPQELLMKFDEMQQSLASQGSMMSSASVASSSDSDRTEQSQPVF IKNFMFSPDVPI  
 RLDDYHGKWKVDREHGTLAGLVGLASLNCSELKRLKRLNYKHGLLGMDKLQAYCINEWITD  
 ILKKQLPSILGGVGPMSHFVQIAQGI RDLFWLPVEQYKRDGRFVVRGIQRGATSFSTSTAM  
 AMLELTNRVQSVQYVAEVTYDMVTPGSCRVRRLRGPADVREGVENAYIAITEVQG  
 TAQYDLLPDANDRKMDHIELFPAPREKFRVY

>sp|Q2TAZ0|ATG2A\_HUMAN Autophagy-related protein 2 homolog A OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=ATG2A PE=1 SV=3  
 MSRWLWPWSNCVKERVCRYLLHHYLGHFFQEHLSLDQLSLDLYKGSVALRDIHLEIWSVN  
 EVLESMEsplELVEGFVGSIEVAVPWAALLTDHCTVRVSGLQLTLQPRRGPAAGAADSQS  
 WASCMTTSLQLAQECLRDGLPEPSEPPQPLEGLEMFQAQTIETVLRRIKVTFLDTVVRVEH  
 SPGDGERGVAVEVRVQRLEYCDEAVRDPSQAPPVDVHQPPAFLHKLLQLAGVRLHYEELP  
 AQEPPPEPPLQIGSCSGYMELMVKLLQNEAFPGPKLEVAGQLGSLHLLLTFRQLQQLQEL  
 LSAVSLTDHEGLADKLNKSRPLGAEDLWLEIQDLNQQQLQAGAVAEPSPDPLTNPLLNLD  
 NTDLFFSMAGLTSSVASALSELSDVDLASSVRSMDASRRLSAQAHPAGKMAPNPLLDL  
 MRPDSLLKMTLGGVTLTLLQTSAPSSGPPDLATHFFTEFDATKDGPFGRDFHHLRPRFQ  
 RACPCSHVRLTGTAVQLSWELRTGSRGRRTSMEVHFGQLEVLLECLWPRGTSEPEYTEIL  
 TFPGTLGSQASARPCAHLRHTQILRRVPKSRPRRSVACHCHSELALDLANFQADVELGAL  
 DRLAALLRLATVPAEPPAGLLTEPLPAMEQQTVFRLSAPRATLRLRFP IADLRPEPDPWA  
 GQAVRAEQDLRLELSEPFVRSLELSSGPGPPVPTHELELTCSDLHGIYEDGGKPPVPCLRVSK  
 ALDPKSTGRKYFLPQVVVTVNPNQSSSTQVVEVAPEKGELELSVESPCELREPEPSPFSSK  
 RTMYETEEMVIPGDPEEMRTFQSRTLALSRCSEVILPSVHIFLPSKEYYESIYNRINND  
 LLMWEPADLLPTPDPAAPSGFPGSPGFVHDSFKMCKSAFKLANCFDLTPDSDSDEDAH  
 FFSVGASGGPQAAPEAPSLHLQSTFSTLVTVLKGRI TALCETKDEGGKRLEAVHGELVL  
 DMEHGTLFSVSQYCGQPGLGYFCLEAEKATLYHRAAVDDYPLPSHLDLPSFAPPAQLAPT  
 IYPSEEGVTERGASGRKGGQGRGPHMLSTAVRIHLDPHKNVKEFLVTLRLHKATLRHYMAL



PEQSWHSQLEFLDVLDDPVLGYLPPTVITILHTHLFSVSDYRPLYLPVRVLI TAETFT  
 LSSNIIMDTSTFLLRFILDDALYLSKCEVETLDRRDYVCVLDVLDLLELVIKTWKGST  
 EGKLSQPLFELRCSNNVVHVHSCADSCALLVNLLQYVMSTGDLHPPRPPSPTEIAGQKL  
 SESPASLPSCPPVETALINQRDLADALLDTERSLRELAQPSGGHLPQASPI SVYLFPGER  
 SGAPPPSPVGGPAGSLGSCSEEKEDEREEEGDGTLDSEFCILDAPGLGIPPRDGEPV  
 VTQLHPGPIVVRDGYFSRPIGSTDLLRAPAHFPVPSTRVVLREVSLVWHLYGGRDFGPH  
 GHRARTGLSGPRSSPSRCSGPNRPQNSWRTQGGSGRQHHLVMEIQLSKVSFQHEVYPAEP  
 ATGPAAPSQELEERPLSRQVFIVQELEVDRDLASSQINKFLYLHTSERMPRAHSNMLTI  
 KALHVAPTTNLLGGPECCLRVSLMPLRLNVDQDALFFLKDFFTSLVAGINPVVPGETSAEA  
 RPETRAQPSSPLEGQAEGVETTGSQEAPGGGHSPSPDQQPIYFREFRFTSEVPIWLDYH  
 GKHVMTMDQVGTFAGLLIGLAQLNCSSELKLRCCRHGLLGVDKVLGYALNEWLQDIRKNQ  
 LPGLLGGVGPMSVQVLFQGFRLDLWLP IEQYRKDGRMLRGLQRGAASFGSSTASAALEL  
 SNRLVQAIQATAETVYDILSPAAPVSRSLQDKRSARRLRGQQPADLREGVAKAYDTVRE  
 GILDTAQTICDVASRGHEQKGLTGAVGGVIRQLPPTVVKPLILATEATSSLLGGMRNQIV  
 PDAHKDHALKWRSDSAQD

>sp|P53855|ATG2\_YEAST Autophagy-related protein 2 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG2 PE=1 SV=1

MAFWLPQNIQKRLLLYVLQQLSFLSNIDLSNLDVSIKSKSHFSFHDVNLSDLDLNI PNQ  
 INEGIVDELVLKLTVSGGVEIDGSLRFIMTPLYSSGSQELHSDFLVKS IQDLTNSMLQF  
 SDPLTTYNRYKEDDISSSDSSDLNSNIEASKPAANGSYTLQNMNRKALNVALAKLKIAL  
 KDVTIRFIVNDRDPSDNIVEVHLESIQ LITTDANLRHININENITISSIQKQAVPDSPVHP  
 FNNDLDSQSVYLSKMEATSLYMSAMEEQSNEDPSEPQVTQEEQENDKCKESLMEINNLNI  
 AFKGLSSVNDLRMSNIVIDIQDVHLAIHKIVEIKNSTLKNIIDIVTHLDANESFSCQDS  
 QSPSPDKQEPSALSSVDIKCIYLNLGQDITVILKSFKLEQKENNSLAFSLGSFYNSNSPL  
 TISHKTKPLLTGEQTPQSIALNMGDELDI IISHDGHIAHFFKIFQFVSKCMSFYQNKSKGM  
 MPQIASDTRKTVQLTSKAVKLSLKFPYFLLCFQVSPFIYDSNRELYIELVDVFKKLP SRC  
 TKILTMSSITISNLQSPQLGSDYDTLKEALIYSSVHAI IKEVIFNEEYSGIVQLVEDIS  
 AFGKLFDTSKNSECTGKSKSKRGSFQLRSVRVLNSSRFVYKQSLSANFSLKIDSMKLVKVS  
 EIIIGPQFGSVEALLSNFFAITDSDQIVYFTKNLKVVERKTPSLEPQEI MSVVLNKAVNE  
 PVLYVHRRANGKLVFI FNNIRIHYARWLEILKKNIGPDNASSKDEPVSQKLSKKQPTSG  
 FPWELKCLDCSLKILHPFRLKSVMVIVLDNLTGGSSFI PQAKLLSKANTLFLIDDYQNFK  
 IQKDKNWP SLINFYAGQGFSAIGKIDTLNFLINKSDGALLLDCKIEQVGLSLCADSFQTF  
 CQLCIDLKY PQTFFPDEEKFR TQLKNPIDVFKDIDCDLNFSAFIRENNHQNDYDSVHLVDS  
 FLDKTHEFNNGARSKLSSQGSYEMDSSSGTATGGILLPHESYLDSAQPKEEDTPPIASKE  
 QERDVIDRGSIDVEKVVIKLFDGYDWKYTRKFIANTVEKLDKELSKAEASSSKSNVPQSE  
 ANIFDSIYISANKNNVTDLRNLDGEIQGVQNSFSDVSKVNLRPSKHYKALIQLNKVHVN  
 LKNYRVDEPDESNDNSTDVNLNRCVVS IYEFEI IDNVPTSTWNKFVTLKHEPWP HSSPM  
 FLLDLEFIRPIDFLQAVELVMQLNVAPLRLHVDQDTLEFLIRFLGFKDKRFELIDEYPDI  
 VFIQKFSTNSIKLRLDYKPKKVDYAGLRSGQTS ELMNFFTLDGSKI ILSVVLYGLNGFD  
 ELNNK LKAIWTPDITTKQLPGVLEGLAPVRSFMAIGSGVKT LVTVLMSEYRQEGHLGRSL  
 KKGGNVFLKTTTGDFVVLGVKLTSGTQAILENTEELFGGVGSGNRVYDASKFGSADGADS  
 DTAAVLDDLDTLFEEDQLVGSKYSRIRDHEPTAVVIDMSSPGDHNEPTIVSLYADQPLDLP  
 TGLKEAYSSLEKHMHIAYDAVWRAGQMKDDKRGGPSAAAVYVARAAPVAIIRPLIGATE  
 AVSKTLQGIANQVDKTHNEQINDKYKSNRTDS

## 17. Autophagy-related protein 2-like protein B (ATG2B)

>tr|K1QL77|K1QL77\_CRAGI Autophagy-related protein 2-like protein B  
 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10022070 PE=4 SV=1

MPWTFPWTEFLKRRACRYLLQHYLGQFLKEKLSLDQLSVDLYNDRGSIKDLELDVEALNE  
 ALDSSSVPLEIVDGFINQISVSVPWNTLIQSSTEMEIQGLEITVQPKQRMENVGGLETMF  
 NSMCSPTSSLQIAEDCLKSTSDADQGDQLGTPFEGVQKFAQTIDSVLCRVKVTLIDTVVR  
 VEHLSDSAEKHVALEIKIKRIEYFDDMAKEEGSPVDDSSRTTWEPAIAHKNLLIDGMQI  
 LCDEF SRPHTQPSRMFSSDSYQQTFMSTSSPSTPVDNQGGTVVPVSEVFSDEPVQIAGFT  
 GKSSLKVKLKQEEGVQGPVIEIELEVGLHLLLSPTQFHAVL DLVNGFLSPKSSNEGRER  
 ARSKSKPMNEEDYRKVETELQRQLHSDRFHPSHMDTLTATDLQDIMTHSIGDEQYFSLAP  
 DPMESSVNSNFSLASGRSGSTVTTTRSGPRKDGKAAKDSIQRF LDDPSAELCRYHLRAVF  
 FSVALLHENPSQKVDLSSAKANNKNQMKDIAAQYFQKMHSFSAASGGEVKALRAAF AEA  
 LPQDHLRLIGKPVNIEIVERTAPTHHCLTVDV TAGFLDVVECLFNRTLQTI EPDYTELAA

QLAHQSGDKFN RVTVCEISHF

>sp|Q96BY7|ATG2B\_HUMAN Autophagy-related protein 2 homolog B OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=ATG2B PE=1 SV=5

MPWPFSESIKKRACRYLLQRYLGHFLQEKLSEQLSLDLYQGTGSLAQVPLDKWCLNEIL  
 ESADAPLEVTEGFIQISISLSPVWGSLLQDNCALEVRGLEMVFRPRPRPATGSEPMYSSSF  
 MTSSMQLAKECLSQKLTDEQGEQSOPFEGLEKFAETIETVLRRVKVTFIDTVLRIEHVPE  
 NSKTGTALEIRIERTVYCDETADESSGINVHQPTAFAHKLLQLSGVSLFWDEFSSASAKSS  
 PVCSTAPVETEPKLSPSWNPKIIEYHPQLTRNLPEIAPSDPVQIGRLIGRLELSLTLKQ  
 NEVLPGAKLDVDGQIDSIHLLLSRQVHLLLDMLAAIAGPENSISKI GLANKDRKNRPMQQ  
 EDEYRIQMELNRYYLKRDLSVGVSSSEQSFYETETARTPSSREEEVFFSMADMDSHSL  
 SLPLGLDPPNMDLELSLTSTYTNTPAGSPLSATVLQPTWGEFLDHHKEQPVRGSTFFPSNL  
 VHPTPLQKTSLSRSVSVDESPELIFRLAVGTFSISVLHIDPLSPPETSQNLNPLTPMA  
 VAFFTCIEKIDPARFSTEDFKSFRAVFAEACSHDHLRFITGTGIKVSYEQRQRSASRYFST  
 DMSIQMEFLECLFPTDFHVSPPHYTELLTFHSSKEETGSHSPVCLQLHYKHSENRRPQGN  
 QARLSSVPHKAELQIKLNPVCCLEDISIVDRNLNLLQPQKLATVEMMASHMYTSYNKHIS  
 LHKAFTVEVFLDDSHSPANCRI SVQVATPALNLSVRFPI PDLRSDQERGPWFKKSLQKEIL  
 YLAFTDLEFKTEFIGGSTEPIKLELTFRELIGSFQEEKGDPSIKFFHVSSGVDGDTSS  
 DDFDWPRIVLKINPPAMHSILERIAEEEEENDGHYQEEEEEGGAHSLKDVCDLRRPAPS  
 FSSRRVMFENEQMVMPGDPVEMTEFQDKAISNSHYVLELTLNPIYVTLPNKSFYEKLYNR  
 IFNDLLLWEPTASPVETFENISYGIGLSVASQLINTFNKDSFSAFKSAVHYDEESGSEE  
 ETLQYFSTVDPNYSRRKKKLDSONKNSQSFLSVLLNINHGLIAVFTDVKQDNGDLLENK  
 HGEFWLEFNSGSLFCVTKYEGFDDKHICYLHSSSFSLYHKGIVNGVILPTETRLPSSTRP  
 HWLEPTIYSSEEDGLSKTSSDGVGGDSL NMLSVAVKILSDKSESNTKEFLIAVGLKGATL  
 QHRMLPSGLSWHEQILYFLNIADEPVLGYNPPTSFTTFHVHLWSCALDYRPLYLP IRSLL  
 TVETFSVSSSVALDKSSSTLRILDEAALHLSDKCNTVTINLSRDYVRVMDMGLLELTIT  
 AVKSDSDGEQTEPRFELHCSSDVVHIRTCSDSCAALMNLIQYIASYGLQTPNKADMKPG  
 AFQRRSKVDSSGRSSSRGPVLP EADQQMLRDLMSDAMEEIDMQQGTSSVKPQANGVLDEK  
 SQUIQEPCCSDLFLFPDESIGNVSQESGPTYASFHHFISDAMTGVPTENDDFCILFAPKAA  
 MQEKEEEPVIKIMVDDAIVIRDNYFSLPVNKTDTSKAPLHFPPIPVIRYVVKEVSLVWHLY  
 GKGDFGIVPPTSPAKSYISPHSSPSHTPTRHGRNTVCGGKGRNHDFLMEIQLSKVKFQHE  
 VYPPCKPDCDSSLSEHPVSRQVFIVQDLEIRDRLATSQMNKFLYLYCSKEMPRKAHSNML  
 TVKALHVCPESEGRSPQECCLRVSLMPLRLNIDQDALFFLKDFFTLSAEVELQMTDPPEV  
 KKSPGADVTCSLPRHLSTSKEPNLVISFSGPKQPSQNDANSVEVVNGMEEKNFSAEEAS  
 FRDQPVVFFRTEFSEVPIRLDYHGKHVSMQDQTLGILIGLAQLNCSELKLRKLSYRHG  
 LLGVDKLFYSYAITEWLNLIKKNQLPGILGGVGMHSLVQLVQGLKDLVWLPPIEQYRKDGR  
 IVRGFQRGAASFGTSTAMAALLETNRMVQTIQAAAETAYDMVSPGTLSIEPKKTKRFPHH  
 RLAHQPVDLREGVAKAYSVVKEGITDTAQTIIYETAAREHESRGVTVGAVGEVLRQIPPAVV  
 KPLIVATEATSNVLGGMRNQIRPDVRQDESQKWRHGDD

>sp|P53855|ATG2\_YEAST Autophagy-related protein 2 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG2 PE=1 SV=1

MAFWLPQNIQKRLLLYVLQQISLFSNIDLSNLDVSI GSKSHFSFHDVNLSDDDLNPVQ  
 INEGIVDELVLKLTVSGGVEIDGSLRFIMTPLYSSGSQELHSDFLVKS IQDLTNSMLQF  
 SDPLTTYNRYKEDDISSSDSSDLNSNIEASKPAANGSYTLQNMNRKALNVALAKLKIAL  
 KDVTIRFIVNDRDPSDNIVEVHLESIQ LITTDANLRHININENITISSIQKQAVPDSVHP  
 FNNDLDSQSVYLSKMEATSLYMSAMEEQSNEDPSEPQVTQEEQENDKCKESLMEINNLNI  
 AFKGLSSVNDLRMSNIVIDIQDVHLAIHKIVEIKNSTLKNIIDIVTHLDANESFSCQDS  
 QSPSPDKQEPSALSSVDIKCIYLNLGQDITVILKSFKLEQKENNSLAFSLGSFYNSNSPL  
 TISHKTKPLLTGEQTPQSIALNMGDELDI IISHDGHIAHFFKIFQFVSKCMSFYQNKSKGM  
 MPQIASDTKRTVQLTSKAVKLSLKFPYFLLCFQVSPFIYDSNRELYIELVDVFKKLPSRC  
 TKILTMSSITISNLQSPLQLGSYDDTLKEALIYSSVHAI IKEVIFNEEYSGIVQLVEDIS  
 AFGKLFDTSKNSECTGKSKSKRGSFLQRSVRVLNSSRFVYKQSLSANFSLKIDSMKLVK  
 EIIGPQFGSVEALLSNNFFAITDDSQIVYFTKNLKVVERKTPSLEPQEIMSVVLNKAVNE  
 PVLYVHRRANGCLKVI FNNIRIHYYARWLEILKKNIGPDNASSKDEPVSQKLSKKQPTSG  
 FPWELKCLDCLILHGFRLKSVMVIVLDNLTTGGSSFI PQAKLLSKANTLFLIDDYQNFK  
 IQKDKNWPSSLINFYAGQGFSAIGKIDTLNFLINKSDGALLLDCKIEQVGLSLCADSFQTF  
 CQLCIDLKYPQTFPDEEKFRQKLNPIDVFKDIDCDLNFNSAFIRENNHQNDYDSVHLVDS  
 FLDKTHEFNNGARSKLSSQGSYEMDSSSGTATGGILLPHESYLDQAQPKEEDTPPIASKE  
 QERDVDIRGSIDVEKVVIKLFDGYDWKYTRKFIANTVEKLDKELSKAEASSKSNVPQSE

ANIFDSIYISANKNNVTDLRRNLDGEIQGVQNSFSDVSKVNLRPSKHYKALIQLNKVHVN  
 LKNYRVDEPDESNSDNSTDVLRNRCVVSIEFEI IDNVPTSTWNKFVTLKHEPWP HSSPM  
 FLLDLEFIRPIDFLQAVELVMQLNVAPLRLHVDQDTLEFLIRFLGFKDKRFELIDEYPDI  
 VFIQKFSTNSIKLRLDYKPKKVDYAGLRSGQTSSELMNFFTLDGSKIILKSVVLYGLNGFD  
 ELNNKLAIWTPDITKKQLPGVLEGLAPVRSFMAIGSGVKTIVTVLMSEYRQEGHLGRSL  
 KKGGNVFLKTTTGDVFKLVKLTSGTQAILENTEELFGGVGSGNRVYDASKFGSADGADS  
 DTAAVLDDLTLFEEDQLVGSKYSRIRDHEPTAVVIDMSSPGDHNEPTIVSLYADQPLDLP  
 TGLKEAYSSEKHMHIAYDAVWRAKQMKDDKRGGPSAAAVYVARAAPVAIRPLIGATE  
 AVSKTLQGIANQVDKTHNEQINDKYKSNRTDS

### 18. Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PI3KC3)

>tr|K1PVC2|K1PVC2 CRAGI Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit  
 type 3 OS=*Crassostrea gigas* OX=29159 GN=CGI\_10006484 PE=3 SV=1  
 MGEMSDRFHYVYSCDLVNLQIKIGTLEGERQRPDYKELLDDPMLKFSGVYGEECSDLYV  
 TCQVFADGHPLSLSMSTSYKAFSTRWNWNEWITLPVKYSDLP RNAILSLTIWDIYG TNKS  
 IPV GSTVIPLFGKRGTYRQGMHDLKVWPDMLPDPSSNSTTPGKSKDHKQMSKLAKLSKK  
 HRDGHMLKVDWLDRLTFREIEMINEKQKRDSKFMYLMIIEFPLIHYEDIEYSVVYFEKDGD  
 EPLVYKTI PDLVQVPDPEIDMENLVESKHHRLARSLRSGPTDRDMKPD ATRNLLHEIVR  
 YPPTKTLTSEEDLVWKF RFYLCNQK KALTKFLKCVNWKQPQESRQGI ELLTRWSPMDVE  
 DALELLSPAFSHPTVRKYAVSRLRQADDQDLLLYLLQLVQALKYEDFEEIMRYNDSIVDR  
 KDSVSDTSAPEKTRTTSVLSRASSNESILHALGGSSPSQSESPE SKLEREMDLASFLISR  
 ACNNTSLANYFYWYLSVECVDPNGLDVKDSKVTKMYQHVLKRF SQALFKESNESRQRSM  
 IARQQT FIDRLVDLVKIVTRESGNRKKKIERLQALLHDQEA CKFD FSNFEPLSLPLDPI  
 KICGIIPEKATL FKS NLM PCKFVFKMVEGGEY MAMYKHGDDL RQDNLILQIITLMDKLLM  
 RDNLDLKLT PYKVLAT SCKHGFVQFVESVAVAEVLNQHTGIQSFFKICAPCENTPYGFQ P  
 EVMDNFVKSCAGYCVITYVLGVGDRHFDNLLLTKTGKLFHVDGFI LGRDPKLLPPLMKL  
 TTEMIDGMGGPNSEHFHDFKLCYTAFLAIRSSNLILNLF TLMVNANIPDIAIEPDKSV  
 KKVQDKFVLHLTDEEAVQYMQNVIDGSVSAMMPV LVERFHTIAQASTSOTLYIKYTL

>sp|Q8NEB9|PK3C3 HUMAN Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type  
 3 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=PIK3C3 PE=1 SV=1  
 MGEAEKFHYIYSCDL DINVQLKIGSLE GKREQKSYKAVLEDPMLKFSGLYQETCS DLYVT  
 CQVFAEGKPLALPVRTSYKAFSTRWNWNEWLKL PVKYPDLPRNAQVALTIWDVYGP GAV  
 PVGGTTVSLFGKYGMFRQGMHDLKVWPNVEADGSEPTKTPGRTSSTLSE DQMSRLAKLTK  
 AHRQGHMVKVDWLDRLTFREIEMINESEKRS SNFMYLMVEFRCVKCDDKEYGIVYYEKDG  
 DESSPILTSFELVKVPDPQMSMENLVESKHHKLARS LRSGPSDHD LKPNAATR DQLNIIV  
 SYPPTKQLTYEEQDLVWKF RYLLTNQE KALTKFLKCVNWDLPQEAKQALELLGKWKPM DV  
 EDSLELLSSHYTNPTVRRYAVARLRQADDEDLLMYLLQLVQALKYENFDDIKNGLEPTKK  
 DSQSSVSENVSNNGINSAEIDSSQIITSPLPSVSSPPPASKTKEVPDGENLEQDLCTFLI  
 SRACKNSTLANLYWYVIVECEDQDTQORDPKTHEMYLNMRRFSQALLKGDKSVRVMRS  
 LLAQQTFVDRVLVHLMKAVQRESGNRKKKNERLQALLGDNEKMNLSDEL IPLPLEPQVK  
 IRGII PETATL FKSALMPAQLFFKTEDGGKY PVI FKHGDDL RQDQLILQIISLMDKLLRK  
 ENLDLKLTPYKVLATSTKHGFMQFIQSVPAEVL DTEGSIQNFFRKYAPSENGPNGISAE  
 VMDTYVKSCAGYCVITYILGVGDRHLDNLLLTKTGKLFHIDFGYILGRDPKPLPPPMLN  
 KEMVEGMGGTQSEQYQEFRKQCYTAFLHLRRYSNLILNLFSLMVDANIPDIALEPDKTVK  
 KVQDKFRLDLSDEEAVHYMQSLIDESVHALFAAVVEQIHKFAQYWRK

>sp|P22543|VPS34\_YEAST Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 OS=*Saccharomyces  
 cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VPS34 PE=1 SV=1  
 MSLNNITFCVSQDL DVPLKVKIKSLEGHKPLLKPSQKILNPELMLIGSNVFPSSDLIVSL  
 QVFDKERNRNLTLPIYTPYIPFRNSRTWDYWL TLP IRIKQLTFSSHLRIILWEYNGSKQI  
 PFFNLETSIFNLKDC TLRGFESLKF RYDVIDHCEVVT DNKDQENLNKYFQGEFTRLPWL  
 DEITISKLRKQRENRTWPQGT FVLNLEFPMLELPVVFIEREIMNTQMNIP TLKNNPGLST  
 DLREPNRNDPQIKISLGDKYHSTLKFYDPDQPNNDPIEEKYRRLERASKNANLDKQVKPD  
 IKKR DYLNKI INYPPGT KLTAEHKGSIWKYRYLLMNNKKALTKLLQSTNLREESERVEVL  
 ELMDSWAEIDIDDALELLGSTFKNLSVRSYAVNRLK KASDKELELYLLQLVEAVCFENLS  
 TFSKSNSEFTIVDAVSSQKLSGDSMLLSTSHANQKLLKSISSESETSGTESLP IVISPL  
 AEFLIRRALVNPRLGSFFYWLKSESEDKPYLDQILSSFW SRLDKKSRN ILNDQVRLINV  
 LRECCETIKRLKDTTAKKME LLVHLETKVRPLVKVRPIALPLDPDVLICDVCPETSKVF

KSSLSPLKITFKTTLNQPYHLMFKVGDLLRQDQLVVQIISLMNELLKNENVDLKLTYPYKI  
 LATGPQEGAIEFIPNDTLASILSKYHGILGYLKLHYPDENATLGVQGWVLDNFVKSCAGY  
 CVITYILGVGDRHLDNLLVTPDGHFFHADFGYILGQDPKFPFPLMKLPPQIIEAFGGAES  
 SNYDKFRSYCFVAYSILRRNAGLILNLFELMKTSNIPDIRIDPNGAILRVRERFNLNMSE  
 EDATVHFQNLINDSVNALLPIVIDHLHNLAQYWRT

### 19. Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4 (PIK3R4)

>tr|K1R976|K1R976\_CRAGI Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4  
 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10027844 PE=4 SV=1  
 MGNQLTGIAPSQIQPVDQYLTDIPDYQYENSLGSTRFFKVARARTKEGLAVVKVFIHDP  
 SLPLTSHRNKLEDIHIRLQGSTSNCLPFQKAIHSDKAALLFRQYVKDSLYDRISTRPFLN  
 RIEKKWLAFLQLLCALNQCHKIKVCHGDIKAENVMITSWNWLLLTDFASFKPTYLPEDNPS  
 DFSYFFDTSRRRCYIAPERFVESGLKNQEGAGQTIDLTNSDEVKSGDITPPMDIFSAGC  
 VICELFTEGTPPFDFSQLLAYRNGEYSPWKVLEKIDDNYIRDIVRHMIKKDP SHRLSAEE  
 YMIQQRGKAFPEYFYTFLLKIYLLQFVSTPLTPDDRINKIKRDFPRIVKSIQEQEERSED  
 NIGLVLIISLIISSSRKHLCLNTKLTALQLLLEASKFVTTDIIIDRIIPYMLSFANDQFP  
 RVRAEVIHVVTQCLLDVDSIPRSDANVFPEYIFPNIHTLTQDPVVMVRAAYAENIAKLAE  
 TALRVLEMTQRIDLEETEEEEESVDGLLYQANYDIELLTLQETIQQKVVTLSDPDNSVKR  
 TLENGITKLCVFFGRQKANDVLLSHMITFLNDKTDWHLRGSFFDNIVGVAAYVWGQSCS  
 ILKPLLDQGLSDPEEFVVKTLGALTALTELGLIQKSMLOEFLQEVVFPFLAHPGIWIRQG  
 AIGFISALTRMFNIADVHCKVLPALQPCPKKRVLQIDKEIFLLNALQSPIPRPVFDYILR  
 VSQPDRLFIDILRERQYMRISIRSSSHRTTYSELDEAMSQVFKKLSFGMDESHEDKILAMK  
 DYVMKLRHRSRAGSVETKHELGDSPGRFCIVGAGKAITRRHAELIKQKDPKQGGADQTTSS  
 RSSKKVQSKEQSVNMNSEWKSFMFGSNESDSSNASLSPKARTLQKTAESLEKKLNTSQTVS  
 QTSSSSGSFVTMSQSQSSEGSIRSVTEKGS DKNPITKYHNCKIALRNIVHKKRELYSAE  
 SKDLLEIAWERRPPPSNWPKGLLVAHLQEHRAAINRIQVSHDHAFFASASNDGTVKLWE  
 SEKLEGNSVANRSKQTLKNTSLPGEKVKGLVFCEASGPSLSLATFTDLGAINIFKIEYTGK  
 ASWNKDLRVDKPDYGNIVDMTYFDTGAQSVLSYATVNGFLVGHDLRTNKEVWKL RNDPKA  
 GLITSFVHHSQCWLAVGTSSGTHICWDMRFQLPINSIVHPTGARVRRIMHPQEQSWLI  
 SATQGNNEVSIWVETGARQKVLWASPTPTLSLNQASHHSVYGLHMAVTDTNVFMLTGGS  
 DMRARFWDLSYPANSFILAGAASDPVQQTGVNYRAKLVLDGVEVIQELYTKKPVNTDDAPR  
 RGPEAPPQGHRIISDINLCQASQCMVITGSRDGVIVKWK

>sp|Q99570|PI3R4\_HUMAN Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4  
 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=PIK3R4 PE=1 SV=3  
 MGNQLAGIAPSQILSVESYFSDIHDFEYDKSLGSTRFFKVARAKHREGLVVVVFVFAIQDP  
 TLPLTSYKQEELEELKIRLNSAQNCLPFQKASEKASEKAAMLFRQYVRDNLVDRISTRPFL  
 NNIEKRWIAFQILTAVDQAHKSGVRHGDIKTENVMVTSWNWVLLTDFASFKPTYLPEDNP  
 ADFNYFFDTSRRRTCXYIAPERFVDDGMFATELEYMRDPSTPLVDLNSNQRTGELKRAMD  
 IFSAGCVIAELFTEGVPLFDLSQLLAYRNGHFFPEQVLNKKIEDHSIRELVTQMIHREPDK  
 RLEAEDYLKQQRGNAPPEIFYTFLOPYMAQFAKETFLSADERILVIRKDLGNIHNLGCGH  
 DLPEKAEGEPKENGVLIVSVITSLCLQTLKYCDSKLAALAILHLAPRLSVEILLDRITP  
 YLLHFSNDSVPRVRAEALRTLTKVLALVKEVPRNDINIYPEYILPGIAHLAQDDATIVRL  
 AYAENIALLAETALRFLELVQLKLNLMENDPNNEEIDEVTHPNGNYDTELQALHEMVQOK  
 VVTLSDPENIVKQTLMEGITRLCVFFGRQKANDVLLSHMITFLNDKNDWHLRGAFDSD  
 IVGVAAYVWGQSSSILKPLLQGLSDAEFVIVKALYALTCMCQLGLLQKPHVYEFASDI  
 APFLCHPNLWIRYGAVGITVVARQISTADVYCKLMPYLDPYITQPIIQIERKLVLLSVL  
 KEPVSRISFDYALRSKIDITSLFRHLHMRQKRNGLPDCPPPEDPAIAQLLKKLLSQGMT  
 EEEEDKLLALKDFMMKSNKAKANIVDQSHLHDSSQKGVIDLALGITGRQVDLVKTKQEP  
 DDKRARKHVQDSNVNEEWSMFGSLDPPNMPQALPKGSDQEVITGKPPRSESSAGICV  
 PLSTSSQVPEVTTVQNKKPVIPVLSSTILPSTYQIRITTKTELQQLIQKREQCNAERI  
 AKQMMENA EWESKPPPPGWRPKGLLVVAHLHEHKS AVNRIRVSDHSLFATCSNDGTVKIW  
 NSQKMEGKTTTTTRSILTYSRIGGRVKTTLTFCQGSHYLAIASDNGAVQLLGIEASKLPKSP  
 KIHPLQSRILDQKEDGCVVDMHFNLSGAQSVLAYATVNGSLVGDWLRSSSNAWTLKHDLK  
 SGLITSFAVDIHQCWLCIGTSSGTMACWDMRFQLPISSHCHPSRARIRRLSMHPLYQSWV  
 IAAVQGNNEVSMWDMETGDRRFTLWASSAPPLSELQSPHVSVHGIYCSPADGNPILLTAG  
 SDMKIRFWDLAYPERSYVAGSTSSPSVSYRKIIEGTEVVQEIQNKQKVGPSDDTPRRG  
 PESLPVGHDDIITDVATFQTTQGFIVTASRDGVIVKWK

>sp|P22219|VPS15\_YEAST Serine/threonine-protein kinase VPS15  
OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VPS15  
PE=1 SV=4  
MGAQLSLVVQASPSIAIFSYIDVLEEVHYVSQLNSSRFLKTCKALDPNGEIVIKVFIKPK  
DQYSLRPFQIRIRAQSFKLGQLPHVLNYSKLIETNRAGYMIRQHLKNNLYDRLSLRPYLQ  
DIELKFIAFQLLNALKDIHNLNIVHGDIKTENILVTSWNWCILTDFAAFIKPVYLPEDNP  
GEFLFYFDTSKRRTCYLAPERFNSKLYQDGKSNNGRLTKEMDIFSLGCVIAEIFAEGRPI  
FNLSQLFKYKSNYSYDVNREFLMEEMNSTDLRNLVLDMIQLDPSKRLSCDELLNKYRGIFP  
PDYFYTFIYDYFRNLVMTTSTPISDNTCTNSTLEDNVKLLDETTEKIYRDFSQICHCLD  
FPLIKDGGEGISDPPILESYKIEIEISRFLNTNLYFPQNYHLVLQQFTKVSEKIKSVKEE  
CALLFISYLSHSIRSIVSTATKLNLELLAVFAQFVSDENKIDRVVVPYFVCCFEDSDQDV  
QALSLLTLIQVLTSVRKLNLNENIFVDYLLPRLKRLNISNRQNTNYLRIVFANCLSDLA  
IIINRFQEFQHCNDNSMDNNTTEIMESSTKYSAKLIQSVEDLTVSFLTDNDTYVKMAL  
LQNILPLCKFFGRERTNDIILSHLITYLNDKDPALRVSLIQTISGISILLGTVTLEQYIL  
PLLIQTITDSEELVVISVLQSLKSLFKTGLIRKKYYIDISKTTSPLLLHPNNWIRQFTLM  
IIIEIINKLSKAEVYICILYPIIRPFEEFDVEFNFKSMISCKQPVSRSVYNLLCSWSVRA  
SKSLFWKKIITNHVDSFGNNRIEFITKNYSSKNYGFNKRDTKSSSSLKGIKTSSTVYSHD  
NKEIPLTAEDRNWIDKFHIIIGLTEKDIWKIVALRGYVIRTARVMAANPDFPYNNSNYRPL  
VQNSPPNLTNIMPRNIFFDVEFAEESTSEGQDSNLENQQIYKYDESEKDSNKLNINGS  
KQLSTVMDINGSLIFKNKSIATTTSNLKNVQLEPTSYHMSPNHGLKDNANVKPERKV  
VVSNSYEGDVESIEKFLSTFKILPPLRDYKEFGPIQEIIVRSPNMGNLRGKLIATLMENEP  
NSITSSAVSPGETPYLITGSDQGVIKIWNLKEIIVGEVYSSSLTYDCSSTVTQITMIPNF  
DAFAVSSKDGQIIVLKVNHYYQSEVVKFLNCECIRKINLKNFGKNEYAVRMRAFVNEEKS  
LLVALTNLSRVIIIFDIRTLERLQIIENS PRHGAVSSICIDECCVLILGTTRGIIDIWDI  
RFNVLIRSWSFGDHAPIHVEVCQFYGKNSVIVVGGSSKTFLTINWFVKGHCQYAFINSD  
EQPSMEHFLPIEKGLEELNFCGIRSLNALSTISVSNKILLTDEATSSIVMFSLNELSSS  
KAVISPSRFSDFVIPTQVTANLTMLLRKMKRTSTHSVDDSLYHHDIIINSISTCEVDETPL  
LVACDNSGLIGIFQ

## 20. Beclin-1 (BECN1)

>tr|K1QHY7|K1QHY7\_CRAGI Beclin-1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159  
GN=CGI\_10027731 PE=4 SV=1  
MATIKVESKSGTTHVSFVCQRCRQPLKLDHSFNTLDRQLLAELSAGPFLTGFSSLLDDV  
EVDENYSKRDIITSTPEPDEDAGDFLLGETSPGNMDNLSHRIRVSSALFDVMSGQSEIDH  
PLCEECTDNLLDQLDNQLKITEDECKDYREFLENLDSNHTEEDGSNLDVELQQQAEEQS  
LRQQLQNLETEQEHEALLEKEREISQKLQDEEDKYWKEYNEYKRQVQELEDEQRSVDNQ  
LKYAQTQLDKLKKTNVFNTHFIWHSGHFGTINNFRGLRPLSVPVDWNEINAAWGQTVLL  
LNSLAKKMNLTFRYRLVPPGNHYSYIESLSDKSKELPLYGSGGFRFFWDTKFDQAMVAFL  
DCLQQFKEEVEKGDTFGLPYKMEKGGKIEDSSTGTSSYSIKIQFNSEEQWTKALKYMLTNL  
KWGLAWVSSQFANK

>sp|Q14457|BECN1\_HUMAN Beclin-1 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=BECN1 PE=1 SV=2  
MEGSKTSNNSTMQVSFVCQRCRQPLKLDTSFKILDRVTIQELTAPLLTTAQAKPGETQEE  
ETNSGEEPFIETPRQDGVSRRFIPPARMMSTESANSFTLIGEASDGGTMENLSRRLKVTG  
DLFDIMSGQTDVDHPLCEECTDTLLDQLDQLNVTENECQNYKRCLEIILEQMNEEDDSEQL  
QMELKELALEEERLIQELEDVEKNRKIVAENLEKVQAEAERLDQEEAQYQREYSEFKRQQ  
LELDDELKSVENQMRYAQTQLDKLKKTNVFNATFHIWHSGQFGTINNFRGLRPLSVPVEW  
NEINAAWGQTVLLLHALANKMGLKFRYRLVPGNHSYLESITDKSKELPLYCSGGLRFF  
WDNKFHAMVAFLDCVQQFKEEVEKGETRFCLPYRMDVEKGIKIEDTGGSGGSYSIKTQFN  
SEEQWTKALKFMLTNLKWGLAWVSSQFYNK

>sp|Q02948|BECN1\_YEAST Vacuolar protein sorting-associated protein 30  
OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VPS30  
PE=1 SV=1  
MKCQTCHLPLQLDPSLEGLSLTQRNLLLSNNSIITATNENVISNKGIEAADNCGPQIPKE  
RLRRLGEIQNIKDLNLKDDKLITDSFVFLNHDDDDNANITSNSREDQRYGNANGNDNKKA  
NSDTS DGTSTFRDHDEEEQEATDEDENQQIQLNSKTLSTQVNAMTNVFNILSSQTNIDFP  
ICQDCCNILINRLKSEYDDAIKERDTYAQFLSKLESQNKEISESNKEKQYSHNLSEKENL  
KKEEERLLDQLLRLEMTDDDLGELVRLQEKKVQLENEKLOKLSQNLMDLNNIQFNKLN

QSLKLOYELSLNQLDKLRKINIFNATFKISHSGPFATINGLRLGSIPESSVVPWKEINAAL  
 GQLILLLATINKNLKINLVYDELQPMGSFSKIKKRMVNSVEYNNSTTNAPGDWLILPVYY  
 DENFNLGRIFRKETKFDKSLETTLEIIESEITRQLSTIASSYSSQTLTTSQDESSMNNAND  
 VENSTSILELPYIMNKDKINGLSVKLHGSSPNLEWTTAMKFLLTNVKWLAFSSNLLSKS  
 ITLSPTVNYNDKTISGN

## 21. Beclin 1-associated autophagy-related key regulator (ATG14)

>tr|K1QJY6|K1QJY6\_CRAGI Uncharacterized protein OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10002920 PE=4 SV=1  
 MGSLCENYVVLVLSCSWSLLVRVWVKNKTSTRLLLLDWMVDLNALEYLADKLOQDKGIKYAP  
 NTLIFGMFDQFFRAPEVKPVGVGVDPGVEAEDDKSSKSQSVSTQCFLKVEIASTKKSYP  
 ASSLSRIYTVLRAIKQTQASVHKVRRSIEDKLLSSQETTRKRAEHEDLLLKREQLCAEVT  
 WRTASVNKMKDQADQLHRSNQEQTAMKKNKEKLEEKQREQAEEKKKDYDQTRYSSKDDNM  
 IGVSLGYTCHLLLMISGILDIPLRYSMTHLVSKSVIRDDIHSRLEDKERDFPLYSKGKEQ  
 NLFYRGVFTLNKNISQMRFYLGMGTVDLRRTLMNIKTLLLENRLGLKPESQTAQLRPASEP  
 GDRQYSDFDRDTRSSLASYGMAVDFRRELSVPPTEESSRQSSPNLHEVEEKEIFHPSS  
 DDNFFKISNPVSERLADFESEINGCAQDVTNFKPSNRRQTCWNGVGSNDFNAGDQPEE  
 DHIYETPLPVQNTNNLEHKFFVFMHDGVYPVVPVAVIMNRKQELAE

>tr|K1QSF1|K1QSF1\_CRAGI Uncharacterized protein OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10025388 PE=4 SV=1  
 MYFRYKEKRFLDLHLQKERQGRLEVRVQDALKQHMQRDQKQIGEIEKCRERINLLKMALTA  
 KEKKRKSKEIFDKKKRENYLRVVKGRKHEEKKKRIYSYIETVMSNEEKKELCLOKQRQL  
 AAERKIQVQRLVEFIFQVEEVALISESDSMVSTVSALRDASHTAYVRGQWVYTDGSGEA  
 QYRIVEPTLPCSGDYSAYNLWVAASQENGNPDNSLRNPGHRISAGLCYASQMTAILSHI  
 LDIRLPRKQPYSEFCTNEITERQFKHVSASLNQNILYLFCFSQVSPNPERLDPRLQNLIV  
 VLLSCPLLGRNSNFEIDKDLMASIEDSIIIFQEEDSDTGGMEDEMINDWEQVSEDVTVYVTD  
 VPARSGYSSTLSNIQTMSYPGPPEQLTASGFVTSAAATSFIESLYQYIFYIETHSFLDVY  
 IGTMWQLSYMPFVDKENILQMFPPKVFVAVAFPLAIGVIGLLVIGLFTSVTMSQRKGVNV  
 SKKS

>sp|Q6ZNE5|BAKOR\_HUMAN Beclin 1-associated autophagy-related key regulator  
 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=ATG14 PE=1 SV=1  
 MASPSGKGARALEAPGCGPRPLARDLVDSVDDAEGLYVAVERCPLCNTTRRRRLTCAKCVQ  
 SGDFVYFDGRDRERFIDKKERLSRLKSKQEEFQKEVLKAMEGKWITDQLRWKIMSCKMRI  
 EQLKQTICKGNEEMKNSSEGLLKTKEKNQKLYSRAQRHQEKKEKIQRHNRKLGDLVEKKT  
 IDLRSHYERLANLRSHILELTSVIFPIEEVKTGVRDPADVSSESDSMTSSTVSKLAEA  
 RRTTYLSGRWVCDHNGDTSISITGPWISLPNNGDYSAYYSWVEEKKTTQGPDMEQSNPA  
 YTISAALCYATQLVNILSHILDVNLPKCLKNSEFCGENLSKQKFTRAVKKNANILYLFCF  
 SQHVNLQPLHLTLRNLMLVSPSSEHLGRSGPFVVRADLEESMEFVDPGVAGESDESG  
 DERVSDEETDLGTDWENLPSPRFCDIPSQSVEVSQSQSTQASPIASSSAGGMISAAAAS  
 VTSWFKAYTGHR

>sp|P38270|ATG14\_YEAST Autophagy-related protein 14 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG14 PE=1 SV=1  
 MHCPICHHRAHVYCAHCINTSPSLLLKLLDLILLKDKENKELNGKVEQILNEAMNYDQL  
 DIKRMEKKKDPLMNSLMKLDVLRMKKNNLIRHRIEQLNERIYSKRNHISELKVEIDNYK  
 CYKVGTTGDKLREQVEISDAKNKLAQVSKICESARDYKLNLLNNWVFIQKLQDNFQIPFA  
 IAFQPLISLKNFRILPLAITNDSINIMWKYISFFSDILMIKLPYTNKICEQPMFEFSDSI  
 QTVVQRLIKLIINILQICRHLKLVSTPMDIPWLLDQYDQVDFGLFYNMVKNKMKCRSVSL  
 YWTFGMLYSMLVLDNMNNPQRGHPARRTAPPPTVTGPHDRWYVVG

## 22. Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 (AMBRA1)

>tr|K1QU33|K1QU33\_CRAGI Activating molecule in BECN1-regulated autophagy  
 protein 1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10018685 PE=4 SV=1  
 MTKFNLLSYLSNRERGRVKFKLQKSATLEYLEEKGSKPIINQPCELSGKCRATFLMDFSP  
 DGTKVASTHGHTVRVSDVATGKCLHILRGHPRTWCIAFHPTSNQILASGCLGGEVRIW

DLHGFGEVWRSKDNYEITSLTFHPTDHVLFVSVTNHIYFWDWSQPEPFVCKTNYEYEK  
 IRVVKFDPLGQFLYTGIANNTTVRPPSRVSFISGNTHPNTVFNASRTQQLSNVYDSLVEC  
 FQASRRDRVLRNTEAGQDPQSVSNTQHGASNHQHSVPVHEEGLSLARQYASHITQSSQRSM  
 QGMSQRPEIPSGASNSSSSPDTMDGISSPANPVLAMQPPRGASADNDVSGESPPSIVSV  
 DGESSQTRAVSNHPRSERVPGTLIVTERSPEQTSPPFQSLDTSSGVRIVSEAQSVRGILN  
 DQVHASTTAFIAIAPEEEPAEEVIVSLSELTSRGLSEEHLHSSNTDCDRLNCPVCGNFDT  
 THIRRVCESEMFTQLRARRRSLQNSMNNVSARSASFSPYTYNRHGSLVRPEIHSIQDPSQ  
 LGEMHEIRRVENPNAGASNMDHVSNNNSAPSNTTEGDARLTQVGDNDICASIENFATIT  
 ARIEREMNELDRRINNLNRTFNESLRLQHRVSVFLSAREGDVNGRRPSFIVARHTQQAE  
 GASSSRPEDSTHSLDRGQHLLLETALRSSRPDRTGSHSHSVPRELDSHAWQSLERHHLHP  
 HYSVSIILDNTINRPNDPIQTAINRAIADAFMGRGEPVATNIINHTYRIQAWDFSRCNIP  
 DLTDTKSNIVVQHCKLHNDASCNLSQDGTMLATFVPSHRGFPDDNIMAVYSLEPKTRGQC  
 LFTKSFGNPAISVLSLPGSGYVMVGLAAKQLSWVFTPNQHITDVMHPCDMDIRTHVSVNS  
 ARWMPGSGEGIVYGTNRGDLHVCPRPGTKKSVAGDNSDDRSIRRNLMHMLRMSGEQDVPRI  
 NTSTQTPGVRRSASTQTDTDSDM

>sp|Q9C0C7|AMRA1\_HUMAN Activating molecule in BECN1-regulated autophagy  
 protein 1 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=AMBRA1 PE=1 SV=2

MKVVPEKNAVRILWGREARGAMGAQRLLQELVEDKTRWMKWEKRVLPDSRSTFLLA  
 FSPDRLLASTHVNHNIYITEVKTGKCVHSLIGHRRTPWCVTFHPTISGLIASGCLDGEV  
 RIWDLHGGSSESWFTDSNNAIASLAFHPTAQLLLIATANEIHFWDWSRREPFAVVKTASEM  
 ERVRLVRFDPGLGHYLLTAIVNPSNQGDDEPEIPIDGTELSHYRQRALLQSQPVRRTPLL  
 HNFLHMLSSRSSGIQVGEQSTVQDSATPSPPPPPPQPSTERPRTSAYIRLRQRVSYPTAE  
 CCQHLGILCLCSRCSTRVPSLLPHQDSVPPASARATTPSFSFVQTEPFHPPEQASSTQQ  
 DQGLLNRPSAFSTVQSSTAGNTRLNLSLGPTRRSLGGPLSSHPSRYHREIAPGLTGSEWT  
 RTVLSLNSRSEAESMPPRPTSASSVLSLSVLRQOEGGSQASVYTSATEGRGFPASGLATE  
 SDGGNGSSQNNSGSIRHELQCDLRRFFLEYDRLQELDQSLSGEAPQTQQAQEMLNNNIES  
 ERPGPSHQPTPHSSENNNLNRGHLNRCRACHNLLTFNNDTLRWERTTPNYSSGEASSSW  
 QVPSSFESVPSGSQLPPLERTEGQTPSSSRLELSSSASPQEERTVGVAFNQETGHWERI  
 YTQSSRSGTVSQEALHQDMPEESSEEDSLRRRLLESLLISLSRYDGAGSREHPIYPDPAR  
 LSPAAYYAQRMIQYLSRRDSIRQRSMRYQQNRLRSSTSSSSSDNQGPSVEGTDLEFEDFE  
 DNGDRSRHRAPRNARMSAPSLGRFVPRRFLPEYLPYAGIFHERGQPLATHSSVNRVLA  
 GAVIGDQGSAVASNIANTTYRLQWDFTKFDLPEISNASVNVLVQNCKIYNDASCDISAD  
 GQLLAAFIPSSQRGFPDEGILAVYSLAPHNLGEMLYTKRFGPNAISVLSLPMGRYVMVGL  
 ASRRLLLHPSTEHMVAQVFRALQQAHGGETSMRRVFNVLVYMPADQRRHVSINSARWLPEP  
 GLGLAYGTLNKGDLLVICRPEALNSGVEYYWDQLNETVFTVHSNSRSESRPGRATWRTRDR  
 DMGLMNAIGLQPRNPATSVTSQGTQTLALQLQNAETQTEREVPEPGTAASGPGESEY  
 GASGEDALSRIQRLMAEGGMTAVVQREQSTTMASMGGFNNIIVSHRIHRSSQTGTEPGA  
 AHTSSPQPSTSRGLLPEAGQLAERGLSPRTASWDQPGTPGREPTQPTLPSSSPVPIPVSL  
 PSAEGPTLHCELNNHLLDGGSSRGDAAGPRGEPNR

### 23. UV radiation resistance associated protein (UVRAG)

>XP\_019925412.1 PREDICTED: UV radiation resistance associated protein

[**Crassostrea gigas**]

MGSLCENYVVLVLSWSLLVLRVWVKNKTSTRLLLLDWMVDLNALEYLADKQLQDKGIKYPNTLIFGMFDQ  
 FFRAPEVKPVGVGVDPGVEAEDDKSKSQSVSTQCFLKVEIASTKKSYTASSLSRIYTVLRAIKQTQAS  
 VHKVRSIEDKLLSSQETTRKRAEHEDLLLKREQLCAEVTWRTASVNMKMDQADQLHRSNQEQETAMKKN  
 KEKLEEKQREQAEEKKDYDQTREKLKESAQLFIRRKQLIRELATYIYPITEKKGLYYIANVYLPNSED  
 QGKDDNMIGVSLGYTCHLLLMISGILDIPLRYSMTHLVSKSVIRDDIHSRLEDKERDFLYSKGKEQNL  
 RYGVFTLNKNI SQMRFYLGMGTVDLRRTTLMNIKTLENRLGLKPESQTAQLRPASEPGDRQYSDFDRTDT  
 RSSLASVGRMAVDFRRELSVPPTTESSRQSSPNLHEVEEKEIFHPSSDDNFFKISNPVSERLADFESEIN  
 GCAQDVTNFHKPSDNRRTQTCWNGVGSNDFNAGDQPEEDHIYETVNVNRKTASESLDKSPSPSNILSS

>sp|Q9P2Y5|UVRAG\_HUMAN UV radiation resistance-associated gene protein  
 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=UVRAG PE=1 SV=1

MSASASVGGPVPQPPPGPAAALPPGSAARALHVELPSQQRRLRHLRNIAARNIVNRNGHQ  
 LLDTYFTLHLCSTEKIYKEFYRSEVIKNSLNPTWRSDFGIMPDRLDTSVSCFVVKIWWG  
 KENIYQLLIEWKVCLDGLKYLGGQIHARNQNEIIFGLNDGYGAPFEHKGYSNAQKTILL  
 QVDQNCVRNSYDVFSLRLHRAQCAIKQTQVTVQKIGKEIEEKLRLTSTSNELKKKSECL

QLKILVLQNELERQKKALGREVALLHKQOIALQDKGSFAFSAEHLKLQKESLNELRKEC  
TAKRELFLKTNQTLIRCRQLLSELSYIYPIDLNEHKDYFVCGVKLPNSEDFOAKDDGSI  
AVALGYTAHLVSMISFFLQVPLRYPPIHKGSRSTIKDNINDKLTEKEREFLYPKGGEKL  
QFDYGVYLLNKNIAQLRYQHGLGTPDLRQTLPNLKNFMEHGLMVRCDRHHTSSAIPVPKR  
QSSIFGGADVGFSGGIPSPDKGHRKRASSENERLQYKTPPPSYNSALAQPVTTVPVSMGET  
ERKITSLSSSLDTSDFSKENKKKGEDLVGSLNNGGHANVHPSQEQGEALSGHRATVNGTL  
LPSEQAGSASVQLPGEFHPVSEAEELCCTVEQAEEIIGLEATGFASGDQLEAFNCIPVDSA  
VAVECDQVLGEFEFESRRIYALNENVSSFRPRRSDK

>sp|Q05919|VPS38 YEAST Vacuolar protein sorting-associated protein 38  
OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VPS38  
PE=1 SV=1

MKRFLLSRRQRHLRMICFHNISLFRANGDSKLIKEYGDGFIPCFFILESIRGELLYVSEV  
QSGSLRKLFSQELPKLTGASTMIVLKLVLVPSDILCTISSDKNGIIDDKWCVLCTYTID  
LNKLPINEDTVLITGTNAPVLDLIDGSYTLAAEKIKPLKGLVSSHKNRISQVKIKFSLA  
YSSLLKLNKLLYSSQVHEEINEISSKIEDDFLSLKNQNHWMRTVQKSIETLEKEVLQR  
KKSCKNIEMAQLESNDTINHSKTELSLMSQDESINDDYGSISRFVQIKDRDLQLRFKKL  
YQLIGIFHSTDLFNSDRGYIYFEKPSVNDVINRLKPLNIEILLRQAGESTKHREYVN  
SQLGYLLFLHLTAIQIFKAPLPYRLMYYGSTSVIDSQYPLYFTDQMI SKHQAKLIKAIH  
YFNADILQFKQILENYRPT

#### 24. run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein (RUBICON)

>XP\_011419540.1 PREDICTED: run domain Beclin-1-interacting and cysteine-  
rich domain-containing protein isoform X3 [**Crassostrea gigas**]  
MSDEVNADHNYRSERQSLLFGLKAVTEGLLSGQSSNVWNIHGGLNRMVCVLEHIMYHGLKSIGKNFWIEL  
DFWPFVYSLKMLNPVLAPALDKVNRSGGKSGMWLRESLRDHTLSSQLSTLVCNKSLMKRFYGDLAFLND  
AQYFKALCVCLKAIELNQISLLAELDLKLLSNHEPNMRGSRSRWAVPERKHHSTSEGKSSSHGAMAL  
APPFASPKKESILCMSDEHAVPSSIRASTSPEDTKNMARESLRTVLRKSGSDSPTGDAPDFSFYDNLNSD  
PLLNIEFSENAATDSENSHAEVGSGERIVNSSPKKAIIVRSQSDTGMSKTLTVIKNIYKDNEDFEPGKSGT  
VNRLEDIFSDSECPKKGEEENVKVKAKSKGHRSRSDHGGIKVEKGPQKEKGVNKTQREDSSEPASKD  
IPGETTFRQPVHQSLINYLSSQDFNTCANLDKENAHFSISEALIAAIEQMKNWHVISPDKREDPEEEDS  
DEEINKLKQIRIRIRKQKDLREKAKFFPTSSDGLTETATTSKSPSSVLNNSCQDNTDSSNSDIEVDEINLT  
NADLQKVKPDRQSSMEISDQSGMSAESVAILLKLFSEKQLPKASELEWLVP ISEAPQELLPLPKSYVPS  
PDDIENEIGGFTNSLFGTLRLRGNNEWAPPRSQIIFDIHPYQKRAVVMKQNFRCAGCGTRVEPAYIKRF  
RYCEYLKGYFCQCHRNEINYIPGHIIRKWDFKQYPVSNFSWRLLSRIFNOPYFNLSTINPSLFKRVKLL  
ETVHAFRVQLMYLCKFLRICKYSER

>sp|Q92622|RUBIC\_HUMAN Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich  
domain-containing protein OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=RUBCN PE=1 SV=4

MRPEGAGMELGGGEERLPEESRREHWQLLGNLKTVEGLVSTNSPNVWSKYGGLERLCRD  
MQSILYHGLIRDQACRRQTDYWFVKDIRWLSPHSALHVEKFISVHENDQSSADGASERA  
VAELWLQHSLOYHCLSAQLRPLLGDRQYIRKFYTDAAFLLSDAHVTAMLQCLEAVEQNNP  
RLLAQIDASMFARKHESPLLVTKSQSLTALPSSTYTPPNSYAQHSYFGSFSLLHQVSPNN  
GSERRSTSFPLSGPPRKPQESRGHVSPAEDQTIQAPPVSVSALARDSPLTPNEMSSSTLT  
SPIEASWVSSQNDSPGDASEGPEYLAIGNLDPRGRTASCQSHSSNAESSSSNLFSSSSSQ  
KPDSAASSLGDQEGGGESQLSSVLRSSFSSEGQTLTVTSGAKKSHIRSHSDTSIASRGAP  
ESCNDKAKLRGPLPYSGQSSEVSTPSSLYMEYEGGRYLCSGEGMFRPSEGSLSIYLSE  
QDFGSCADLEKENAHFSISESLIAAIELMKNMMSQCLEEEVEEEDSDREIQELKQKIR  
LRRQQIRTKNLLPMYQEAHGSFRVTSSSSQFSSRDSAQLSDSGSADEVDEFEIQDADIR  
RNTASSSKSFVSSQFSHCFHSTSAEAVAMGLLKQFEGMQLPAASELEWLVP EHDAPQK  
LLPIPDSLPI SPDDGQHADIYKLRIRVRGNLEWAPPRPQIIFNVHPAPTRKIAVAKQNYR  
CAGCGIRTPDYIKRLRYCEYLKGYFCQCCHENAQMAIPSRVLRKWDFSKYVVSNF SKDL  
LIKIWNDFLVNQDINSALYRKVKLLNQVRLLRVQLCHMKNMFKTCRLAKELLDSFDTPV  
GHLTEDLHLYSLNDLTATRKGELGPRLAELTRAGATHVERCMLCQAKGFICEFCQNEDDI  
IFPFELHKCRTCEECKACYHKACFKSGSCPRCERLQARREALARQSLESYLSDYEEEPAE  
ALALEAAVLEAT



**25. Endophilin-B1**

>tr|K1Q963|K1Q963\_CRAGI Endophilin-B1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159  
 GN=CGI\_10012647 PE=4 SV=1  
 MDANTGLFKMKKFVSDASTVFNRAVQFTEEKLGSAEKTELDHAFENLLQRADKTKAWTEK  
 ILKQTESVLQPNPNIRMEDFVYEKLDKKKRDRVNHHEVLGHVLDVGGNDFGPGTTYGNAL  
 VKCGQAQLRIGNAEREFIQTTSNNFLQPLHNFLEGDMKTIQKEKKILETKRLDLDAASKNR  
 LRKAKSTSQPQSSQNSPQNVLMVVEAEADLRVAQAEFDRQAEITKLLLEGVSSAHAHHLR  
 CLNDFIEAQLTYAQCQNYISELQQQLGYSYHTSGVGNSSNSGAGISSGIPSSVPLQP  
 SAPPQINVIATPNIEKKQARVLYDYDAADSSSELTLLADELITVYKTPGLDPDWLMAERG  
 PQKGVPTTYLEVLE

>sp|Q9Y371|SHLB1\_HUMAN Endophilin-B1 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=SH3GLB1  
 PE=1 SV=1  
 MNIMDFNVKLAADAGTFLSRAVQFTEEKLGQAEKTELDHLENLLSKAECTKIWTEKIM  
 KQTEVLLQPNPNARIEEFVYEKLDKAPSRINNPELLGQYMIDAGTEFGPGTAYGNALIK  
 CGETQKRIGTADRELIQTSALNFLTPLRNFIEGDYKTIAKERKLLQNKRLDLDAKTRLK  
 KAKAAETRNSSEQELRITQSEFDRQAEITRLLLEGISSTHAHHLRCLNDFVEAQMYYAQ  
 CYQYMLDLQKQLGSPNSYLSNNNQTSVTPVPSVLPNAIGSSAMASTSGLVITSPSNLSD  
 LKECSGSRKARVLYDYDAANSTELSLLADEVITVFSVVGMDSDWLMGERGNQKGVPIY  
 LELLN

**26. ubiquitin-like protein ATG12 (ATG12)**

>XP\_011416102.1 PREDICTED: ubiquitin-like protein ATG12 [**Crassostrea gigas**]  
 MSDDGNESRDSKNTETEEKSTPASPISHVAETKIDVLLKPADAPIMKKKKWAVDRNKRIGVWGEFIKKYL  
 KLTAQDSLFLYVNVQSFAPTPDTEIGSIFDCFGSDGKLVVLYHYCKTQAWG

>sp|O94817|ATG12\_HUMAN Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG12 PE=1 SV=1  
 MAEEPQSVLQLPTSIAAGGGLTDVSPETTTPEPPSSAAVSPGTEEPAGDTKKKIDILLK  
 AVGDTPIMKTKKWAVERTRTIQGLIDIFIKKFLKLVASEQLFIYVNVQSFAPSPDQEVGTYL  
 ECFGSDGKLVVLYHYCKSQAWG

>sp|P38316|ATG12\_YEAST Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG12 PE=1 SV=1  
 MSRIESENETESDESSIIISTNNGTAMERSRNNQELRSPHTVQNRLELFSRRLSQLGLA  
 SDISVDQVEDSSSGTYEQEETIKTNAQTSKQKSHKDEKNIQKIQIKFQPIGSIQQLKPS  
 VCKISMSQSFAMVILFLKRRLLKMDHVYCYINNSFAPSPQONIGELWVQFKTNDDELIVSYC  
 ASVAFG

**27. Autophagy protein 5 (ATG5)**

>tr|K1RAJ5|K1RAJ5\_CRAGI Autophagy protein 5 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159  
 GN=CGI\_10018604 PE=3 SV=1  
 MLLPKILISGRRKLHNMGENREIQKGVWEGRIPVAFRLSEEDTDGERPEPVYLMVPRISY  
 FPLHTEKINKHFLKYASEKESEEIWLHEDNQPLKWHYPVGLLFDLYGSETSLPWTITVHF  
 KDFPEEELLHCVSKDAVESHFMSISKEADSLKHRGQVINSMQKRDHKQLWTGLLHDKFDQ  
 FWSVNKKLMESSGDETFKYIPFRLYMVDRHYMTNLFRLPTEEGHHQSLKHLLLSAVPQFF  
 NEEEEFQKHVRIHGTEPLLDTPILWLSENFSFPDNFLHLVISDK

>sp|Q9H1Y0|ATG5\_HUMAN Autophagy protein 5 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=ATG5  
 PE=1 SV=2  
 MTDDKDVLDRDVFGRIPTCFTLYQDEITEREAEPYLLLPVSYLTLVTDKVKKHFQKVM  
 RQEDISEIWFYEGTPLKWHYPIGLLFDLLASSALPWNITVHFKSFPEKDLLHCPKDA  
 IEAHFMSCMEADALKHKSQVINEMQKKDHKQLWMGLQNDRFDFWAINRKLMEYPAEEN  
 GFRYIPFRIYQTTTTERRPFIQKLFRLPVAADGQLHTLGDLLEKVCPSAIDPEDGEKKNQVMI  
 HGIEPMLETPLQWLSEHLSYDPDNFLHISIIIPQPTD

>sp|Q12380|ATG5\_YEAST Autophagy protein 5 OS=**Saccharomyces cerevisiae**  
 (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG5 PE=1 SV=1  
 MNDIKQLLWNGELNVLVSIIDPSFLMKGSPREIAVLRIRVPRETYLVNMYMPLIWNKIKSFL  
 SFDPLTDSEKYFWFEHNKTPIPWNYPVGVLFDFCLAGKSATFTTSFENQVKDVLTFRLRIHL  
 VMGDSLPPPTIPIASSKTQAEKFWFHQWKQVCFILNGSSKAIMSLSVNEARKFWGSVITR  
 NFQDFIEISNKISSSRPRHIPLIIQTSRTSGTFRISQPTISMTGVNPTLKDIEGDILDVK  
 EGINGNDVMVICQIEIPWHMLLDLYSKLRSFDGFLYITLVPIKGGDKASSEL

## 28. Autophagy-related protein 16-1 (ATG16 L1)

>tr|K1RWG6|K1RWG6\_CRAGI Autophagy-related protein 16-1 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10012629 PE=4 SV=1  
 MDPKDLHWKHSLLLEQLRQRDKKEKEPFESLISSHWKHFEASQSLKSKNTQLTWEAEKLKE  
 ENLGLQIKVEQGGSGNSQALEQKLFKLEEVTELHRRRGENTQQIIDLNNALQDKEKEL  
 QGRDARLNDLLANELALKMEIKNLESTIMELEATNQMLKDEHQALQTYTGLEEKYRKVE  
 QDNQQLLERWIKQQAQMADQLNAENDQFMAVRQOKLRQDLEDAARENIQILPENQAGVYV  
 PTSIPICLSASLPTKAQYKFD AHDGDVNAVWRWSPSGSLFATGGADRKIKLWEVINGKCEC  
 KGILTGSNAGIMALDFDLEENTILGASNDFASRVWVSLTDHRVRHTLTGHSGKVLAAKFLG  
 DSFKVVS GSHDRTLKIIDLHRSVCVKTIFAGSSCNDLVTIHGTNIVSGHFDKRVRWFWSR  
 VDSNTNEILLQGRLTSLDLSLSPDKMSLLCCTRD DTLKVLDLRMNQISTTLAHD DFKVGCW  
 SRAVFRHSVIACSWHPVGSYVLSCEKQRKTVLWSDI

>sp|Q676U5|A16L1\_HUMAN Autophagy-related protein 16-1 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ATG16L1 PE=1 SV=2  
 MSSGLRAADFPRWKRHI SEQLRRRDRLQRQAFEEIILQYNKLEKSDLHSVLAQKLQAEK  
 HDVPNRHEISPGHDGTWVNDNLQEMAQLRIKHQEELTELHKKRGELAQVLVIDLNNQMQRK  
 DREMOMNEAKIAECLQTI SDLETECLDLRTKLCDLERANQTLKDEYDALQITFTALEGKL  
 RKTTEENQELVTRWMAEKAQEAANRLNAENKDSRRRQARLQKELAEAAKEPLPVEQDDDI  
 EVIVDETS DHTEETSPVRAISRAATKRLSQPAGGLLDSITNIFGRRSVSSFPVPQDNVDT  
 HPGSGKEVRVPATALCVFDAHDGEVNAVQFSPGSRLLATGGMDRRVKLWEVFGKCEFKG  
 SLGSGNAGITSIEFDSAGSYLLAASNDFASRIWTVDDYRLRHTLTGHSGKVL SAKFLLDN  
 ARIVSGSHDRTLKLWDLRSKVCIKTVFAGSSCNDIVCTEQCVMSGHFDKKIRFWDIRSES  
 IVREMELLGKITALDLNPERTELLSCSRD DLLKVIDLRTNAIKQTF SAPGFKCGSDWTRV  
 VFSPDGSYVAAGSAEGLYIWSVLTGKVEKVL SKQHSSINAVAWSPSGSHVVSVDKGCK  
 AVLWAQY

## 29. Autophagy-related protein 10 (ATG10)

>tr|K1PT50|K1PT50\_CRAGI Autophagy-related protein 10 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10025434 PE=4 SV=1  
 MAAGSISEDEYWD SIIFFLTLSKIDSKWTIVDTKDGRRF AKKTEVFILSTENKESTMND  
 DVIRNTELMEEQEEDTAAAFQVRGNSDVEVVTYEYHILYSPSYQVPVLYFNAHTQGGKLLA  
 LEEIWKRVDPDAYKERLSEERWTFITQQEHPLLGRPFYLLHPCHTADLMKN SPVLTDKRHY  
 IVSWLSAVGPPVGLKLPLEYGKLCVS

>sp|Q9H0Y0|ATG10\_HUMAN Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ATG10 PE=1 SV=1  
 MEEDEFI G EKTFRQYCAEFIKHSQQIGDSWEWRPSKDCSDGYMCKIHFQIKNGSVM SHLG  
 ASTHGQTCLPMEEFELPLDDCEVIETAAASEVIKYEYHVLYSCSYQVPVLYFRASFLDG  
 RPLTLKDIWEGVHECYKMRL LQGPWDTITQQEHPILGQPFVVLHPCKTNEFMTPVLKNSQ  
 KINKNVNYITSWLSIVGPPVGLNLPLSYAKATSQDERNVP

>sp|Q07879|ATG10\_YEAST Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG10  
 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG10  
 PE=1 SV=1  
 MIPYQEWHSQ LQSLYDSQIFHNWALCQDVHLNDEKDG LLLRLIPTRQLQKNTERIENKLL  
 NHIELYLTYSKYVNEPLLLLRIWEEKSIDGIPMTKMLLPTDIESLLDVQKGFQLGLDTII  
 NLEGSVWYSFHPCDTSCIVGDQAEFMSTYLRRVWSIFIFSWLGYEDS

### 30. Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A (MAP1LC3A)

>tr|K1R9V4|K1R9V4 CRAGI Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10021322 PE=3 SV=1  
MEMQKPFKERRSLTQRLKDVESIRTQHMDKIPVIIERYNGEKSLPMLDKTKFLVPDQVNM  
SELVKIIRRRQLHPSQAFYLVNNSMVSNTTPIAEVYEQEKDEDGFLYIVYASQETFG  
GSCH

>sp|Q9H492|MLP3A\_HUMAN Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=MAP1LC3A PE=1 SV=2  
MPSDRPFKQRRSFADRCKEVQQIRDQHPKIPVIIERYNGEKQLPVLDKTKFLVPDQVNM  
SELVKIIRRRQLNPTQAFLLVNHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYIMVYASQETFG  
F

>sp|P38182|ATG8\_YEAST Autophagy-related protein 8 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG8 PE=1 SV=1  
MKSTFKSEYPFEKRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQF  
VYVIRKRIMLPPEKAIIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGFYVVTYSGENTFGR

### 31. Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (MAP1LC3B)

>sp|Q9GZQ8|MLP3B\_HUMAN Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=MAP1LC3B PE=1 SV=3  
MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPVIIERYNGEKQLPVLDKTKFLVPDQVNM  
SELIKIIRRRQLNANQAFLLVNGHSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYIMVYASQETFG  
MKLSV

>sp|A6NCE7|MP3B2\_HUMAN Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=MAP1LC3B2 PE=2 SV=1  
MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPVIIERYNGEKQLPVLDKTKFLVPDQVNM  
SELIKIIRRRQLNANQAFLLVNGHSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYIMVCASQETFG  
MKLSV

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [**Saccharomyces cerevisiae** S288C]  
MKSTFKSEYPFEKRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
PPEKAIIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGFYVVTYSGENTFGR

### 32. Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C (MAP1LC3C)

>tr|K1QLL7|K1QLL7 CRAGI Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C OS=**Crassostrea gigas** OX=29159 GN=CGI\_10020484 PE=3 SV=1  
MPEKGGDTYKTFKQRKSFVAVRKEEVVGIKSKFPTKVPVIVERYYYKEQLPMLDKTKFLVP  
QELSMSQFASIIIRNRMSLNSNQAFYLVNNSKISSMSMTLAEVYRDEKDEDGFLYIMTYAS  
QEMFGGC

>sp|Q9BXW4|MLP3C\_HUMAN Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3C OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=MAP1LC3C PE=1 SV=1  
MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLLPPLDKTKFLV  
PQELTMTQFLSIIIRSRMVLRAEAFYLLVNNKSLVSMASATMAEIYRDYKDEDGFLYIMTYA  
SQETFGCLESAAPRDGSSLEDRPCNPL

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [**Saccharomyces cerevisiae** S288C]  
MKSTFKSEYPFEKRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
PPEKAIIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGFYVVTYSGENTFGR

### 33. Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP)

>tr|K1PXH7|K1PXH7\_CRAGI Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein  
 OS=*Crassostrea gigas* OX=29159 GN=CGI\_10025849 PE=3 SV=1  
 MKWEYKEEHSFEKRRRAEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVGDLDKCKYLVPSDLTVGQF  
 YFLIRKRIHLRPEDALFFVNNVIPPTSATMGSLYQEHHEEDFFLYIAYSDESUYGA

>sp|O95166|GBRAP\_HUMAN Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein  
 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=GABARAP PE=1 SV=1  
 MKFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARIGDLDKCKYLVPSDLTVGQF  
 YFLIRKRIHLRAEDALFFVNNVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESUYGL

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [*Saccharomyces cerevisiae* S288C]  
 MKSTFKSEYPFEKRRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
 PPEKAIFIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGLYVVTYSGENTFGR

#### 34. Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (GABARAP L1)

>XP\_011437796.1 PREDICTED: gamma-aminobutyric acid receptor-associated  
 protein [*Crassostrea gigas*]  
 MKWEYKEEHSFEKRRRAEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVGDLDKCKYLVPSDLTVGQFYFLIRKRIHL  
 RPEDALFFVNNVIPPTSATMGSLYQEHHEEDFFLYIAYSDESUYGA

>sp|Q9H0R8|GBRL1\_HUMAN Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-  
 like 1 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=GABARAPL1 PE=1 SV=1  
 MKFYKEDHPFEYRKEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVPDLDRKYLVPSDLTVGQF  
 YFLIRKRIHLRPEDALFFVNNVIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESUYGK

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [*Saccharomyces cerevisiae* S288C]  
 MKSTFKSEYPFEKRRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
 PPEKAIFIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGLYVVTYSGENTFGR

#### 35. Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 (GABARAP L2)

>sp|P60520|GBRL2\_HUMAN Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-  
 like 2 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=GABARAPL2 PE=1 SV=1  
 MKWMFKEDHSLEHRCVESAKIRAKYPDRVPVIVEKVSQSIVDIDKRKYLVPSDITVAQF  
 MWIIRKRIQLPSEKAIFLFDVKTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSSENTFGF

>tr|K1QQ43|K1QQ43\_CRAGI Gamma-aminobutyric acid receptor-associated  
 protein-like 2 OS=*Crassostrea gigas* OX=29159 GN=CGI\_10027515 PE=3 SV=1  
 MKFKFREHTFEQRKAESTKIRDKYPERIPVIVEKDPKSQIQDIDKRKFLVPNDISVAQF  
 MWIIRKRIQLPSEKAIFLFDVGVLPQSSASMGQVYEEHKDEDGFLYIAYSSENTFGQ

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [*Saccharomyces cerevisiae* S288C]  
 MKSTFKSEYPFEKRRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
 PPEKAIFIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGLYVVTYSGENTFGR

#### 36. Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 3 (GABARAP L3)

>sp|Q9BY60|GBRL3\_HUMAN Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-  
 like 3 OS=*Homo sapiens* OX=9606 GN=GABARAPL3 PE=2 SV=1  
 MKFYKQEVHPFEYRKEGEKIRKKYPDRVPLIVEKAPKARVPDLDRRKYLVPSDLTDGQF  
 YLLIRKRIHLRPEDALFFVNNVIPPTSATMGQLYEDSHEEDDFFLYVAYSNSUYGK

>NP\_009475.1 ubiquitin-like protein ATG8 [*Saccharomyces cerevisiae* S288C]  
 MKSTFKSEYPFEKRRKAESERIADRFKNRIPVICEKAEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQFVYVIRKRIML  
 PPEKAIFIFVNDLPTAALMSAIYQEHKDKDGLYVVTYSGENTFGR

#### 37. Autophagy-related protein 7 (ATG7)

>tr|K1RAF7|K1RAF7\_CRAGI Autophagy-related protein 7 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10025698 PE=4 SV=1  
 MSFQQVYFGFCDPNSNIEDYPGWPLRNFLMLISYHWKGLRGVNVLCRDRSRDGTDRDISH  
 SLLLSLNVDPDIRNVEPCPKCVGWKNEKQKLAAPRFVNLASMDPTRLAASAVDLNLKLMR  
 WRLLPELDDLISRTKCLLLGAGTLGCNVARCLMGWGVRTITLVDNGRVSYSNPVRQSLF  
 QFEDCVKGGKPKAEAAAEAMKKIFPGVNAKGLSLSIPMPGHAVPEAIEGVKKDVETLQD  
 LVNSHDAVFLLLDLTRESRWLPTLMAAEKQKIVICCSALGFDTYLVMRHGVRSDTEGADPAP  
 LSSYSSIPGDQLGCYFCNDVVAPGNSLKDRTLDQQCTVSRPGISYMASALAVELLVSVLQ  
 HPELGKAPADTSASDEHLSKDFVCPLGLVPHQQIRCFVSRFQQVLPACKAFDKCTACSKT  
 VIEQFRRDGDFLRRAFNDPSYLEDLTGLTQMHOETLDAEVWGFSDDEECSSMEVSSS

>tr|K1QKL2|K1QKL2\_CRAGI Autophagy-related protein 7 OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10002553 PE=4 SV=1  
 MSAPLVNKMERKQLQFVAFNSFLDSGFWHKLSENKLDVYGLDESQKEIKGFYFNGDPVGM  
 PCRMNVEFSAFDQDAKTPQRCLPMLGELHNTNTVDKFKCEDKEMISEAGKIIWDSIVSG  
 KALDTPPELLATFLLLTAFADLKKYHYWFCFPCLCPSTDITFDQEPKPKLYRLTAEEMEQ  
 FLQAYDTFQDAHPTFYQGFVAVLSKGNIVIEDVKYMNKFENTQEVYFGFCDPNSNIEDYPG  
 WPLRNFLMLISYHWKGLRGVNVLCRDRSRDGTDRDISHSLLLSLVCVDPDIKNVLECPKCV  
 GWKNEKQKLAAPRFVNLASMDPTRLAASAVDLNLKLMRWRLPELDDLISKTKCLLLG  
 AGTLGCNVAKCLMGWGVRTITLVDNGRVSYSNPVRQPLFQFEDCVKGGKPKAEAAAEAMK  
 KIFPGVNAKGLSLSIPMPGHAVPEGVKKDVETLQDLVNSHDAVFLLLDLTRESRWLPTLMA  
 AEKQKIVICCSALGFDTYLEMRHGVRSDTEGADLAPLSSYSSIPRDQLGCYFCNDVVAPGN  
 SLKDRTLDQQCTVSRPGISYMASALAVELLVSMLOHPELYLVLFKSPSMNKAENYINYS  
 TELQQSRCLPTKQNRMAKGIHKTKLHKNRQOS

>sp|O95352|ATG7\_HUMAN Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7  
 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=ATG7 PE=1 SV=1  
 MAAATGDPGLSKLQFAPFSSALDVGFWHELTQKKLNEYRLDEAPKDIKGYYYNGDSAGLP  
 ARLTLEFSAFDMSAPTARCCPAIGTLYNTNTLESFKTADKKLLEQAANEIWESI KSGT  
 ALENPVLLNKFLLLTFADLKKYHFYYWFCYPALCLPELPLIQGPVGLDQRFSLKQIEAL  
 ECAYDNLCQTEGVTALPYFLIKYDENMVLVSLKHYSDFFQQRKTKITIGVYDPCNLAQY  
 PGWPLRNFLVLAHRWSSSFQSVVVCFRDRTMQGARDVAHSII FEVKLPMAFSPDCPK  
 AVGWENQKGGMGPRMVNLSECMDPKRLAESVVDLNLKLMCWRLVPTLDLKDVKVSVKCLL  
 LGAGTLGCNVARTLMGWGVRHITFVDNAKISYSNPVRQPLYEFEDCLGGGKPKALAAADR  
 LQKIFPGVNAARGFNMSIPMPGHPVNFSSVTLEQARRDVEQLEQLIESHDVVFLMDTRES  
 RWLPAVIAASKRKLVINAAALGFDTFVVMRHGLKPKKQGGAGDLCPNHPVASADLLGSSLF  
 ANIPGYKLGCYFCNDVVAPGDSTRDRTLDQQCTVSRPGLAVIAGALAVELMVSVLQHPG  
 GYAIASSSDDRMNEPPTSLGLVPHQIRGFLSRFDNVLVSLAFDKCTACSSKVLQYERE  
 GFNFLAKVFNSSHSFLEDLTGLTLLHQETQAAEIWDMSSDETI

>sp|P38862|ATG7\_YEAST Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7  
 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG7  
 PE=1 SV=1  
 MSSERVLSYAPAFKSFLDTSFFQELSRKLDVVKLDSTCQPLTVNLDLHNI PKSADQVPL  
 FLTNRSEKHNKRTNEVPLQGSIFNFNVLDEFKNLQFLHQRALCEWEDGKIDINKC  
 VSFVVIISFADLKKYRFYYWLGVPFCQRPSSVTLHVRPEPSLKGLFSKQKWFVNYSKWV  
 CILDADDEIVNYDKCIIRKTKVLAIRDSTSTMENVPALTKNFLSVLQYDVPDLIDFKLLI  
 IRQNEGSFALNATFASIDPQSSSNPDMKVSGWERNVQKLAAPRVVDLSSLLDPLKIADQ  
 SVDLNLKLMKWIRLPDLNLDI IKNTKVLGAGTLGCYVSRALIAWVVRKITFVDNGTVS  
 YSNPVRQALYNFEDCGKPKAEALAAASLKRI FPLMDATGVKLSIPMIGHKLVNEEAQHDKF  
 DRRLRALIKEHDIIFLLVDSRESRWLPSLLSNIENTVINAAALGFDSYLVMRHGVRDEQSS  
 KQLGCYFCHDVVAPTDSLTDRTLDQMCTVTRPGVAMMASSLAVELMTSLLQTKYSGSETT  
 VLGDIPHQIRGFLHNFSLKLETPAYEHC PACSPKVI EAFTDLGWEFVKKALEHPLYLEE  
 ISGLSVIKQEVERLGNDFEWEDESDEIA

### 38. Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 (ATG3)

>sp|Q9NT62|ATG3\_HUMAN Ubiquitin-like-conjugating enzyme ATG3 OS=**Homo sapiens**  
 OX=9606 GN=ATG3 PE=1 SV=1

MQNVINTVKGKALEVAEYLTPVLKESKFKETGVITPEEFVAAGDHLVHHCPTWQWATGEE  
 LKVKAYLPTGKQFLVTKNVPYKRVKQMEYSDELEAIEEDDGGGWVDTYHNTGITGIT  
 EAVKEITLENKDNIRLQDCSALCEEEDEDEGEAADMEEYEEESGLLETDEATLDTRKIVE  
 ACKAKTDAGGEDAILQTRTYDLYITYDKYYQTPRLWLFGYDEQRQPLTVEHMYEDISQDH  
 VKKTVTIENHPLPPPPMCSVHPCRHAEMVKKI IETVAEGGGELGVHMYLLIFLKFVQAV  
 IPTIEYDYTRHFTM

>tr|K1R934|K1R934\_CRAGI Autophagy-related protein 3 OS=*Crassostrea gigas*  
 OX=29159 GN=CGI\_10024759 PE=3 SV=1  
 MQNVINAVKGTALNVAEKFTPVKESKFKETGVITPEEFVAAGDHLVHHCPTWQWSTGDE  
 SKVKPYLPKEKQYLITRNVPYKRVKQVDSHKEEQEKVIEADDEDGGWVDTHHFDPDGT  
 SLQDAVQEMTLDGKGRKSSSEEVKRSRDDDDDDDDDEEAMDMEAFFEQSGMLDEEDD  
 AALDPSTLGRQDSESAATESGILQTRTYDLNITYDKYYQTPRLWLFGYDENRKLPTVEQM  
 YEDFSQDHAKKTVTMEAHPLPGPPLASVHPCRHADVMKKI IQMVAEGGGDLGVHVYLM  
 FLKFVQAVIPTIEYDFTRDFTM

>sp|P40344|ATG3\_YEAST Autophagy-related protein 3 OS=*Saccharomyces cerevisiae* (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG3 PE=1 SV=1  
 MIRSTLSSWREYLTPITHKSTFLTTGQITPEEFVQAGDYLCHMFPTWKWNEESSDISYRD  
 FLPKNKQFLIIRKVPCKRAEQCVEVEGPDVIMKGAEDGDEDDVLEYIGSETEHVQSTP  
 AGGTKDSSIDDIDELIQDMEIKEEDENDDTEEFNAKGLAKDMAQERYDYLYIAYSTSYR  
 VPKMYIVGFNSNGSPLSPEQMFEDISADYRKTATIEKLPFYKNSVLSVSIHPCKHANVM  
 KILLDKVRVVRQRRRRELQEEQELDGVGDWEDLQDDIDDSLVRVDQYLIVFLKFITSVTPS  
 IQHDYTMEGW

### 39. Cysteine protease ATG4 (ATG4)

>tr|K1QKP1|K1QKP1\_CRAGI Cysteine protease OS=*Crassostrea gigas* OX=29159  
 GN=CGI\_10023225 PE=3 SV=1  
 MDMTNDVGTGTCMVTYESAALGYVDFPLTEEPVYLLGIKYSALYDRDELKGFDFLSKIWCTYR  
 KNFPAIGGTGPTCDGGWGCMLRCGQMMLAQALVVRHLGRDWKWNKNCQDQTYKRILQMFA  
 DKKSANYSIQQIASMGVSEGKPVGSWFGPNTVAQVLKKLAVYDEWSSIVIHAMDNNTVIE  
 NDIKSVCKDDGKSTCDIIGVRQLKHESAATGRSKSSQDSSKQDKNKQNAVDVKSWKPLL  
 LVIPLRLGLTEINSVYVQSLKACLSPQSVGIIGGKPNHAHWVGYMSDKLIYLDPHTTQ  
 LCEDLDSPNFSDESYPSTMNVMELDPSIALGFYCGTEKEFDDLTQSVQKFVVGSSK  
 TPMFELYKDRPPHPPPYESTGTTSASGVTMTGGQDTDEEFELV

>sp|Q8WYN0|ATG4A\_HUMAN Cysteine protease ATG4A OS=*Homo sapiens* OX=9606  
 GN=ATG4A PE=1 SV=1  
 MESVLSKYEDQITIFTDYLEEYPTDELVWILGKQHLLKTEKSKLLSDISARLWFTYRRK  
 FSPIGGTGSSDAGWGCMLRCGQMMLAQALICRHLGRDWSWEKQKEQPKEYQRILQCFLD  
 RKDCCYSIHQMAQMGVGEKSGIGEWFGPNTVAQVLKKLALFDEWNSLAVYVSMNDNTVIE  
 DIKKMCRVPLSADTAGDRPPDSLTAASNQSKGTSAYCSAWKPLLLIVPLRLGINQINPVY  
 VDAFKECFKMPQSLGALGGKPNNAFFIGFLGDELIFLDPHTTQTFVDTEENGTVNDQTF  
 HCLQSPQRMNINLNDPSVALGFFCKEEKDFDNWCSLVQKEILKENLRMFELVQKHPSHWP  
 PFVPPAKPEVTTTGAEFIDSTEQLEEFDLEEDFEILSV

>sp|Q9Y4P1|ATG4B\_HUMAN Cysteine protease ATG4B OS=*Homo sapiens* OX=9606  
 GN=ATG4B PE=1 SV=2  
 MDAATLTYDTLRFAEFEDFPETSEPVWILGRKYSIFTEKDEILSDVASRLWFTYRKNFPA  
 IGGTGPTSDTGWGCMLRCGQMIFAQALVCRHLGRDWRWTQRKRQPDYFVSVLNAFIDRKD  
 SYYSIHQIAQMGVGEKSGIGQWYGPNTVAQVLKKLAVFDTWSSLAVHIAMDNNTVMEEIR  
 RLCRTSVPCAGATAFPADSDRHCNGFPAGAEVTNRPSWPRPLVLLIPLRLGLTDINEAYV  
 ETLKHCFFMPQSLGVIGGKPNNAHYFIVYVGEELIYLDPHTTQPAVEPTDGCFFIPDESFH  
 CQHPPCRMSIAELDPSIAVGFCKTEDDFNDWCQVKKLSLLGGALPMFELVELQPSHLA  
 CPDVLNLSLSSDVERLERFFDSEDEDFEILSL

>sp|Q96DT6|ATG4C\_HUMAN Cysteine protease ATG4C OS=*Homo sapiens* OX=9606  
 GN=ATG4C PE=1 SV=1

MEATGTDEVDKLTCKFISAWNNMKYSWVLKTKTYFSRNSPVLGKCYHFYEDDKTLP  
 AESGCTIEDHVIAGNVEEFRKDFISRIWLTYREEFPQIEGSALTTDCGWGCTLRGTQMLL  
 AQGLLHLFLGRAWTPDALNIENSDESWSHTVKKFTASFEASLSGEREFKPTISLKE  
 TIGKYSDDHEMRNEVYHRKIIISWFGDSPALFGLHQLIEYGKKSCKKAGDWYGPVVAHI  
 LRKAVEEARHPDLQGITIYVAQDCTVYNSDVIDKQASMTSDNADDKAVIILVVPVRLGGE  
 RTNTDYLEFVKGILSLEYCVGIIGGKPKQSYFFAGFQDDSLIYMDPHYCQSFVDVSIKDF  
 PLETFHCPSPKMSFRKMDPSCITGFYCRNVQDFKRASEEITKMLKFSSEKEYPLFTFVN  
 GHSRDYDFTSTTTNEEDLFSSEDEKKQLKRFSTEEFVLL

>sp|Q86TL0|ATG4D\_HUMAN Cysteine protease ATG4D OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG4D PE=1 SV=1

MNSVSPAAAQYRSSSPEDARRRPEARPRGPRGPDNGLGSPGASGPALGSPGAGPSEPD  
 EVDKFKAKFLTAWNNVVKYGWVVKSRFSFSKISSIHLGRRYRFEFEGEDIQRFQDRDFVSR  
 WLTYRRDFPPLPGGCLTSDCGWGCMLRSGQMMLAQGLLLHFLPRDWTWAEGMGLGPPPELS  
 GSASPSRYHGPARWMPRWAQGAPELEQERRHRQIVSWFADHPRAPFGLHRLVELGQSSG  
 KKAGDWYGPSLVAHILRKAVESCSDVTRLVVYVSQDCTVYKADVARLVARPDPTAEWKS  
 VILVVPVRLGGETLNPVYVPCVKELLRCELCLGIMGGKPRHSLYFIGYQDDFLLYLDPHYC  
 QPTVDVVSQADFPLESFHCTSPRKMAFAKMDPSCITVGFYAGDRKEFETLCELTRVLS  
 SSSS ATERYPMFTLAEGHAQDHSLLDDLCSQLAQPTLRLPRTGRLLRAKRPSSEDFVFL

>sp|P53867|ATG4\_YEAST Cysteine protease ATG4 OS=**Saccharomyces cerevisiae**  
 (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG4 PE=1 SV=2

MQRWLQLWKMDLVQKVSHGVFEGSSEPAALMNHDIIVLGEVYPERDEESGAEQCEQDCR  
 YRGEAVSDGFLSSLFGREISSYTKEFFLLDVQSRVNFYRTRFVPIARAPDGPSPLSLNL  
 VRTNPISTIEDYIANPDCFNNTDIGWGCMI RTGQSLGALQILHLGRDFRVNGNESLERE  
 SKFVNWFNDTPEAPFSLHNFVSAGTELSDKRPGWFGPAATARSIQSLIYGFPECGIDDC  
 IVSVSSGDIYENEVEKVFVAENPNSRILFLLGVKLGINAVNESYRESICGILSSTQSVGIA  
 GGRPSSSLYFFGYQGNFLHFDPHIPQPAVEDSFVESCHTSKFGKQLQSEMPSMLIGIL  
 IKGEKDWQWKLEVAESAIINVLAKRMDDFDVSCSMDDVESVSSNSMKK DASNNENLGV  
 L EGDYVDIGAI FPHTTNTEDVDEYDCFQDIHCKKQKIVVMGNTHTVNANLTDYEVEGV  
 LVE KETVGIHSPIDEKC

#### 40. Sequestosome-1 (SQSTM1)

>tr|K1QI43|K1QI43\_CRAGI Sequestosome-1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159  
 GN=CGI\_10004110 PE=4 SV=1

MSLTVKAFVLVKGNEKAEIRRFTVPQDVSAFQDYDYLQKKIADIFPGLARGNFNLFWKDEDG  
 DLIASFSTGEELLEALGFVDNGLFRVFKPTSQSSGDKPAGNTPMQEHPGII CDGCEGKVI  
 GRRYKCTECPDYDLQSCESKGIHSEHNFMYDTPVHPGYGFPFSPWPPRPQCPPGPRGPS  
 GQGQPPCAPPHFFRWMERMARRQNRDNAGCPRSQRNAEDQGSNDTSGEGAYNPEEFQ  
 NVGQSVAAMLDPLGIDVQVDVEHGGRRCPAWGQGGGCKGKRSKGKCGQKCGKNGKEQEEKM  
 ESDKVEETE QMKTPEEATPMATDNADKLQTDGPSTSAENAPNPSEKVTKDFETWTFMEDGN  
 RSGRTPSPAPTVPQPPPTQLIYPPTDPRIAEALQQLGMGFHNEGGWLQNLLEQKEGNI  
 SQVLDAIQTRAKTTPDGGFMA

>tr|K1PXV3|K1PXV3\_CRAGI Sequestosome-1 OS=**Crassostrea gigas** OX=29159  
 GN=CGI\_10004109 PE=4 SV=1

MACWSVKAHLLGDDGKTSEIRRVSVVPSATYNQLYDKTKTVFPDLHNEEISLSWKDGDGD  
 LVSFSSDAEMLEFTRTAEDEFLRIFIKVRAPKSNKSTPKTPTGAEWVNPWIEKMSDLDS  
 EEFQSQSVLAGMRTVFQYIAGAETFHDKDRKIVDKSDVTNKEEREPSVCNNADHLHRDVTE  
 VRGTHKIEEALEKLLAMGFHNEEGWLYRLIEEKEGRIDEVLESILPDENRAGIYGAQSS  
 YQKHEASKPKSRDPVNRASYPSPCKNNRTKSHPETGGKPDIE TDGPVTRDDSPKNGESWT  
 LVEDDTS LAETKADQNLEEGGSTQGGGAERKSHNARPTIPPIDPKIASALAEEMMSMGFQ  
 N DDGWLCLLQENNGNIEKVLDDIIQGS DGKIYSK

>sp|Q13501|SQSTM\_HUMAN Sequestosome-1 OS=**Homo sapiens** OX=9606 GN=SQSTM1  
 PE=1 SV=1

MASLTVKAYLLGKEDAAREIRRFSCSPEPEAEAEAAAGPGPCERLLSRVAALFPALRP  
 GGFQAHYRDEGDGLVAFSSDEELTMAMSYVKDDIFRIYIKEKKECRDRHRPPCAQEAPRN

MVHPNVICDGCNGPVVVGTRYKCSVCPDYDLCSVCEGKGLHRGHTKLAFFSPFGHLSEGF  
 HSRWLRKVKHGHFGWPGWEMGPPGNWSRPPRAGEARPGPTAESASGSPSEDPSVNF LKNV  
 GESVAAALSPLGIEVDIDVEHGGKRSRLTPVSPESSTEEKSSSQSSCCSDPSKPGGNV  
 EGATQSLAEQMRKIALESEGRPEEQMESDNCSGGDDDWTHLSSKEVDPSTGELQSLQMP  
 SEGSSLDPSQEGPTGLKEAALYPHLPPEADPRLIESLSQMLSMGFSDDEGGWLTRLLQTK  
 NYDIGAALDTIQYSKHPPPL

#### 41. Autophagy-related protein 29 (Atg29)

>sp|Q12092|ATG29\_YEAST Autophagy-related protein 29 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG29 PE=1 SV=1  
 MIMNSTNTVVYIKVKGRRPQGFLDPPKFEWNGTKERQLWMTMVSNLNYSQDQIDWQNLSKI  
 FETPEFFLKKRKYKLF AEHLELLQLQLEKKRDLEKYSNDQVNEGMSDLIHKYTPTLQNDN  
 LLNVSASPLTTERQDSEEVETEVTNEALQHLQTSKILNIHKKTS DSENKPNDKLKDGIN  
 KEMECGSSDDDLSSSLSVKSALEALMDRLQF

#### 42. Autophagy-related protein 31 (Atg 31)

>sp|Q12421|ATG31\_YEAST Autophagy-related protein 31 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG31 PE=1 SV=1  
 MNVTVTVYDKNVKYRLEENIKNNKGPSNDDQPAYNNEKSTDGS DYAMFPTNIKYIFEDN  
 NDELVDSSDAALTAGIDKVGDELENNIIVQLDESGSLEDITLISDQYELLSHRTNSLSLE  
 ENQMRTLSSHGDDKSNDEEEELSVDSDRFRVSDIELDVISQFCDLSPFLRDLSLNDLIK  
 LYVTQNEQLQMLNSV

#### 43. Autophagy-related protein 20 (Atg20)

>sp|Q07528|ATG20\_YEAST Autophagy-related protein 20 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG20 PE=1 SV=1  
 MSDLNDVQENAKLNSETRNTGKAEPPHGTTEYVAEAEISKNGVSGPKKSPKKGKVGKGDN  
 NKVETELVHTALLEKDNPFMEEGPTGFTKSALLEIPGMRSHNLKPNEDYEDDSEGLLPL  
 NQESNAETCRTSLSGSINSMNGETSASEEPSVSNRKK SARIHILEAKRVSEGQGRAYIAY  
 VIQFENSTVQRRYSDFESLRSILIRLFPMTLIPPIPEKQSIKNYGKSITGSSSKYLLPSE  
 GSGSVDLSL SVIHASVNNSEKLRHRIRMLTEFLNKLLTNEEITKTSIITDFLDPNNHN  
 WHEFVNSSSTFSSLPKSI LQCNP LDPTNTTRIHAMLP I PGSSSQLLLNKESNDKMDKER  
 SKSFTNIEQDYKQYENLLDNGIYKYNRRRTTKTYHDLKSDYNEIGEVFAQFAHQAVGEL  
 AEQLSYLSNAFSGSSISLEKLVGRLYNINEPLNESVHMATSARELIKRYRKLKYLQNEMI  
 KKSLSNKRAQLEKLEAQNNEYKDVKIIDNEMSKSHTINLERPNNNTGSGGKSYGGKLFN  
 GFNKLASMVKDSVKYQETDPHTASINLKKEIEQLSESLVETENDLEVISKVIKNDQLPKF  
 SKEREVDLSEILKHYSRYMRNYARQNL EIWKEVKRHQDFA

#### 44. Sorting nexin-4 (Atg24)

>sp|P47057|SNX4\_YEAST Sorting nexin-4 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=SNX4 PE=1 SV=1  
 MTDKGNLDTSKAKDKARGNPEKPPYWFEEIIVSDPQKRTGDPGSSSGYVSYQISTKTNNNT  
 SFYDNRGDPESIIIVHRRYS DLLLLHDILLNRFP TCIIPPLPKKVFQYIAGDRFSQRFT  
 QKRCHSLQNF LRRVSLHPDLSQSKVFKTFLVSKDWESHKVLQDSLQPNKDEVTD AFMNA  
 FKTVHKQNEEFTEIREKSDKLDRTVTKIDKLFHKVVKKNDMSSEDTKLGSNLQELQELV  
 TGENEELA AKLKI FNEGVTQLSYGLQDLTKYLDY EYIVDLKDLEHYIDSMRQLIKLKDQK  
 QIDYEELS DYLTRS I KEKNNLISGYGGSNFFANKLEELAGINQEASRREKINKLEGKITS  
 LTGELENAKKVADGFEQECLKEIDHFESVKTA EIKKSLGSLADHHIEFYERILEAWEKVD  
 DSL

#### 45. Autophagy-related protein 23 (Atg23)

>sp|Q06671|ATG23\_YEAST Autophagy-related protein 23 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG23 PE=1 SV=1  
 MELNQVLEKKEQILQYLGTLVGLHEKALSDVNSASQVTSIRK DITICLNDLCRINDLLVS



HDGLLKREIGSLLRDKQELLELNEREQLLWKERKSWHIKQETDAAPADYVIDKDAIITIS  
 SHHRTSLNKYIESVGAENTILSNTDDSDAMIEEVQNAESSADQMIRNYKLLQLSHKQAKS  
 EIIRLETLLRDFKKNKFIEEELKRQSGRIRSEMGNIDFHLSKIEESKHQLMKRIGFESP  
 LTQEKSLSEKIFNLRLSSADEDYNERQTINMKNFVHMKDIELKIEDLQEQLMRNKNESS  
 TVLTQRELWLDCCQKVGDLKSLITKLRSSNSKIIPNEMSEMINSTIQYLNLLDSSDE  
 KLTTTLLISNERDVLKACEELHSESTTAQDGSSALPSKPIDIHKSHKGSNASSNLKQPST  
 PSFLVASKSPPKIGISESVVNANKNDASIKKVE

#### 46. Autophagy-related protein 27 (Atg27)

>tr|K1QA43|K1QA43\_CRAGI Uncharacterized protein OS=**Crassostrea gigas**  
 OX=29159 GN=CGI\_10013150 PE=4 SV=1  
 MKGVSELPLVVFVIFLSAFVTAVFGQCTYRDQCSCSLSDGSIIDLSTLGNQDQTPAFPDSF  
 ATDGYFYSPNCYSFIEGSCMNAAACQISGDQSTQYQIGDATSVTYSYDGTNVHALYSST  
 DSQGLTSLTTKACPNCGCAGPPPTNPTNPPGPPGSPSESDDSGISTGTILCIAVLAI  
 AVVYLVAGTVFTMGVRKSKGKEAIPNVSWTSLPGLIKDGFKFTFSKIRPGYSSVK

>sp|P46989|ATG27\_YEAST Autophagy-related protein 27 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG27 PE=1 SV=2  
 MVSKTWICGFISIIITVVQALSCEKHDVLLKKYQVGKFSSTLSTERDTPPSTTIEKWWINVC  
 EEHNVEPPEECKNDMLCGLTDVILPGKDAITTIQIIDFDKNIGFNVEETESALTLTLKGA  
 TWGANSFDKLEFQCNDNMKQDELTSHTWADKSIQLTLKGPSGLKSKDDDKNGDGDNG  
 KGDGSEGGKPAKKAGGTSWFTWFLYALLFTLIYLMVVSFLNTRGGSFQDFRAEFIQRST  
 QFLTSLPEFCKEVVSRIILGRSTAQRGGYSVA

#### 47. Autophagy-related protein 19 (Atg19)

>sp|P35193|ATG19\_YEAST Autophagy-related protein 19 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG19 PE=1 SV=1  
 MNNSKTNQMNNTSMGYPLTVYDECNKFLQIVPTLDANIMLWCIGQLSLLNDSNGCKHLFW  
 QPNDKSNVRILLNNDYDGHFLFKYLQCRKCSVYIGEGTLKKYNLTISTSFDFNFDLTPSE  
 EKESLCREDAHEDPVPKAGSEEEISPSTSNVVVSRECLDNFMKQLLKLEESLNKLELE  
 QKVTNKEPNHRISGTIDIPEDRSELVNFTELKTVKQLEDVVFQRYHDYERLSQECDSKTE  
 IASDHKKETKIEVEPPNERSLQITMNRDNLQYFQLFNNTNSVLAGNCKLKFTDAGDKP  
 TTQIIDMGPHEIGIKEYKEYRYFPYALDLEAGSTIEIENQYGEVIFLGKYGSSPMINLRP  
 PSRLSAESLQASQEPFYSFQIDTLPELDDSSIIISTISISLSYDGDNEKALTWEEL

#### 48. Autophagy-related protein 17 (Atg17)

>sp|Q06410|ATG17\_YEAST Autophagy-related protein 17 OS=**Saccharomyces cerevisiae** (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATG17 PE=1 SV=1  
 MNEADVTKFVNNARKTLTDAQLLCSSANLRIVDIKKKLSSWQLSISKLNFLIVGLRQQGK  
 FLYTILKEGIGTKLIQKQWNQAVLVVLVDEMKEYWQYEITSKVQRDLGIVNELSISEKDDT  
 DPSKLGDIYSRDNVLLNDKLKEVPVIERQIENIKLQYENMVRKVNKELIDTKLTDVTQK  
 FQSKFGIDNLMETNVAEQFSRELTDLEKDLAEIMNSLTQHFDKTLQLQDKKIDNDEREEL  
 FKVVQGGDKELYNIFKTLHEVIDDVDKTILNLGQFLQAKIKEKTELHSEVSEIINDFNRN  
 LEYLLIFKDISNLDLIDSFKNSTQDIQTTELCEFYDNFEESYGNLVLEAKRRKDVANRMK  
 TILKDCQKQLQNLDAQDQEEERQNFIAENGYLTPETIWPBKIDDFSSLYTLNYNVKNP

## Annexe C. Supplementary file n°2: List of amino acid sequences of the species used to performed phylogeny analysis of ATG7, ATG9A, ATG12 and ULK2.

All sequences are in Fasta format. The specie name of the sequence is highlighted in yellow.

### 1. ATG7

```
>MK173046|Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7
[organism=Crassostrea gigas] mRNA, complet cds
MSAPLVNKMESKQLQFVAFNSFLDSGFWHKLSNKLDVYGLDESQKEIKG
FYFNGDPVGMPCRMNVEFSAFDQDAKTPQRYLPLMGLHNTNTVDFKKEC
DKKEMISVAGKKIWDIVTGKALDTPPELLATFLLLTFFADLKKYHYWFC
FPCLCPSTDITFDQEPKLLKDKLTAEMEQLQAYDTFQDAYPTYQGFV
AVLSKGNIVIEDVKHMNFENTQEVYFGFCDPNIEDYPGWPLRNFMLLI
SYHWKGDRLRGVNLCLDRSRDGTDRDISHSLLLSLNVPDIKNVSECPKCV
GWEKNEKQKLAPRFVNLASMDPTRLAASAVDLNLKLMRWRLPELDDL
ISRKCLLLGAGTLGCNVARCLMGWVVRTITLVDNGRVSYSNPVRQSLFQ
FEDCVKGGKPKAEAAAAMKKIFPGVNAKGLSLIPMPGHAVPESAIEGV
KKDVETLQDLVNSHDAVFLLLDTRESRWLPTLMAAEKQKIVICSAFGFD
YLVMRHGVRSDTEGADPAPLSSYSSIPGDQLGCYFCNDVVAPGNSLKDRT
LDQQCTVSRPGISYMASALAVELLVSVLQHPHPELKGAPADTSASDEHLSKD
FVCPGLVPHQIRCFVSRFQQVLPACKAFDKCTACSKTVIEQFRRDGFDF
LRRAFNDPSYLEDLTGLTQMHQETLDAEVWGFSDDEECSSMEVSS
```

```
>sp|O95352|ATG7_HUMAN Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7
OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ATG7 PE=1 SV=1
MAAATGDPGLSKLQFAPFSSALDVGFWEHLETKKLNRYRLDEAPKDIKGYYYNGDSAGLP
ARLTLEFSAFDMSAPTARCCPAIGTLYTNTTLESFKTADKKLLEQAANEIWESI KSGT
ALENPVLLNKFLLLTFFADLKKYHFYYWFCYPALCLPESLPLIQGPVGLDQRFSLKQIEAL
ECAYDNLCQTEGVTALPYFLIKYDENMVLVSLKHYSDFFQQRKTKITIGVYDPCNLAQY
PGWPLRNFVLAHRWSSSFQSVVVCFRDRTMQGARDVAHSII FEVKLPMAFSPDCPK
AVGWEKNQKGGMGRMVNLSECMDPKRLAESVVDLNLKLMCWRLVPTLDLKDVKVSVKCLL
LGAGTLGCNVARTLMGWGVRHITFVDNAKISYSNPVRQPLYEFEDCLGGGKPKALAAADR
LQKIFPGVNAARGFNMSIPMPGHPVNFSSVTLEQARRDVEQLEQLIESHDVVFLLMDTRES
RWLPAVIAASKRKLVINAAALGFDTFVVMRHGLKPKKQGGAGDLCNHPVASADLLGSSLF
ANIPGYKLCYFCNDVVAPGDSTRDRTLDDQQCTVSRPGLAVIAGALAVELMVSVLQHPH
GYAIASSSDRRMNEPPTSLGLVPHQIRGFLSRFDNVLVSLAFDKCTACSSKVLQYERE
GFNFLAKVFNSSHSFLEDLTGLTLLHQETQAAEIWDMSDETI
```

```
>sp|Q9D906|ATG7_MOUSE Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 OS=Mus musculus
OX=10090 GN=Atg7 PE=1 SV=1
MGDPGLAKLQFAPFNSALDVGFWEHLETKKLNRYRLDEAPKDIKGYYYNGDSAGLPTRLT
LEFSAFDMSASTPAHCCPAMGTLHNTNTLEAFKTADKKLLEQSANEIWEAIKSGAALEN
PMLLNKFLLLLTFFADLKKYHFYYWFCYALCLPESIPVIRGVPVSLDQRLSPKQIQALEHAY
DDLCRAEGVTALPYFLFKYDDDTVLVSLKHYSDFFQQRKTKITVGVYDPCNLAQYPGWP
LRNFLVLAHRWSSSFQSVVLCFRDRTMQGARDVTHSII FEVKLPMAFSPDCPKAVGW
EKNQKGGMGRMVNLSGCMDPKRLAESVVDLNLKLMCWRLVPTLDLKDVKVSVKCLLLGAG
TLGCNVARTLMGWGVRHVTFVDNAKISYSNPVRQPLYEFEDCLGGGKPKALAAAERLQKI
FPGVNAARGFNMSIPMPGHPVNFSDVTMEQARRDVEQLEQLIDNHVIFLLMDTRESRWL
TVIAASKRKLVINAAALGFDTFVVMRHGLKPKKQGGAGDLCPSHLVAPADLGSSEFANIPG
YKLCYFCNDVVAPGDSTRDRTLDDQQCTVSRPGLAVIAGALAVELMVSVLQHPHGGYAI
SSSDRRMNEPPTSLGLVPHQIRGFLSRFDNVLVSLAFDKCTACSPKVLQYEREGFTFL
AKVFNSSHSFLEDLTGLTLLHQETQAAEIWDMSDEETV
```

```
>sp|Q5ZKY2|ATG7_CHICK Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7
OS=Gallus gallus OX=9031 GN=ATG7 PE=2 SV=1
MAAVSNESQNPVDPGSSKQLQFAPFNSALNVGFWEHLETKKLNRYRLDETPKVIKGYYYNG
DPSGFPARLTLEYSAFDINASIPARCCPAFGTLYTNTNFETFKSCDKKSLLEKEANEIWE
SIKSGAALENPMLLNRFLLLTFFADLKKYHFYYWFCYPALCFPDGIHVIQKPVCLGDRFSL
NQIQALQKAYDELQTEGVTAFPPYFLIKYHDNSVVVSPKKWDGFFQDQGGKVTVGVYDP
```

CNLSHYPGWPLRNFLILASHKWNILQSIIEVLCFRDRTMQGVRDITHSIIIFEIKLPQGAF  
 GPDCPKAVGWENKQKGGMGRVVNLSECMDPKRLAESSVDLNLKLMCWRLVPTLDLEKIV  
 SAKCLLLGAGTLGCSVARTLMGWGVRKITFVDNARISYSNPVRQPLYEFEDCLSGGKPKA  
 LAAAERLQKIFPGVNSEGYNMSIPMPGHVNFSEVTMAQARKDVATLEELIDAHDVVFL  
 MDTRESRWLPAVIAASKRKLVINAAALGFDTFVVMRHGLKKPKQOETGNACFSTAPGPS  
 DLGSSLSFNI PGYKLGICYFCNDVVAPGDSTRDRTLDDQCTVSRPGLAMIAGALAVELM  
 VSVLQHPEGGYAVASSSDDRMNEPPTSLGLVPHQIRGFLSRFDNVLPVSLAFDKCTAC  
 SPKVL DQYEREGFNFLAKVFNSHSHFLEDLTGLTLLHQETQAAEIWDMSSDET

>tr|Q7JY94|Q7JY94\_DROME Autophagy-related 7, isoform A OS=**Drosophila melanogaster** OX=7227 GN=Atg7 PE=1 SV=1

MSTEKEIILQFAPWESFVSPTFWHKLAELKLDHDLSDSKRSITGHYTNRNASGCLLEVD  
 YTAYNRMAKPPKFSHSAIGTIYNKNTIEEFKALDKLQLLADEGKELLADMCSSGALRDP  
 SLLTRFFVLSFADLKCHSYYYWFAFPCLPTLTKLQGAQVQKLRDLPNSSSYIMALKALPTE  
 SQNFFILYANVEKNI FEARSLSSLDKNEVFCYFGFADPSEYEHPAWIMRNYAAFLQOC  
 PSFVGKPLKFLGLRHNQMNIDDSLWVKVIQTEACDLSQSENIKFVWELNKNKMGPRM  
 VCMRDSMDPAKLAENSVNLNLKLMKWRLVPLDLNLEIISQTKCLLFGAGTLGCAVARNLLS  
 WGFKHITLLDSGKVGFSNPVRONLYTHADAVAGNRMKATTAAQRLKEINPSAETAGYVLE  
 IPMPGHTIGESLLAQTKEHLKVIEKLVQDHDVIFLLTDSRESRWLPTLLGAAKEKIVINA  
 ALGFDSYLVMRHGTTTRKEAGDDGQIEIQLKINGDQLGICYFCNDVTAPGNSLKDRDLDQ  
 QCTVTRPGVSNIAASYAVELLVALLQHPKELAPAYYAQSGRGRSEETEKEKVEGLLGI  
 LPHSIRGMLCNYENILPATQKFAQCIACSAAVLNEYKKEGHAFKTFETAKFLEDLTGISE  
 FKRLNSEIIDFDDEEFDMSSDDED

>tr|G5EBK4|G5EBK4\_CAEEL AuTophagy (Yeast Atg homolog) OS=**Caenorhabditis elegans** OX=6239 GN=atg-7 PE=1 SV=1

MATFVFPVFTCLDTGFWNEVNKKLNDWKLDETPKCISSQLSLHQTEGFKCHLSLSYDSLS  
 SLESTTGLSMSGTLLLYNTIESFKMVDKSDLRSEAEKIWESITTRKWLQNPRLLSQFFI  
 IAFADLKKFKYWWTCVPALVYPSEIKQEITPLSSLGADHKILFDFYRKNFPIFLYSKQ  
 SSKMLELSELENNTNPDEICVVDADPSPVAYSAGWMVRNVLAVAHLHPTWKHCHIIISLR  
 SADSIGIKYTWLTPSAECSADGAQNAVPKAVGWERNANDKLQPI SVDLSKEFDPKILMER  
 SVDLNLSLIKWTLHPDILQRLGKAEATAQAAIQRI FPSIQATAHRLTVMPMPGHSIDEKDVPEL  
 YNPNVRSLSSEFEDARLGRGKAETAQAAIQRI FPSIQATAHRLTVMPMPGHSIDEKDVPEL  
 EKDIKLEQLVKDHDVFLALDSREARWLPTVLA SRHKKIAISVAIGFDTYVIIRHGIGS  
 RSESVDVSSSDSVPYSQLSCYFCSDVTAPGNSTFDRTLDQOCTVARPGTSMIASGIAVE  
 LLSSVLQYDPDKTPASHDDNTTVLGAAPHQIRGFLGRFQQILPSVKRFDQCVACGDAIA  
 AQFQQNGWKVFRDVMNSPGRLEEVTLGDELQNSVNAIDIDFEDDEF

>tr|W4Y917|W4Y917\_STRPU Uncharacterized protein OS=**Strongylocentrotus purpuratus** OX=7668 PE=4 SV=1

MASQEKTDSSQQPLQFAPFSSALDVGFWHKLTQKKLNEYKLDGPKDIYGYYYNGDPDGL  
 PCRLSLEFNADFQSETTPPHCFSSRGTLVNENTLDAFKTCDKKALLDVTAEQLWDDIRQG  
 SAIQDPSLLSRFRLLTAFADLKKYHYCYWFAFPALLAPEGTKLIQPPEKLDKAMDQDKITA  
 LQAAYDLASQSLGQEPAFFLISTEDDKTVVLPPLTAWDQVTDKSKVMFGYADPCTLEQYPG  
 WPLRNFLCLISCHWASQLDQVTVVCFRNRTREGIRNSSHSLILRLQVPSTSP EISCPKCV  
 GWEKNQRNKL GARKVDLSSSMDPTRLAETSVDLNLKLMRWRLPSLDLDKISQTRCLLLG  
 SGTLCNVARCLLGWGVRTITFVDNSTVFSNPVRQSLFEFEDSLGGGKPKAQTAAEKIE  
 KIFPGVKTRGVLSIPMPGHAVGTSDEAIQQTRESVQKLEELIDEHDVVFLMDTRESRW  
 LPTVICSSKRKIVMNAALGFDTYLVLRHGMKPARDQPPDQTPSSASSGAAGGAEGGAA  
 GGASCSTSSISLSHIPGDKLGCYFCNDVVAPGDSTRDRTLDDQCTVSRPGLSMVAAALVV  
 ELMVSILQHSQGAYAAAETS AKDSHLTVDLTSPLGLVPHQIRGFLARYHCVLPASLCFDK  
 CTACCDIVLASYEREGFDLFLKVFNKPRFVEDLTGLSQLHLESELIEILD FSDDETMTSTS  
 SQ

>tr|A0A0G2KPR3|A0A0G2KPR3\_DANRE ATG7 autophagy-related 7 homolog (S. cerevisiae) OS=**Danio rerio** OX=7955 GN=atg7 PE=1 SV=1

RTPNIIISMAESSLKLQFAPFCSALEAGFWHQLTQKKLNEYRLDESPKNIKGYYYNGDAVG  
 LPARLTLEFSAFDADGPTPARCCPASGTLTYNTNTLEAFKSTDKKALLDKAANEIWSAIQS  
 GAALEDSSILNKFILLTFADLKKYHFYYWFCFPALCFVEGIQLLRAPLSLEQHFSDKQIS  
 SLQSAYDNLCASSGTTAVPHFLKYSSEESVEVAPLKEINLFFPDLKRVIYSTSHQCGLLP  
 QHPGWPLRNLLVLLAKKWASQLDVVEVLCFRDRTLQGVRSVQHSIIIFQLRLSDPAPSAAP

TTDINIHWKMIHSIQGNSAFFVSECQGVRLAESSVDLNLKLMRWRLVLPALDLEKVVST  
 RCLLLGAGTLGCNVARTLMGWGVRHITFVDNAKISYSNPVRQPLYEFEDCLSGKSKALAA  
 VDRLLKIFPGVNAEGFNMSIPMPGHPVNFSDLTVAQAQQDVEQLKKLISEHDVVFLMDT  
 RESRWLPTVIAASQRKLIIVNAALGFDTFVVMRHGLKKPRESEESSPMSASSSSSSSNTPA  
 ATVTAGSSLSFNI PGHRLGCFYFCNDVVAPGDSTRDRTLDDQCTVSRPGLAMIAGALAVEL  
 MVSVLQHPEGGYAVASSSDDRMNEPPTSLGLVPHQIVPLLSNVTNVLKYEMFWRKDTRCL  
 KKVLENYEREGFQFLAKVFNSSHSFLEDLTGLTLLHQETQAAEVRLTPSISI

>tr|A0A087ZSN9|A0A087ZSN9\_APIME Uncharacterized protein OS=*Apis mellifera*  
 OX=7460 GN=LOC726637 PE=4 SV=1

MSEFVKFTKLRSTTDCTFWAKFVELKIDKFKLDEKSNLWGSYSLQSLNEDNFNPLVLDL  
 TSFNEDLETINNKSSVICFGHMINTNTFEAFRQINPEQFIDSMGKDIINSIQDGTILQNP  
 WKLSLFLVLAYSDLKKYRFYYWVAHPTPLKLPemyyEEIPKSITEEFSEKHVEDLCNNFL  
 HLD CRTKNYFTVLISKENKMCIVDLATGINVININNEKQSQDYTEIYFAFYDPCTSSNPG  
 WPLRNLCLLCCWYCPHYFSKIIKFISIRGNKAQKSLVFKLKTKEYKKNYKNI RDNLFLSH  
 LVGWESNSNDKLGPTIADLSDTMDPTKLSDKAINLNLKLMKWRLVLPNLDLEKICNLKCLL  
 LGAGTLGCSVARVLLGWGVNIIIFVDSHSVSHSNTVRSLSYNHQDAIKHKYKAHAAKDAL  
 LNIRPSINTEGIVLHIPMPGHVVGQSMLESTKQSLKLEELIEISDVVFLLLDSREARWL  
 PTVLCAAKNKITINAALGFDSYTVQRHGTRNFNNQISPDLVKNPRGMDLGCYFCNDVTQ  
 PGNSQTDRTLDDQCTVSRPGLSQIAAGLAVELLVALLQHPEGVEAEALVGNSRDNINSND  
 AKLVGLLGCVPHTIRGSLWNYDTQLTITHRFTSCTACSVPIIEYKNRGLSFVLDACNIP  
 NYLEKLSGLEEILKRPDLDELALYALDNISDEDEDDQKM

>XP\_022296278.1 ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7 [*Crassostrea virginica*]

MSAPMERKQLQFVPFSSFLDSGFWHKLSENKLDVYGLDES RKDIKGFYFNGDPVGMPCRMNVEFSAFDLD  
 AKTPQKCLPMLGELHNTNTIDKFKCEDKKEMMTEAGKIIWEAII SGRALVSPNLLASFLILTFADLKKYH  
 YYYWFCFPCLCLPTDVTNLNQEPIKMKDKFTKEQMDQFLTSYDTFQEEQPCYQGGFFVAAFSODKFMVKDVK  
 SLNNFDDTQEVYFGFCDPSTIEDYPGWPLRNFLMLISYHWKGSLENINVL CIRDRSRDGNRDISHSVLLS  
 LNVDPVKSLOECPKCVGWKNEKQKLA PRFVNLSASMDPARLAASAVDLNLKLMRWRLPELDDLISRT  
 KCLLLGAGTLGCNVARCLLWGWVRTITLVDNGRISYSNPVRQSLFQFEDCVKGGKPKAEAAAESLKRIFP  
 GVNATGLSLSIPMPGHAVPDS AIDGVQKD VATLQSLVDSHDAIFLLLDTRESRWLPTLMAAEKQKIVICS  
 ALGFDTYLVMRHGKSDTEEEEDVPLSYHSIPGDQLGCYFCNDVVAPGNSLKDRTLDDQCTVSRPGISYM  
 ASALAVELLVSVLQHPQGGKAPADTSANDDHLSKDFVCPLGLVPHQIRCFVSRFQQVLPACKAFDKCTAC  
 SKTVIKEFRKEGFGFLRRAFNEPSYLEDLTGLTQMHQETLDAEVWGFSDDEECSSMEVS

## 2. ULK2

>tr|K1PNL8|K1PNL8\_CRAGI Serine/threonine-protein kinase ULK2 OS=*Crassostrea gigas*  
 OX=29159 GN=CGI\_10015287 PE=4 SV=1

MEVVGDIYEYSKKDLIGHGAFVVFVKGRHRKRNPHVVAIKSITKKNLAKSQNLLSKEIKIL  
 KELSDDLHENVVALLDCKETTNNHVYLVMEYCNGGDLADYLQAKGTLSEDTIASFLRQIAA  
 AMQVMNGKGVIVHRDLKPNILLCHDGKPNTPSTEMRLKIADFGFARFLNDGVMAATLCSGS  
 PMYMAPEVIMSLQYCAKADLWSIGTIVFQCLTGKAPFQAQTPQQLKHFYEKHAELKPNIP  
 KDTSPELRDLKMLKRNADRIEFASPVVPVGRASQGCSSSPTPPRCVSASPLSGKAD  
 YSTPPSKVVQMVKQEVAEAMQGSTHDEEFLKVDKGPTPRSNSPTEHDFVLVDPGMSDQS  
 DGSDKGRAPSTEDLQSLGERAQPQVVRVEPQVGSVAYKKDSGDVSSPSRPSLPMQSNQ  
 SEPIPVPTQVKAYERIRSSSSPLSSPRKCGTEPSPLDSAKLSSQNIKISPQPEKFSAPD  
 IGSFSPPTVKFSVGTTPPNVSTPWRRGSIGSSQGGAIYHPPSNASNSPSRRASMGSSPSGF  
 NNFSSPGSLPTILDASPHFELNQEPOFTDNMPTVPVRAFPFGQSKPKAIPESKGTKRYHP  
 SEVDRVKNLMEERCNTDPGAAGGMSMLSQOMKVAYMNQOGLNLLLEGQVVRYTSNENLVSP  
 NDNTVQMDTQRSGLRRTMSATPPSNLMFAQSPPNMEGPVAFVAPGLAEETLMGDNHN  
 EIMAKLSFVNDLADCVMEELAMAKGAPLNTLSESVNWKQEGEPLHGDQMPKFI EAQRLL EQ  
 LVLVYRSLQLLSSSLQ LARREIKDERLQISNALKTLKQMNERYHRCVSVCKHIQORLGI  
 TMQNALTPQVVIATADKLIYNYAIEMCQTAALDELDFGNPQECFKRYNTAHILLHSLSQQA  
 RNSNDKQLLDKYKDAVERRLSHIQATQNYYPQFEIS

>sp|Q8IYT8|ULK2\_HUMAN Serine/threonine-protein kinase ULK2 OS=*Homo sapiens*  
 OX=9606 GN=ULK2 PE=1 SV=3

MEVVGDFEYSKRDLVGHGAFVFRGRHRQKTDEVAIKSINKKNLSKSKQILLGKEIKIL

KELQHENIVALYDVQELPNSVFLVMEYCNNGDLADYLQAKGTLSEDTIRVFLHQIAAAMR  
 ILHSGKGIHRDLKPQNILLSYANRRKSSVSGIRIKIADFGFARYLHSNMMAATLCGSPMY  
 MAPEVIMSQHYDAKADLWSIGTVIYQCLVKGPPFQANSPODLRMFYEKNRSLMPSIPRET  
 SPYLANLLLGLLQRNQKDRMDFEAFFSHPFLEQGPVKKSCVPVPMYSGSVSGSSCGSSP  
 SCRFASPPSLPDMQHIQEENLSSPPLGPPNYLQVSKDSASTSSKNSSCDTDDFVLPVPHNI  
 SSDHSCDMPVGTAGRRASNEFLVCGGQCQPTVSPHSETAPIPVPTQIRNYQRIEQNLST  
 ASSGTNVHGSPPRSVAVRRSNTSPMGFLRPGSCSPVPADTAQTVGRRLSTGSSRPYSPSPL  
 VGTIPEQFSQCCCGHPQGHDSRSRNSSGSPVQAQSPQSLLSGARLQSAPTLTDIYQNKQ  
 KLRKQHSDPVPCPSHTGAGYSYSPQPSRPGSLGTSPTKHLGSSPRSSDWFFKTPLPTIIGS  
 PTKTTAPFKIPKTQASSNLLALVTRHGPAEEQSKDGNPRECAHCLLVQGSEQRRAEQQS  
 KAVFGRSVSTGKLSDQGGKTPICRHQGSTDSLNTERPMDIAPAGACGGVLAPPAGTAASS  
 KAVLFTVGSPPHSAAAPTCTHMFLRTRTTSVGPSNSGGSLCAMSGRVCVGSPPGPGFGSS  
 PPGAEEAPSLRYVPYGASPPSLEGLITFEAPELPEETLMEREHTDTLRHLNVMMLMFTECV  
 LDLTAMRGGNPELCTSAVSLYQIQESVVVDQISQLSKDWGRVEQLVLYMKAQAQLLAASLH  
 LAKAQIKSGKLSPTAVKQVVKNLNERKFCITMCKKLTEKLNRRFFSDKQRFIDEINSVT  
 AEKLIYNCAVEMVQSAALDEMFOQTEDIVYRYHKAALLLEGLSRILQDPADIENVHKKYC  
 SIERRLSALCHSTATV

>sp|Q9QY01|ULK2\_MOUSE Serine/threonine-protein kinase ULK2 OS=**Mus musculus**  
 OX=10090 GN=Ulk2 PE=1 SV=1

MEVVGDFEYCKRDLVGHGAFVFRGRHRQKTDEVAIKSINKKNLSKSKQILLGKEIKIL  
 KELQHENIVALYDVQELPNSVFLVMEYCNNGDLADYLQAKGTLSEDTIRVFLHQIAAAMR  
 ILHSGKGIHRDLKPQNILLSYANRRKSNVSGIRIKIADFGFARYLHSNTMAATLCGSPMY  
 MAPEVIMSQHYDAKADLWSIGTVIYQCLVKGPPFQANSPODLRMFYEKNRSLMPSIPRET  
 SPYLANLLLGLLQRNQKDRMDFEAFFSHPFLEQVPVKKSCVPVPMYSGPVPVGSSSSSP  
 SCRFASPPSLPDMQHIQEENLSSPPLGPPNYLQVSKDSASNSKNSSCDTDDFVLPVPHNI  
 SSDHSYDMPMGTARRASNEFFMCGGQCQPTVSPHSETAPIPVPTQVRNYQRIEQNLIST  
 ASSGTNPHGSPRSVAVRRSNTSPMGFLRVGSCSPVPGDTVQTVGRRLSTGSSRPYSPSPL  
 VGTIPEQFSQCCCGHPQGHARSRHSSSGSPVQTPAQPSLLLGLARLQSAPTLTDIYQNKQ  
 KLRKQHSDPVPCPSHAGAGYSYSPQPSRPGSLGTSPTKHTGSSPRNSDWFFKTPLPTIIGS  
 PTKTTAPFKIPKTQASSNLLALVTRHGPAESQSKDGNPRECSHCLSVQSERHRSEQQQ  
 SKAVFGRSVSTGKLSDQGGKTPICRHQGSTDSLNTERPMDVAPAGACGVMALPAGTAAS  
 ARAVLFTVGSPPHSATAPTCTHMVLRTRTTSVGSSSSGSLCSASGRVCVGSPPGPGGGS  
 SPPGAEGAPSLRYVPYGASPPSLEGLITFEAPELPEETLMEREHTDTLRHLNMMMLMFTEC  
 VLDLTAVRGGNPELCTSAVSLYQIQESVVVDQISQLSKDWGRVEQLVLYMKAQAQLLAASL  
 HLAKAQVKSGLSPMAVKQVVKNLNERKFCITMCKKLTEKLNRRFFSDKQRFIDEINSV  
 TAEKLIYNCAVEMVQSAALDEMFOQTEDIVYRYHKAALLLEGLSKILQDPTDVENVHKKYK  
 CSIERRLSALCCSTATV

>tr|X1WEA3|X1WEA3\_DANRE Unc-51-like autophagy-activating kinase 2 OS=**Danio rerio**  
 OX=7955 GN=ulk2 PE=4 SV=1

METVGDFFEYSRKDLIGHGAFVFKGRHKKKTDEVAIKSINKKNLSKSKQILLGKEIKIL  
 KELQHENIVALYDVQETPSSVFLVMEYCNNGDLADYLQAKGTLREDTLRVFLQQIAAAMR  
 ILNSKGIHRDLKPQNILLSYTGKSSINGIRIKIADFGFARYLQSNMMAATLCGSPMY  
 MAPEVIMSQNYDAKADLWSIGTVIYQCLVKGPPFQANSPODLRMFYEKNKSLVPNIPRET  
 SPQLEDLLLGLLQRNQKDRIDFDFFFHSHPFLEPISTIKKSCVPVPMYSGSLVSDSTCGSS  
 PSCRYVSPSLPDMQTLPEVDLSSPPLGPPNYLQLSKESGGSTSSKNSSCDTDDFVLPVPH  
 LSQEYSYDLPMGAVGRRPSSEFLLCGGSPQSTGQTPMVSPRSETTPIPVPTQVRNYQRI  
 KQNLSSPTTTLYGSPRSRGTVRRSNTSPMGFPKMSASPSPADTVQTVGRRLSTGSSRPY  
 SPSPLVGTIPEQLGHCCCGHPQSHEPRSRSSSGSPVSSQLLGARLQSAPTLTDIYQSK  
 QKLHKQLSDPVHPTSSAYPSNHSPQLGRPANLGTSPKHLGSSPRTSDWLTKSPLPTIIG  
 SPTKVTAPFKIPKTQASCNLMALADSPIPNKTLMDGRELCAHHTAYPSSRQPAPEASKT  
 SFGRSVSAGRLSEPPVRLITLGGQPYQGSTDSLNTERPMDTAPAGMCALAAGGSPRTVVF  
 TVGSPSSSTPPTCSHLASRPRATSVGSNSAGSLCSTSGKVYMGSPPGMTIGSSPPGAE  
 AGPSSLRYVPYGTSPPSLDGFITFEAPELPEETLMEREHTDTLMYLRMMLSFTECVLEIA  
 ALRAGGPDLGASAASLYPPQDSVVVDQISQLSREWGQVEQLVLYMKAQAQLLASSLHLAKA  
 QIKSAKLNPTAVKQVVKSLNERKFCISLCRRLTDKLNHRRFFSDKQRFVDEINSVTAEKLI  
 IYNHAVEMVQSAALDEMFOQTEDIAAYRYNKASMLLEGLTKILQDPADIENVIKYKASVDR  
 RISALCYCTVTLYE

>tr|A0A1S3HB46|A0A1S3HB46 LINUN serine/threonine-protein kinase ULK2-like isoform X1 OS=Lingula unguis OX=7574 GN=LOC106153722 PE=4 SV=1  
MESIGDFEYNKRDLIGHGAFVVFVKGRHKVTHDPVAIKSITKKNLAKSQNLLSKEIKILK  
ELSDLHHENVVALLDCKETTHHVYLVMEYCNGGDLADYLQAKGTLSEDTISGFLRQIAGA  
MRALNGKGI VHRDLKPQNILLTHSGQSPNPQPSDLQLKIADFGFARFLNDGVMAATLCGS  
PMYMAPEVIMSVQYDAKADLWSIGTIVFQCLTGKAPFQAQTPQQLKAFYEKNANLAPNIP  
SGTSKELRDLMLKLLKRNADRIDFDEFFSHPFVCPAKASSPVPVPPQRRARHPSDSPTLK  
TVSSSPLSGNVPYSPVNTDVQRVQKQEDVSESPQEGADFKVDSKSGSPAEDFVLVPPNL  
GGESEGSASSGRSKESPKHGRKDSQPSAQRVVRVDTTTEAASFRKGNAGSPSPQDQTS  
TRPTSLPVIKQTSPPSQPIPVPTQVEAYQRIQKNSSPKEPRTKEAGTHVMSPQRELAS  
QAVPIPRIASDRMVSVGSFPDIRSVSPSVQFHIGTPPSKNIRNRSIEVSPGRPNTATPP  
NGSPLRKSQAQSNSSPFGSPASLPKPSVMSVAQRFTVTNYPAGGRDVVALARTRTVPEGV  
QAMTTVAGAAADPYATWPRRLDTTGLAPSQTEPSNLQRTTSGGHLAPTRIGEQLMKAAGF  
QTRGLSNQIPANSVVPYRERNQSESGQRERRDSFQKRDSFTRERQDSTGRERSGSSPP  
NLPLPYAQSPPNMEGPILFEAPELAEETLMDSEHNETHVAKLTFVLALVETIIELAQKRSTP  
LTQSI SPQGRRDGGSEQVKFLSESQRMEQLVLHVKALQLLSASLQLAKEEIKAGKLMPS  
NTVKNILKEMNNHYHRCMGI SKQLKSCNINDNELKSFSTTADKLIYNYAIEMCQTAALDE  
LFGNPQECFRMYKNAQIILLHALAHQAQHNKDKDMLNKYKEAVEKRLFSLSQGLNYFYQE  
N

>XP\_011676911.1 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase ULK2 isoform X1  
[Strongylocentrotus purpuratus]  
MEHIDEYEYNNKDIIGHGAFVVFVKGRHRKRPDQTVAIKCNKKNLSKSKQTFPEKEIEILKELHHGNVVS  
LLHFKETSSSLFMVMEFCNGGDLADYLHIKGTLSIEDTIRFFLGQIACAMKAIHEKGI IHRDLKPQNLLLS  
HNSKHKVPHPNEIHLKIADFGFARFLEGMMAATLCGSPLYMAPEVITSQHYDAKADLWSIGTII FQCLT  
GSAPFKAANPELKKLYMKARTLDPNIPPGTSKALKDLLIRLLKRNQKDRIEFDKFFSHDFLGKLNKSTS  
TSPMPVPSRTYFSSSDSPGERRSLSVSPLSGHMPISSEPEPSSVCGGPRGYSISPLAAPPLISTDRPS  
AAKGLQEKRLRSSGMGSSDLVEDDFVIVQPSIVSELSYETSGASINVQTTTVDVITIRSNSSPIMSSSRGH  
SAQPKSSTSPVSGRIMAAVVRKLPSPSERPSSLPISSSPSTSPNTGRHRVSPKQSPSSLI SPSRIHAQI  
RHSYSSSGGSPIGSPQRRLLSPNQSPSLARHCILAQAGGVDNKPSPVQVTGLSSPGSQYNPGVVHKE  
YKFHASPTSPSPPHI PRVSTDPSMCSQAGLAGYRGSSPQSGSGTSPTNIPSPARRKLSSPARSSPQFF  
TGPSSLPTIAGSPTKKGFGNEITFTIGTHGISELSEPLNMPFAKSRVRASSCCLEGGQDIDSDSPGRDA  
LIPRSASSRLSEPLCLKAADFNLAMNPGSSIEGIPGAIAASPPMHPTSFFIGSQSRRNSVLTGESSSQ  
GSLTFATSPPNMEGPISFVAPELPEETLLAAEHTETVDRLNVILGIVEAIVEVAKSRVPLAESIYNQGS  
SIFSNSQVCFVSENYRLAEQLVLYTRSLLELLNAALTMAKEEFAARLKPSNAVRTVLQELNRVYHLCLIK  
SRQLCEGSPQLSLDIDLNSAMITADKLMYSYAI EQCQSAGMDEMFGNTQECLQRYRTAQMLLHGLCLQAG  
TDHDRNLLLKFKNALDQRLFLERQQTPTVPMIGL

>XP\_004946752.1 PREDICTED: serine/threonine-protein kinase ULK2 isoform X1  
[Gallus gallus]  
MEVVGDFFEYSKKDLIGHGAFVVFVKGRHRKKTDEVAIKSINKKNLSKSKQILLGKEIKILKELQHENIVA  
LYDVQEMPSSVFLVMEYCNGGDLADYLQAKGTLSEDTIRVFLQQIAAAMRILHSGKI IHRDLKPQNILLS  
YASRRKSSVSGIRIKIADFGFARYLHSNMMAATLCGSPMYMAPEVIMSQHYDAKADLWSIGTVIYQCLV  
KPPFQANSPQDLRMFYEKNRNLIPIPIRETSTYLADLLLGLLQRNQKDRMDFEAFFNHPFLDQISTVKKS  
CPVPVPTYAGSVSGSSCGSSPSCRFAFPPLPDMQHIQEENLSSPPLGPPNYLQVSKDSASTSSKNSSCD  
TDDFVLVPHNISSDHSYDMPLGAAGRASSEFLMCGGQSPLTISGSSGTQVQKPSSTSSRSTASGTTNRHC  
QPSVSPRSETAPIPVPTQLRNYQRIEQNLSSTASPVSNPHGSPRAGVVRNSNTSPMGFMKMGSCSPIPGD  
TAQGVGRRLLSTGSSRPYSPSPLVGTIPEQLGHCCCGQLQGHESSRSRNFAGSPIPPSQSPQSLMGARLQS  
APTLDIYQNKQKLRKQHS DPVCPSYAGYGYSHSPQPSRPGSLGTSPTKHMGSPPRSSDWLFKTPLPPTII  
GSPTKATTPFKIPKTQASSNLLALANRQGSIDAPLPKDI TEPRDFSHFHSTQGSEKHAGEQHSKATFGR  
SVSTGKLSQQVKTTLGGQLYQGSTDLSLNTERPMDTAPAGAYGIAVAPPSMGSGASSRAVMFTVGSPPSS  
ATPPTCTHMVLRTRTTSVGSNSSGSLCSTSGRVYMGSPPGIYMGSPPGAEAAPSLKYMPYGTSPPSLE  
GFITFEAPELPEETLMEREHTDTRLRHLNMMLTFTTECVLDTALRGGNPDLCSTSAVSLYQIQESIVVDQIS  
QLSKEWGQVEQLVLYMKAQQLLASSLHLAKAQVKLGKLNPNSTAVKHVVKSLNERYKFCIGMCKKLTEKLN  
RFFSDKQRFIDEINSVTAEKLIYSCAVEMVQSAALDEMFOQTEDITYRYHKAALLLEGLTKILQDPADIE  
NVHKYKSSIERRLSALCCSTVAVYEQ

>XP\_022286173.1 serine/threonine-protein kinase ULK2-like isoform X1  
[Crassostrea virginica]  
MEVVGDYEYSKKDLIGHGAFVVFVKGRHRKRNHVVAIKSITKKNLAKSQNLLSKEIKILKELSDLHHEN  
VVALLDCKETTTHHVYLVMEYCNGGDLADYLQAKGTLSEDTIAAFLRQIAAAMQVMNGKGI VHRDLKPQNI

LLCHDGGKPNTPSTEMRLKIADFGFARFLNDGVMAATLCGSPMYMAPEVIMSLQYCAKADLWSIGTIVFQC  
 LTGKAPFQAQTPQQLKHFYEKHAELKPNIPKDTSPELRDLLLKMLKRNADRIEFEDFFKHPFLKPPGQS  
 AAASSSPVPVPGRTSQGCSSESPTPPRCVSASPLSGKAEYSTPPSKVVQMVKQOEVAEAMQGSSEHDEEFL  
 KVDKGPTRNSNSPTEHDFVLVPGGMSDQSDGSDKGRVPSSDLPGLGERAQPVVVRVEPQAGSVAFKKDT  
 VDVPSRSPSSSLPMQTQONQSEPIPVPTQVKAYERIRSSSSPLSSPRKFGAVEVSPVDFPAKLSSQNIKMS  
 QPESKFSAPDIGSFSPTGTLKFCVGTTPPNVSTPWRRGSIGSSQGAQYHPPSNASNSPSRRASMGSSPL  
 GFNRNFTSPGSLPTILDASPHFELNQEPIQITDNMPTVPVVRAPFGQSKPKAIPESKGTKRYNPSEVDRVKV  
 NLMERCNTDGAAGGLSMLSQOMKVAYMNQQGLNQLLEGQVMRYTSNEQLVSPNENTVQMDTQRSNLR  
 TMSATTPPSNLMFAQSPPNMEGPVAFVAPGLAEETLMGDNHNEIMAKLSFVNDLADCVMEAMAKGAPLN  
 TLSESVNWKQEGEPLQGEPMKPFIEAQRLLLEQLVLYVRSLLSSSLQLARREIKDERLQISNALKTLLK  
 QMNERYHRCVSVCKHIQQLGITMQLNALTQVVIATADKLIYNYAIEMCQTAALDELFGNPQECFKRYNT  
 AHILLHSLSQARNSNDKQLLDKYKDAVERRLSHIQATQNYYPQFEIS

### 3. ATG12

>MK069431|Ubiquitin-like protein ATG12 [organism=**Crassostrea gigas**] mRNA,  
 complet cds  
 MSDDGNESRDSKNTETEEKSTPASPSHVAETKIDVLLKPAGDAPIMKKKK  
 WAVDRNKRIGWVGEFIKKYLKLTQAQDSLFLYVNVQSFAPTPDTEIGSIFDC  
 FGSDGKLVLYHYCKTQAWG

>sp|O94817|ATG12\_HUMAN Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Homo sapiens** OX=9606  
 GN=ATG12 PE=1 SV=1  
 MAEEPQSVLQLPTSIAAGGGLTDVSPETTTPEPPSSAAVSPGTEEPAGDTKKKIDILLK  
 AVGDTPIMKTKKWAVERTRTIQGLIDFIKKFLKLVASEQLFIYVNVQSFAPSPDQEVGTLY  
 ECFGSDGKLVLYHYCKSQAWG

>sp|Q9CQY1|ATG12\_MOUSE Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Mus musculus**  
 OX=10090 GN=Atg12 PE=1 SV=1  
 MSEDSEVVLQLPSAPVGAGGESLPELSPETATPEPPSSAAVSPGTEEPGDTKKKIDILL  
 KAVGDTPIKTKKWAVERTRTIQGLIDFIKKFLKLVASEQLFIYVNVQSFAPSPDQEVGTL  
 YECFGSDGKLVLYHYCKSQAWG

>sp|Q9VTU1|APG12\_DROME Autophagy protein 12-like OS=**Drosophila melanogaster**  
 OX=7227 GN=Atg12 PE=3 SV=3  
 MAETPESQAALSTSSSTPADKDGSKICILLNATGNVPIIKKRTWTVDPNKTVGWIQTFIH  
 KFLKLDASEQIFLYVNVQTFAPAPDQIIKNLYECHGTNGKLVLYYCKNQAWG

>tr|F1P145|F1P145\_CHICK Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Gallus gallus**  
 OX=9031 GN=ATG12 PE=3 SV=2  
 MAEAEQAPVSPQSEGRSGAGEEAPERTPESGASLVGEPATSPAGSPGTEDPAGDAKKK  
 IDVLLKAVGDTPIKTKKWAVERTRTIQGLCDFIKKFLKLMASEQLFIYVNVQSFAPSPDQ  
 EVGTLYECFGSDGKLVLYHYCKSQAWG

>tr|Q10931|Q10931\_CAEL Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Caenorhabditis  
 elegans** OX=6239 GN=lgg-3 PE=1 SV=1  
 METETATTPGTNTEPTAAASAEPKSDKVTVRLRNIADAPVLKNNKMVVNPTDVTASFIL  
 KLRKLLNIQANNSFLYIDNTFAPSPDTTFETLSRCYSVKITDKEILELQYSITPAYG

>tr|W4XIA0|W4XIA0\_STRPU Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Strongylocentrotus  
 purpuratus** OX=7668 PE=3 SV=1  
 MAEAQSTTGAGDETADPGTQNDQISKQTKEGDVVKKKSDKVDILLKATGSAPIMKKKKWA  
 VDANKKVAWVIDFIHKYLKCDPSQSLFLYVNVQAFAPAPDQEIIRNLFECYGS DGRLLILHYC  
 TSEAWG

>tr|F1Q9E0|F1Q9E0\_DANRE Ubiquitin-like protein ATG12 OS=**Danio rerio** OX=7955  
 GN=atg12 PE=1 SV=1  
 MSDNAESPTENPKDEHSLQHAVTDHSESSDEKKKIDVLLKAVGDTPIKTKKWSVERRRT  
 IQSLAQFISRFLKLEPSEQLFIYVNVQSFAPSPDQEVGVLFECFGSDGKLVLYHYCKSQAWG

>tr|A0A1S3ILW0|A0A1S3ILW0\_LINUN Ubiquitin-like protein ATG12 OS=Lingula unguis OX=7574 GN=LOC106165540 PE=3 SV=1  
 MSDEGGSEADLQGGYAVTLEDQSTQLSPVSEPANSPSSGTASPAIKLKSGKVDVLLKA  
 TGDAPIMKKKKWAVDPSKKIGWIIIEFIKKYIKAEPSESVFLYVNVQSFAPAPDVEVGTVYD  
 CFGSDGKLVLLHYCRTQAWG

>XP\_022317492.1 ubiquitin-like protein ATG12 isoform X1 [Crassostrea virginica]  
 MSDDGNESRDSKNTETEEKSSPTSPSHAVESKIDVLLKPA GDAPIMKKKKWAVDRNKRIGWVGEFIKKYL  
 KLTAQDSVFLYVNVQSFAPTPDTEIGSVFDKVLQTSMKMTKITGGPWATSLT

#### 4. ATG9A

>MK069430|autophagy-related protein 9A-like [organism=Crassostrea gigas]  
 mRNA, complet cds  
 MADYQTQYQPLASCEEDTDENDVPIHESANLMMHVPESTRWNHIENLDD  
 FFTRVYHYHQGGFVCMVSDVLLQLIQFIFVVGSTFLLECVNYDILFAN  
 SKNDTHKVTIPEAVAPFGQCVQEFDFGITVCLLVAFVWFRLIKVLYNI  
 FKYWEIRSFYLTALHITTTDLTNMTWHEVQRRLLLEVQKEQQMCIHKQELT  
 ELDIYHRILRFKNYMIAMERKSLLPFKHSIPLMGECAFYSIGLKYNLDFL  
 LFWGPWSPFENYWKLKDEFKIYHKRQLAEELSKKILWIGIANFALSPLI  
 LLWQILYSFFRYADTLKREPSMLGSRWSNYARLYLRHYNELDHEFDARL  
 NRGYRLANKYMDIFTSQLIVILAKNVAFFAGSVLAVLVVLTVIDEDVLAV  
 EHVLTMTVAGLIVTACKVFIPEHLVYCPEILMRNILAHVHYMPPDWSG  
 NAHTSKVRNEFSIFFQYKVAYLFEELLSPLVTPIVLCFSLRHKSMEIVDF  
 FRNFTVDVVGVDVCSFAQLDVRKRDNKMDRRDDEEPPQPSLRNTMFTPD  
 QSPSQEGKIQMSLMHFHLTNPEWKPPKECSLFINDIKEKANRNTTSLSIF  
 NPVTQNMVMSSQGSALTGYLSGLQPSGAGALGESATDQYTSLASSIAIQSG  
 MYPQSTQVSMAPSVSGVHRLRGAI STAEGPLERSIGGPVGTMOGSTSMI  
 GSGLGGYHSIGSSKPSVDEGSLELLSHDMSVSALYLHDFQSRKQRGGQM  
 GYENIEEMRARNLWQRQDSNQGPPVHAGMPNIQEKREEEEEKDSGNTETIAK  
 SV

>sp|Q7Z3C6|ATG9A\_HUMAN Autophagy-related protein 9A OS=Homo sapiens OX=9606  
 GN=ATG9A PE=1 SV=3  
 MAQFDTEYQRLEASYSDSPGEEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFT  
 CMLIGEIEFELMQFLFVVAFTTFLVSCVDYDILFANKMVNHS LHPTPEPVKVTLPDAFLPAQ  
 VCSARIQENGSLITILVIAGVFWIHRLIKFIYNICCYWEIHSFYLHALRIPMSALPYCTW  
 QEVQARIVQTQKEHQICIHKRELTELDIYHRILRFQNYMVALVNKSLPLRFRPLPGLGEA  
 VFFTRGLKYNFELILFWGPGSLFLNEWSLKAEYKRGQRLELAQRLSNRILWIGIANFLL  
 CPLILIWQILYAFFSYAEVLKREPGALGARCWSLYGRCYLRHFNELEHELQSRNLNRGYKP  
 ASKYMNCFLSPLLLTLLAKNGAFFAGSILAVLIALT IYDEDVLAVEHVLTVTLLGVTVTV  
 CRSFIPDQHMVFCPEQLLRVILAHIHYPDHWQGNHRHSQTRDEFAQLFQYKAVFLEEL  
 LSPIVTPLILIFCLRPRALEIIDFFRNFTVEVVGVDTC SFAQMDVRQHGHPQWLSAGQT  
 EASVYQQAEDGKTELSLMHFAITNPGWQPPRESTAFLGFLKEQVQRDGAASLAQGGLLP  
 ENALFTSIQSLQSESEPLSLIANVVAGSSCRGPPLPRDLQSRHRAEVASALRSFSPLQP  
 GQAPTGRAHSTMTGSGVDARTASSGSSVWEGQLQSLVLSYASTEMSLHALYMHQLHKQQ  
 AQAEPERHVHRRRESDESGESAPDEGGEGARAPQSI PRSASYPCAAAPRPGAPETTALHGG  
 FQRRYGGITDPGTVPRVPSHFSRLPLGGWAEDQSASRHPEPVPEEGSEDELPPQVHKV

>sp|Q68FE2|ATG9A\_MOUSE Autophagy-related protein 9A OS=Mus musculus  
 OX=10090 GN=Atg9a PE=1 SV=1  
 MAQFDTEYQRLEASYSDSPGEEEDLLVHVAEGSKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFT  
 CMLIGEMFELMQFLFVVAFTTFLVSCVDYDILFANKMVNHS LHPTPEPVKVTLPDAFLPAQ  
 VCSARIQENGSLITILVIAGVFWIHRLIKFIYNICCYWEIHSFYLHALRIPMSALPYCTW  
 QEVQARIVQTQKEHQICIHKRELTELDIYHRILRFQNYMVALVNKSLPLRFRPLPGLGEV  
 VFFTRGLKYNFELILFWGPGSLFLNEWSLKAEYKRGQRLELAQRLSNRILWIGIANFLL  
 CPLILIWQILYAFFSYAEVLKREPGALGARCWSLYGRCYLRHFNELEHELQSRNLNRGYKP  
 ASKYMNCFLSPLLLTLLAKNGAFFAGSILAVLIALT IYDEDVLAVEHVLTVTLLGVTVTV  
 CRSFIPDQHMVFCPEQLLRVILAHIHYPDHWQGVHLGGVAESHRHTPHSHLLPPPSGPG



DHRLLPQLYGRGRGCRHLLLCSDGRSPAWPSSVAVWRADRLSVPASRGREDRVVAHAL  
CHHQSRLAAPS

>tr|F1QCA8|F1QCA8\_DANRE Autophagy-related protein 9 OS=**Danio rerio** OX=7955  
GN=atg9a PE=3 SV=1

MAHFDTEYQRLEASYSPPGGEENLLVHVPEGSKSPWHHIENLDLFFQRVYNLHQKNGFT  
CMLLGEIFELVQLVVFVAFTVFLANCVDYDILFANKFVNHTDSLKVTLPDFAFLPVDVCSA  
RIRDSVPVIFILVISGVFWLHRLVKFIYNICCYWEIRSFIYINALKISMADLPYFTWQEVQ  
ARIVEIQKEHQICIHKKELSELDIYHRILRFRKNYVMAMVNKSLLPVFRFRLPVLGDTVFYF  
RGLKYNFELIFFWPGSLFENEWSLKSEYKRGGRLELADRLSSRILWIGIANLLCPVI  
LIWQILYAFFSYTEVIKREPGSLGARCWSLYGRFYLRHFNELDHELMSRLSKGYKASSKY  
MNCFMSPLLTVVAKNVAFFAGSILAVLIALTIYDEDVLAVEHVLSSITLLGVCITVCRSF  
IPDKHMVFCPEQLLKVILAHIHYPMDHWQGNHRYETRDEFAQLFQYKAVFILELLSPV  
ITPFILIFCLRRKSLEIIDFFRNFTVDVVGVDTCFAQMDVVRQHGHPAWMSAGKTEAS  
IYQQAEDGKTELSLMHFAITNPHWQPPRESTHFISSLKEKVRHDAAVGQQGIIAENAGFTS  
THSLHNDSEPRSLIANLLMGPPSLASLHLGREGSINHVSIGVSEGASALRSLSPVSTSLH  
LRGSYPSARLPRSDHPAVVAGRGMAGSGTDARTISSGSSAWEGQLTSMILSEYASTEMSI  
HALYMHEMHKQQRGELSRHTWHRQESDESSESVDVEAARNFPRSTFPCTTTSHQEG  
AAAQQSGSQRRQGGTSDPSSGSRVQRTPRMAMGGWSEENQTSRHHDVPPEEGSEDELPP  
HIHKVT

>tr|A0A0B4KF86|A0A0B4KF86\_DROME Autophagy-related protein 9 OS=**Drosophila melanogaster** OX=7227 GN=Atg9 PE=1 SV=1

MSSPHINYSRLAEEAASPFLEHHPSTGQGPSKTQDAKANAAAAHLDPGEHGLEQPLDEH  
DTEHEGEDTPRNSGVMIHMPETGRARWNHIEDLDSFFSRMYQYQKKGFTVIIVVDEMLQ  
VLEFGFVVWLLAFVMHCVRFDVLFVLDTPPGGLNPNKTTLSVDMYPTGECLANFTWVYTLV  
VFIAAIYLGIRLLKVMVYHITQYADIKRFYNSALHIEDSDLNFTWHEVQQRIRRVQAEQH  
MCIDKESLTELDIYHRVLRFKNYLVALMNKQLLPVRFHIPLYGEVVSLSRGMFLNIDFIL  
FRGPGSPFQNNWQLRDEFVRSNQTELAQRSLKILGLVALLNLVLPVIFVWQLIYFSFS  
YANILRKEPGALGLRWTWSNYGRLYLRHFNELDHEDARLNRAYDYADRYLNSFSSPLAAV  
IAKNLLFISGGLLLLILALGIIYEEHVQVEHLLAILAGLGAIGVVCRTLIPDENLVWCPE  
QLMTAILAHVHYLPESEWRQAHTTKVRQEFNSFFQFKAGYLLSEIFSPFVTPFVLI FVFR  
PKAIELVRFFRTFTVSVRGLVNVCSFAQMDVVRKHGNDWQLTSELEEMTRATAQQPQEP  
QQQSLAGGKTEMSLLRFTLNPEWQMPKEAKQFLRGVREHAVGELVQAKTSMVQENPLTN  
SLISFGTMGADYCSIANSVLTAQVTPQOLEISQSLRPGLGPVSGGFVVAASDFRQMLQQN  
LSASVGPLDSMRRLRLSRAEGRLEGPTDTLLYGLCGVDPVVGSTPLNVGVADMCLSALYL  
HELNQQKRQARQSRIDEAEDERPGTSHWPPRPPAAPSADTGFGSRHTVITSKAAESTPLL  
GSIRSXQRPEWI

>tr|E1BVB2|E1BVB2\_CHICK Autophagy-related protein 9 OS=**Gallus gallus**  
OX=9031 GN=ATG9A PE=3 SV=2

MAHLETQYQRLESSTESPPGGDLLVHVPEGAKSPWHHIENLDLFFSRVYNLHQKNGFT  
CMLIGEIFELMQFIFVVAFTTFLISCVDYDILFANKAVNHSQHPSEPIKVTLPDFAFLPPN  
VCSARIQANSFLICILVIAGVFWIHRLVKFIYNICCYWEIHSFIYINALRIPMSNLPYYTW  
QEVQARIVQIQKEHQICIHKKELTELDIYHRILRFRKNYVMAMVNKSLLPVFRFRLPLGDT  
VFYTRGLKYNFELIFFWPGSLFENEWSLKAELYKRAGRLELAEKLSRILWIGIANFLL  
CPLILIWQILYAFFSYTEILKREPGSLGARCWSLYGRCYLRHFNELDHELQSRLSKGYKP  
ASKYMNCFISPLLTIVAKNVAFFAGSILAVLIALTIYDEDVLAVEHVLTTVTLLGVGITV  
CRSFIPDQHLVFCPEQLLRVILAHIHYPMDHWQGNHRYETRDEFAQLFQYKAVFILEEL  
LSPITPLILIIICLRPKSLDIVDFRNFTVEVVGVDTCFAQMDVVRQHGHPAWMSAGKT  
EASIIYQQAEDGKTELSLMHFAITNPKWQPPRESTAFIGFLKERVHRDSSVALAQQAVLPE  
NALFSSIQSLQSESEPHSLIANVIAGSSVLGFHMGRDQASRHLSEVASALRSFSPLQSA  
QQPSGGFQTAGSSAMTASGADARTMSSGSSAWEGQLQSMILSEYASTEMSLHALYMHELH  
KQHAQLEPERHTWHRRESDESSESTHEELDAQRGAPVPLPRSASYPFSSRQPAEETATLQ  
TGFQRRYGGITDPGTVHRAPSHFSRLPLGGWAEDGQSARHPEVPPEESSEDELPPQIHKV

>tr|Q3T903|Q3T903\_CAEL Autophagy-related protein 9 OS=**Caenorhabditis elegans**  
OX=6239 GN=atg9 PE=2 SV=1

MAETQNLQKIDNSSINLIFFQKKTHQMENSQSKRAYQQIDDDFDEVLRNSTCTSRFMQ  
GWGSSTRSLLFGGASNDEQRNLIASSSSHSHSYHDSPAEPPETHYEQFTATHNHGPPTMA  
SSSQNLNRRWDHVLNLDEFFTHIYEHQNGGYLCIVLQKVFSLLQFIFVMSFTTFFTTQCV

NYQFLFANTNVTSHGTVNQGRHFGDAVVDNCPAHISIWMIFAILAAIVYWITRVIKHAQ  
 YIMKMSEIQQFYAHELKIADDQLPNLTWHAIVKRICEAQKKLRLSIHQDNITSIYIYHRI  
 LRYKNYMTGMINKRILHPVFDVFPFLGPIAYLPNNLKHEIERILFTSSTSAWTNGPNLREE  
 YKHHEQLDMAAKMKEDVINLFLQILRISVARPDASTAPIPDYGIVLLTDGAHKKTRWA  
 WNEKIQYLLRHFNELDHELSARLNRSHIYAAAYMDQFFSPVLEIAAKNITFIAAAVFGVL  
 TILSAWDEDVLQVEHVITVLTICGIVVLVCRGMI PDENLVWQPEILMTHVTSELHYLPST  
 WKGKAHTTGVRRHEFDQLFQMKWMMFFVLELTSPIFTFVLLFWLRPRCSQLANFFHDYTER  
 VDGLGDVCSFAVMDVGKHGDPKWNHIKELKAIVEDQEDQQAQSVVTSINRARDGKTELS  
 ILHFKTTNPEWQPPKASEKFLRKFRNRLGQEAASMLAPLTSMHLGQQMDRQQQQGKIGRNI  
 LLESVHSIVPTTSGGISASQVAPGRHPLIGDGLHRIDGPGVNAFQGIQGAKLGS GGVLAS  
 LYQEQPRAAESLSNSLRASGVDIDGAGAEMRINALFLRGLHDESIHSSSRNYGGTTSSF  
 NMHPTAMQSVFAMPDGFQGPAPAVESSLIDDIETPTYHRESVQRSAAEHKMEHETPEPLAE  
 LPDLPGPSSSEHQQRSLVPNTQHRQINEEEEEEEEEEDNTPLPSFSS

>tr|A0A087ZP33|A0A087ZP33\_APIME Autophagy-related protein 9 OS=**Apis mellifera** OX=7460 GN=Atg9 PE=3 SV=1

MKRETVITCPEPNRRAKTMTTVLDGSYQRMEPYDGEEDDGEDDDEHEETPQESGVMIHVV  
 PEGNKARWNHVEDLDSFFTRMYHYHQKHGFACMILQEALGQFIFVVFSTFLFHCINY  
 SLLFKNGKERKISISDVLISKSECIASMGITWICILVAAIFWILRLVKVLYHCTQFWDI  
 KLFFNTALKIEDCDLNLWHEIQKRVREVQKEQEMCIHKRELTELDIYHRILRFKNYMV  
 AMINKSLLPIRLKVPIIGEIIFLTRGLKYNMELLLFWGPWSPFENNWHLKEDYKKNLKRQ  
 ELARALSKHILWVGIVNLLCPLILLWQILYSFFNYGEI IKREPGLGTRMWSLYGRLYL  
 RHFNELDHELNARLNARYPASKYMSMFTSPIMTVIAKNVAFVAGSILAVLLILTVYDED  
 VLTVEHVLTITITILGAI VAGARAFIPDENLVWCPETLLTAVLAHATHYRPSWRGHAHTQT  
 TRAEVAQLFQYRAVHLLLEELISPLITPFILCFRMRQRALDIVDFYRNFTIEVTGVDVCS  
 FAQMDVRKHGPNMWQTATQIPVQDRAAKYDNQYATDPEKQLQIPISDQYTAEDGKTELSL  
 IHFTLTNPEWKPPSHAENFVTALRERVKKDVHGGGHEINPLLASLNSLSGLGPGYNDIIS  
 NIIRSTMINQASGPSTSTMFTNQPCCTTSVCTSGNEMLMNKSDIFPHAVQCGLSKAEGPVH  
 NEKGLLYGLQOEISNQSLGASVFSSEHFSTDL SIPVELIAADMSLSTLYLHELHHRQVR  
 RRGYQELAMRSVWQRSVPVQELATLPEVRQERAPLLLHQDSSIRNNREFKYNLNTRLDSI

>tr|A0A1S3JC03|A0A1S3JC03\_LINUN Autophagy-related protein 9 OS=**Lingula unguis** OX=7574 GN=LOC106171792 PE=3 SV=1

MSEFTTSYQPLPASGYEEDEVDTPHMETDVLIHVVPEESSKSRWNHIENLDEFFARVYQY  
 HQRNGFFCMVLEDVLQLLQFVVFVILFSSYLIECVKYDVVFDEIYRNNTGHHKVTAESV  
 IPLDQCVS SVRPFVAICLLVAAVFVWLRLIKVVYNVLYKWEIRAFYLTALKISADELPNL  
 TWHEVQKRVVEVQEQQMCIHKKELTELDIYNRILRFKNYQVAMVNKSLPLKYRIPFVG  
 DYVFLSTGLKYNLEMILFWGPWAPFENYWHLKQDFKNYHKKRELADYVSQRILWLGLANL  
 ILSPLIFLWQILYSFFRYAEI IKRQPGSLGARRWSLYGRLYLRHFNELDHEFEARLNRYG  
 KPAAEYMNIFTSPVLVILAKNVVFFAGAVLAVLIILTLIDEDTLQVENILRMMTILGAVV  
 AVCRAVIPAHEMVFCEFLMTHILKEVHYIPDSWKGNATHKVRQEFQALFQYKALYLLE  
 ELISPLVTPLILCFSIRHKAYDIVDFYRNFTVEVTGVDVCSFAQMDIRKHGPNQWVKEE  
 QTQADLYHQAEDGKAELSLMHFALTNPEWKPPENC SVFLNDIKDQAVNDANA AVVAPGDN  
 ALFTSLHTFALS PGVYNSINISSVVPGPSMASAHSRMRPLGTVPGPMSPPGGSHLRGA  
 GVAAHEGPLQSGGKILASLHSSGALSGSATGLGSGPTSLDTGHFLSSEVSQELSSAEMS  
 FSALYIHELHRRRRRQQRLEYLDFDGRPHVELQELGTRLTDFDLDPMPGHGGVVRGHMSNI  
 VESPQEEKSEEEMSNEDAITFVVSFDERVTKST

>XP\_022310215.1 autophagy-related protein 9A-like isoform X1 [**Crassostrea virginica**]

MSGAAADYQTQYQALGSCDEDDTDETDAPTHESANLMIHVVPSTRWNHIENLDDFFTRVYHYHQGGF  
 LCMMVSDVLQLVQFLFVVGSTFLLECVNYDILFANSKNDTHKVTISEAVTFPGQCQVEFDFGITVCLLV  
 ALAFWIFRTIKVLYNIFKYSEIRSFYLTALHISTAELSNTWHEVQRRLLLEVQKEQQMCIHKQELTELDI  
 YHRILRFKNYMIAMERKSLPLKHQVPCLGECAFYSIGLKYNLDFLLFWGPWSPFENYWKLDKEYKVYHK  
 RKQLADELSKKILWIGVANFALSPLILLWQILYSFFRYADTLKREPSMLGSRWSNYARLYLRHYNELDH  
 EFDARLNRYRLANKYMDIFTSELIVILAKNVAFFAGSVLAVLVVLTVIDEDVLAVEHVLTMTVAGLIV  
 TACKVFIPEHLVYCEILMRNILAHVHYMPDPWTGNAHTSKVRNEFSMFFQYKVAYLFEELLSPIITPL  
 ILCFYLRHKSMEIVDFFRNFTVDVVGVDVCSFAQLDVRKRDKKTGEVEQEEEDPEPSLRNTMFTFPVQS  
 PSQEGKIEMSLMHFHLTNPEWKPPKCESLFLNDVKEKAQRNTASLSIFHPVTQNMVNSQGLTGYLSGL  
 QPSGAGGLGESSTEQYTSLASSIAIQSGMYPQSTQVSMAPSVSGVHHRLRGAISTAEGPLERSVSGNLGT  
 LTNMQASSTASMGVSGVMGYHSLGNSKPSVDEGSLELMSQDMSVSALYLHDLQSRQRQGGHLGYENLED

LRARNLWQRQDSNNPPPGASAGMYNIQEKKEEEEGGREGETSETITKTA



## Caractérisation de la voie de l'autophagie chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* en réponse à une infection par le virus OsHV-1

### Résumé :

Les importantes mortalités observées sur le naissain de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont fortement affecté l'économie aquacole de plusieurs pays dans le monde. Les causes de ces mortalités sont complexes, mais un agent viral appartenant à la famille des herpèsvirus, appelé ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), a été identifié comme étant le principal facteur responsable de ces mortalités. Les moyens disponibles pour lutter contre le virus OsHV-1 restent limités et une meilleure connaissance des interactions entre l'huître creuse et le virus est nécessaire. Récemment, les résultats de plusieurs études et la caractérisation du génome de *C. gigas* ont démontré l'existence potentielle chez cette espèce de plusieurs voies antivirales connues chez les mammifères. La voie de l'autophagie est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont la défense immunitaire. Cette voie serait fonctionnelle dans le manteau de *C. gigas* et impliquée dans la réponse de l'huître creuse à différentes pathologies incluant les infections virales. Dans le cadre de la thèse, un travail a été réalisé afin d'approfondir les connaissances sur le mécanisme de l'autophagie chez *C. gigas* et sur sa régulation au cours d'une infection par le virus OsHV-1. Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une forte conservation de la voie de l'autophagie au niveau moléculaire. Pour la première fois chez *C. gigas*, il a été observé des structures autophagiques chez les hémocytes. Ce résultat a permis de développer de nouvelles approches afin de détecter et suivre la régulation de l'autophagie chez l'huître creuse. Un suivi de l'autophagie au cours d'une infection par le virus OsHV-1 a montré une réplication virale suivie d'une modulation de l'autophagie dans le manteau et dans l'hémolymphe. Enfin, il a été montré une régulation différentielle de l'autophagie au niveau transcriptomique dans le manteau et dans l'hémolymphe.

Mots clés: autophagie, OsHV-1, *Crassostrea gigas*, huître creuse

## Study of the autophagy pathway in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in response to an infection by the virus OsHV-1

### Summary :

Mortality outbreaks of young Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, have seriously affected the aquaculture economy in several countries around the world. Although the causes for these mortalities outbreaks are complex, a viral agent was identified as the main factor, the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1). The mean to fight against the virus remains limited and Pacific oyster/virus interactions need to be further investigated. Recently, the results of several studies and the *C. gigas* genome sequencing have demonstrated the potential existence of several known mammals' antiviral pathways in the Pacific oyster. The autophagy pathway is involved in many cellular processes including immune defense. This pathway seems to be functional in the mantle of *C. gigas* and involve in the response of the Pacific oyster to several pathologies including viral diseases. As part of this Phd work was to improve knowledge about the autophagy pathway mechanism in *C. gigas* and to decipher it modulation during the process of an infection by the virus OsHV-1. This work has highlighted a strong conservation of the pathway of autophagy at the molecular level. For the first time in *C. gigas*, autophagic structures were observed in haemocytes. This result has allowed to development new approaches to detect and monitor the regulation of autophagy in Pacific oyster. A monitoring of autophagy during an infection by the virus OsHV-1 showed that the viral replication is followed by a modulation of autophagy in the mantle and in haemolymph. Finally, a differential regulation of the autophagy pathway at the transcriptomic level in the mantle and haemolymph has been shown.

Keywords: autophagy, OsHV-1, *Crassostrea gigas*, Pacific oyster



Laboratoire de Génétique et Pathologie des Mollusques  
Marins (LGPM)  
Avenue de Mus de Loup  
17390 LA TREMBLADE

